

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA MICROBIOLOGIE- IMUNOLOGIE**

Drd. ANA SAMSON (TUDOSE)

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Mihai CARP-CĂRARE**

**IAȘI
2020**

**“ION IONESCU DE LA BRAD” UNIVERSITY
OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE OF IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: MICROBIOLOGY-IMMUNOLOGY**

Drd. ANA SAMSON (TUDOSE)

DOCTORAL THESIS

**PhD coordinator,
Prof. univ. dr. Mihai CARP-CĂRARE**

**IAȘI
2020**

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA MICROBIOLOGIE- IMUNOLOGIE**

**CERCETĂRI PRIVIND
EPIDEMIO-SUPRAVEGHEREA BOLII LIMBII
ALBASTRE (BLUE TONGUE) ÎN UNELE
JUDEȚE DIN SUD- ESTUL ROMÂNIEI**

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. MIHAI CARP-CĂRARE**

**Doctorand,
ANA SAMSON (TUDOSE)**

**IAȘI
2020**

**“ION IONESCU DE LA BRAD” UNIVERSITY
OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE OF IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
DOCTORAL FIELD: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: MICROBIOLOGY-IMMUNOLOGY**

**RESEARCH ON EPIDEMIC- SURVEILLANCE
OF BLUETONGUE DISEASE (BLUETONGUE)
IN SOME COUNTIES FROM SOUTH-EAST
ROMANIA**

**PhD coordinator,
Prof. univ. dr. MIHAI CARP-CĂRARE**

**PhD student,
ANA SAMSON (TUDOSE)**

**IAȘI
2020**

CUPRINS

INTRODUCERE	11
MULTUMIRI	15
REZUMAT	17
PARTEA I STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	32
CAP.1. DATE BIBLIOGRAFIE PRIVIND BOALA LIMBII ALBASTRE (BLUETONGUE)	33
1.1. Istoricul și importanța bolii limbii albastre (<i>Bluetongue</i>).....	33
1.1.1. Istoric.....	33
1.1.2. Importanța.....	35
1.2. Etiologia	35
1.3. Caractere epidemiologice.....	38
1.3.1. Receptivitate	39
1.3.2. Surse de infecție și transmitere.....	40
1.3.3. Dinamica epidemiologică.....	40
1.3.3.1. Mecanismul <i>overwintering</i>	41
1.3.3.2. Fenomenul <i>overwintering</i> la insecte.....	41
1.3.3.3. Fenomenul <i>overwintering</i> la rumegătoare.....	42
1.3.3.4. Alte mecanisme <i>overwintering</i>	43
1.4. Patogeneză.....	44
1.4.1. Replicarea pe gazde nevertebrate.....	44
1.4.2. Replicarea pe gazdele vertebrate.....	44
1.5. Tabloul clinic.....	47
1.6. Tabloul anatomopatologic.....	48
1.7. Diagnostic.....	49
CAPITOLUL II. SITUAȚIA EPIDEMIOLOGICĂ A BOLII BLUETONGUE ÎN EUROPA ȘI ROMÂNIA	51
2.1. Evoluția <i>Bluetongue</i> în Europa.....	51
2.2. Evoluția <i>Bluetongue</i> în România.....	55
PARTEA A II-a	57
CONTRIBUȚII PERSONALE	
CAPITOLUL III. SCOPUL CERCETĂRIILOR, OBIECTIVELE PROPUSE ȘI CADRUL ORGANIZATORIC	58
CAPITOLUL IV INVESTIGAȚII PRIVIND SUPRAVEGHEREA SEROLOGICĂ ÎN BOALA LIMBII ALBASTRE LA RUMEGĂTOARELE DIN REGIUNEA DE SUD-EST A ROMÂNIEI	60
4.1. Supravegherea serologică în județul Galați.....	62
4.1.1. Materiale și metode de lucru.....	62
4.1.2. Rezultate și discuții.....	67
4.1.3. Concluzii.....	72
4.2. Supravegherea serologică în județul Vrancea.....	72
4.2.1. Materiale și metode de lucru.....	73
4.2.2. Rezultate și discuții.....	76
4.2.3. Concluzii.....	80
4.3. Supravegherea serologică în județul Brăila.....	81
4.3.1. Materiale și metode de lucru.....	81
4.3.2. Rezultate și discuții.....	82

4.3.3. Concluzii.....	86
4.4. Supravegherea serologică în județul Tulcea.....	87
4.4.1. Materiale și metode de lucru.....	87
4.4.2. Rezultate și discuții.....	90
4.4.3. Concluzii.....	92
4.5. Analiza comparativă a supravegherii serologice pentru <i>Bluetongue</i> , în Sud-Estul României.....	92
4.5.1. Materiale și metode de lucru.....	92
4.5.2. Rezultate și discuții.....	93
4.5.3. Concluzii.....	95
CAPITOLUL V INVESTIGAȚII VIRUSOLOGICE ÎN BLUETONGUE.....	96
5.1. Materiale și metode de lucru.....	97
5.2. Rezultate și discuții.....	101
5.3. Concluzii	109
CAPITOLUL VI. INVESTIGAȚII PRIVIND ASPECTELE CLINICE ȘI ANATOMOPATOLOGICE ÎN BOALA LIMBII ALBASTRE LA RUMEGĂTOARELE DOMESTICE DIN REGIUNEA DE SUD-EST A ROMÂNIEI.....	111
6.1. Materiale și metode de lucru.....	112
6.2. Rezultate și discuții.....	113
6.3. Concluzii	124
CAPITOLUL VII. INVESTIGAȚII PRIVIND SUPRAVEGHEREA ENTOMOLOGICĂ A VECTORILOR TRANSMIȚĂTORI AI VIRUSULUI BLUETONGUE DIN REGIUNEA DE SUD-EST A ROMÂNIEI.....	126
7.1. Supravegherea entomologică în județul Vrancea.....	128
7.1.1. Materiale și metode de lucru.....	128
7.1.2. Rezultate și discuții.....	131
7.1.3. Concluzii	138
7.2. Supravegherea entomologică în județul Brăila.....	138
7.2.1. Materiale și metode de lucru.....	138
7.2.2. Rezultate și discuții.....	140
7.2.3. Concluzii	145
7.3. Supravegherea entomologică în județul Galați.....	146
7.3.1. Materiale și metode de lucru.....	146
7.3.2. Rezultate și discuții.....	147
7.3.3. Concluzii	153
7.4. Supravegherea entomologică în județul Tulcea.....	154
7.4.1. Materiale și metode de lucru.....	155
7.4.2. Rezultate și discuții.....	156
7.4.3. Concluzii	162
7.5. Analiza comparată a situației entomologice în județele din Sud Est a României.....	163
7.5.1. Materiale și metode de lucru.....	163
7.5.2. Rezultate și discuții.....	163
7.5.3. Concluzii	169
CAPITOLUL VIII. CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI.....	171
BIBLIOGRAFIE.....	175

ANEXA 1. LISTA TABELELOR.....	183
ANEXA 2. LISTA FIGURILOR.....	185
ANEXA 3. ABREVIERI.....	191
ANEXA 4. LISTA LUCRĂRILOR.....	192

TABLE OF CONTENTS

	PAG
INTRODUCTION.....	13
ACKNOWLEDGEMENTS.....	16
SUMMARY.....	25
PART I CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	32
CHAPTER I. BIBLIOGRAPHY DATA ON BLUETONGUE DISEASE....	33
1.1.History and importance of <i>Bluetongue</i> disease.....	33
1.1.1. The histroy	33
1.1.2. The importance	35
1.2.Etiology	35
1.3.Epidemiological characters.....	38
1.3.1 Receptivity.....	39
1.3.2.Sources of infection and transmission.....	40
1.3.3. Epidemiological dynamics.....	40
1.2.3.1. The overwintering mechanism.....	41
1.2.3.2. The phenomenon of overwintering in insects.....	41
1.2.3.3.The phenomenon of overwintering in ruminant....	42
1.2.3.4. Other overwintering mechanisms.....	43
1.4. Pathogenesis.....	44
1.1.3. Replication on invertebrate hosts.....	44
1.1.4. Replication on vertebrate hosts.....	44
1.5.Clinical aspects.....	47
1.6.Anatomopathological aspects.....	48
1.7.Diagnosis.....	49
CHAPTER II. EPIDEMIOLOGICAL SITUATION OF BLUETONGUE DISEASE IN EUROPA AND ROMANIA.....	51
2.1. Evolution of the <i>Bluetongue</i> disease in Europa.....	51
2.2. Evolution of the <i>Bluetongue</i> disease in Romania.....	55
PART II	
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
CHAPTER III. PURPOSE OF THE RESEARCH, OBJECTIVES AND ORGANIZATIONAL FRAMEWORK.....	57
CHAPTER IV RESEARCH REGARDING THE SEROLOGICAL SURVEILLANCE IN THE BLUETONGUE DISEASE IN RUMINANTS I THE SOUTH-EAST REGION OF ROMANIA.....	60
4.1. Serological surveillance in Galați.....	62
4.1.1.Material and method.....	62
4.1.2. Results and discussions.....	67
4.1.3. Conclusions.....	72
4.2. Serological surveillance in Vrancea.....	72
4.2.1. Material and method.....	73
4.2.2. Results and discussions.....	76
4.2.3. Conclusions.....	80
4.3. Serological surveillance in Brăila.....	81
4.3.1. Material and method.....	81
4.3.2. Results and discussions.....	82

4.3.3. Conclusions.....	86
4.4. Serological surveillance in Tulcea.....	87
4.4.1. Material and method.....	87
4.4.2. Results and discussions.....	90
4.4.3. Conclusions.....	92
4.5. Comparative analysis of serological surveillance for <i>Bluetongue</i> Southeast Romania.....	92
4.5.1. Material and method.....	92
4.5.2. Results and discussions.....	93
4.5.3. Conclusions.....	95
CHAPTER V. VIROLOGICAL INVESTIGATIONS IN <i>BLUETONGUE</i>	96
5.1. Material and method.....	97
5.2. Results and discussions.....	101
5.3. Conclusions.....	109
CHAPTER VI. INVESTIGATION ON THE CLINICAL AND ANATOMOPATHOLOGICAL ASPECTS IN <i>BLUETONGUE</i> DISEASE IN THE DOMESTIC RUMINANTS IN THE SOUTH-EAST REGION OF ROMANIA.....	111
6.1. Material and method.....	112
6.2. Results and discussions.....	113
6.3. Conclusions.....	124
CHAPTER VII. INVESTIGATION REGARDING ENTOMOLOGICAL SURVEILLANCE OF THE <i>BLUETONGUE</i> VIRUS, TRANSMITTING VECTORS.....	126
7.1. Entomological surveillance in Vrancea.....	128
7.1.1. Material and method.....	128
7.1.2. Results and discussions.....	131
7.1.3. Conclusions.....	138
7.2. Entomological surveillance in Brăila.....	138
7.2.1. Material and method.....	138
7.2.2. Results and discussions.....	140
7.2.3. Conclusions.....	145
7.3. Entomological surveillance in Galați.....	146
7.3.1. Material and method.....	146
7.3.2. Results and discussions.....	147
7.3.3. Conclusions.....	153
7.4. Entomological surveillance in Tulcea.....	154
7.4.1. Material and method.....	155
7.4.2. Results and discussions.....	156
7.4.3. Conclusions.....	162
7.5. Comparative analysis of the entomological situation in the South Eastern counties of Romania.....	163
7.5.1. Material and method.....	163
7.5.2. Results and discussions.....	163
7.5.3. Conclusions.....	169
CHAPTER VIII. FINAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	173
BIBLIOGRAPHY.....	175
ANNEX 1 LIST OF TABLES.....	183

ANNEX 2 LIST OF FIGURES.....	185
ANNEX 3 ABBREVIATIONS.....	191
ANNEX 4 LIST OF ARTICLES.....	192

INTRODUCERE

Bluetongue (boala limbii albastre) cunoscută și sub denumirea de febra catarală este o boală infecțioasă, de natură virală, necontagioasă, cu transmitere vectorială, ce afectează rumegătoarele domestice (ovine, caprine, bovine) și sălbatice (bivoli, cerbi, mai multe specii de antilope africane și alte specii ale ordinului *Artiodactyla*).

Bluetongue este întâlnită în teritorii cuprinse între 40° latitudine nordică și 35° latitudine sudică, putându-se răspândi datorită extinderii arealului speciilor vectori *Culicoides*, până la 55° latitudine nordică, regiuni în care boala are un pronunțat caracter sezonier.

În epidemiologia *Bluetongue*, bovinele au un rol deosebit de important, datorat viremiei prelungite în absența semnelor clinice ale bolii. Boala este cunoscută din a doua jumătate a secolului al XIX-lea, odată cu intensificarea creșterii ovinelor din rasa Merinos în Africa de Sud. Primele relatări privind evoluția *Bluetongue* datează din 1876, când sunt semnalate îmbolnăviri cu mortalitate ridicată. Ulterior, prezența bolii a fost semnalată în numeroase state din Africa și Orientul apropiat, Asia, Europa, precum și în Australia și SUA.

Bluetongue nu este o zoonoză dar evoluția sa la animalele receptive duce la importante repercusiuni economice. Importanța economică a bolii rezidă din pierderile importante, consecutiv diminuării capacității productive a animalelor, apariția malformațiilor fetale, mortalitate dar și datorită cheltuielilor cu imunizarea animalelor receptive, restricții comerciale, reducerea prețului de valorificare a animalelor din speciile receptive și a produselor provenite de la acestea. Focarele de *Bluetongue* pot influența semnificativ cantitatea de carne, lapte și alte produse comercializate și din această perspectivă, boala limbii albastre poate fi considerată o potențială armă biologică (Blancou și Pearson, 2003; Sperlova și Zendulkova, 2011). Pierderile economice globale datorate bolii limbii albastre nu pot fi calculate exact dar există estimări care le aproximează la aproximativ 3 miliarde USD / an (Tabachnick 1996).

Potrivit ANSVSA, o evaluare completă a pierderilor economice ar trebui să includă costul operațiunilor de supraveghere și eradicarea bolii (compensația pentru animalele ucise, costurile specifice activităților de eradicare legate de personal, materiale, echipamente etc.) pentru îngrijirea terenurilor și activități de combatere și dezinfecție a dăunătorilor).

În România, supravegherea serologică a fost introdusă încă din 2000, iar supravegherea entomologică din anul 2005, când au fost identificate speciiile culicoide vectoriale *C. obsoletus* și *C. pulicaris*.

Apariția bolii limbii albastre în România a fost un fenomen neașteptat, care a surprins autoritățile române, deși au existat alerte de boală (Bulgaria - iunie 2014, Grecia - iulie 2014, Turcia - august 2014).

Primul focar a fost semnalat în august 2014 la bovinele din județul Buzău, după care epidemia s-a răspândit rapid în sectorul animalelor domestice, numărul de cazuri raportate având o evoluție fulminantă.

Pe lângă pierderile imediate, apariția bolii poate genera efecte pe termen lung, care pot afecta decisiv sectorul zootehnic românesc, recuperat ușor după o lungă perioadă de declin. România, avea la momentul declanșării epidemiei, o piață de desfacere a ovinelor și bovinelor către Iordania, Siria și Israel, dar care a fost blocată prin interzicerea exporturilor. Aceeași restricție a fost impusă și în spațiul intracomunitar.

Pierdereapietelor iordaniene, siriene și israeliene și a unui segment de piață comunitar, posibilitatea limitării exportului de bovine, ovine și caprine românești către alți parteneri comerciali majori precum China, Turcia și alte țări arabe, arată importanța acestei boli pentru sectorul zootehnic din România.

Ușurința cu care boala limbii albastre s-a răspândit, demonstrează că teritoriul României este afectat de schimbările climatice generate în urma încălzirii globale, care au permis vectorilor transmitători să prolifereze și să răspândească virusul *Bluetongue* la animalele receptive.

În egală măsură, reiese fragilitatea și lipsa unor măsuri adecvate care să asigure continuarea activității zootehnice.

Controlul și eradicarea *Bluetongue* prin metode convenționale, cum ar fi restricțiile de mișcare sunt dificil de realizat datorită infecțiilor asimptomatice, viremiei prelungite la bovine și persistența virusului în populația animalelor receptive. Prin urmare, vaccinarea utilizând vaccinuri specifice serotipului identificat, este singura metoda eficientă de a controla această boală.

În lucrare, ne-am propus să realizăm un studiu de epidemio-supraveghere al bolii limbii albastre, care a evoluat în regiunea de Sud-Est a României, în perioada 2014-2017, bazat pe analiza datelor obținute în urma examenelor serologice, virusologice și clinice la rumegătoare domestice, precum și analiza datelor obținute în urma supravegherii entomologice.

INTRODUCTION

Bluetongue disease, also known as catarrhal fever, is an infectious, viral, non-contagious vector-borne disease that affects domestic (sheep, goat, bovine) and wild (buffalo, deer, more species of African antelopes and other species of the order *Artiodactyla*) ruminants.

Bluetongue evolves on territories between 40° North latitude and 35° South latitude, being able to extend up to 55° North latitude due to the extension of the *Culicoides* vector species area, regions in which the disease has a pronounced seasonal character, evolving during the activity period of adult *culicoides*.

In *Bluetongue* epidemiology, cattle play a particularly important role, due to prolonged viremia in the absence of clinical signs of the disease. The disease is known from the second half of the 19th century, with the increase of Merino sheep breeding in South Africa. The first reports on the evolution of *Bluetongue* date from 1876, when diseases with high mortality are reported. Subsequently, the presence of the disease has been reported in many countries in Africa and the Near East, Asia, Europe, as well as in Australia and the USA.

Bluetongue is not a zoonosis but its evolution in receptive animals leads to important economic repercussions. The economic importance of the disease resides in the important economic losses consequently of diminishing the productive capacity of the animals, the appearance of the fetal malformations, mortality, but also due to the expenses with the immunization of the receptive animals, commercial restrictions, the reduction of the price of economic valorization of the animals of the receptive species and of the products derived from them. *Bluetongue* outbreaks can significantly influence the quantity of meat, milk and other products marketed and from this perspective *Bluetongue* disease can be considered a potential biological weapon (Blancou and Pearson, 2003; Sperlova and Zendulkova, 2011). The global economic losses due to the disease cannot be accurately calculated, but there are estimates that approximate them to about 3 billion USD / year (Tabachnick 1996).

According to ANSVSA, a comprehensive assessment of economic losses should include the cost of disease surveillance and eradication (compensation for killed animals, specific costs for eradication activities related to personnel, materials, equipment, etc.), for land care, control activities and pest disinsection.

In Romania, serological surveillance has been introduced since 2000, and entomological surveillance from 2005, when the vector culicoid species *C. obsoletus* and *C. pulicaris* were identified.

The emergence of the *Bluetongue* disease in Romania was an unexpected phenomenon, which surprised the Romanian authorities, although there were disease alerts (Bulgaria - June 2014, Greece - July 2014, Turkey - August 2014).

The first outbreak was reported in August 2014 in cattle from Buzău County, after which the epidemic spread rapidly in the domestic sector, the number of cases reported having a rapid evolution.

In addition to the immediate losses, the onset of the disease can generate long-term effects, which can decisively affect the Romanian animal breeding sector, easily recovered after a long period of decline. Romania, at the time of the outbreak, had a market for the sheep and cattle sale to Jordan, Syria and Israel, but which was blocked by a ban on imports. The same restriction was imposed in the intra-Community area.

The loss of Jordanian, Syrian and Israeli markets and a segment of the EU market, the possibility of limiting the export of Romanian cattle, sheep and goats to other major trading partners such as China, Turkey and other Arab countries, showed the importance of this disease for the Romanian livestock sector.

The ease with which the *Bluetongue* disease has spread, shows that the territory of Romania is affected by climate change caused by global warming, which allowed the transmitting vectors to proliferate and spread the *Bluetongue* virus to the receptive animals.

Equally, it also shows the fragility and lack of adequate measures to ensure the continuation of the zootechnical activity.

Control and eradication of *Bluetongue* by conventional methods, such as movement restrictions, is difficult to achieve due to asymptomatic infections, prolonged viremia in cattle and the persistence of virus in the receptive animal population. Therefore, vaccination using vaccines specific to the identified serotype is the only effective way to control this disease.

In this thesis, we followed an epidemiological study of the *Bluetongue* disease during 2014-2017, which evolved in the South-East region of Romania, based on the analysis of the data obtained from serological, virological and clinical examinations of domestic ruminants in this region, as well as the analysis of data obtained from entomological surveillance.

In Romania, according to ANSVSA in the Declaration of Romania regarding the regaining of the free country status formulated in 2018, the last *Bluetongue* outbreak (BTV4) was reported on November 24, 2015 and was inactivated on January 4, 2016.

MULȚUMIRI

Cu profundă recunoștință, mă adresez conducătorului de doctorat, domnului Prof. dr. Mihai Carp-Cărare, căruia îi mulțumesc pentru îndrumarea și susținerea oferită pe parcursul anilor de studii doctorale în conceperea și redactarea tezei de doctorat.

Cu gratitudine, mulțumesc distinșilor membri ai comisiei de referenți, pentru interesul și munca depusă în parcurgerea și evaluarea tezei de doctorat.

Conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași, îi mulțumesc pentru oportunitățile și contextul educațional academic puse la dispoziție pe durata studiilor doctorale.

Mulțumesc comisiei de îndrumare pentru efort și pentru sugestiile oferite în perioada studiilor doctorale. Colegilor, le mulțumesc pentru înțelegere și ajutorul acordat de-a lungul acestor ani.

Familiei mele îi mulțumesc cu toată dragostea, pentru susținerea, suportul constant și încrederea oferite pe întreaga perioadă a studiilor și a formării mele intelectuale, profesionale și personale de până acum.

ACKNOWLEDGEMENTS

With deep gratitude, I address to the PhD coordinator, Prof. Mihai Carp-Cărare PhD, DVM, whom I thank for the guidance and support offered during the years of doctoral studies and in designing of the PhD thesis.

I thank the distinguished members of the doctoral referee committee, for their courtesy to evaluate my doctoral thesis.

To the leading board of the "Ion Ionescu de la Brad" University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi I thank for the opportunities and the academic educational context during the doctoral period.

I thank the doctoral guidance committee for the suggestions offered during the doctoral studies. I would also like to thank my colleagues for their understanding and help over these years.

My family, I thank with all my love for their constant support and trust provided throughout my studies and during my intellectual, professional and personal development so far.

REZUMAT

Cuvinte cheie:*epidemiologie, virus, Bluetongue, rumegătoare domestice,*

Prezenta teză de doctorat, intitulată „*Cercetări privind epidemio-supravegherea bolii limbii albastre(Bluetongue) în unele județe din Sud- Estul României*”,este structurată în două părți principale: **Partea I- „Stadiul actual al cunoașterii”**, care cumulează un număr de 55 pagini și cuprinde o sistematizare a informațiilor extrase din literatura de specialitate și **Partea a II-a- „Contribuții personale”**, care cuprinde un total de 136pagini, în care sunt prezentate rezultatele cercetărilor întreprinse în perioada 2014-2017.

Prima parte, „Stadiul actual al cunoașterii”, cuprinde o sistematizare a principalelor aspecte de actualitate, identificate în literatura de specialitate privind boala limbi albastre și situația epidemiologică a bolii, în Europa și România.

Primulcapitolul intitulat„*Date bibliografice privind boala limbii albastre (Bluetongue)*” prezintă cele mai importante aspecte referitoare la descrierea bolii și a agentului etiologic.

În **al doileacapitol**, intitulat „*Situația epidemiologică a bolii Bluetongue în Europa și România*”. sunt prezentate principalele efecte produse de *Bluetongue* în acest areal. *Bluetongue* a avut un impact economic semnificativ, ca urmare a efectului asupra animalelor (morbiditate, mortalitate, incapacitate de reproducere, reducerea producției de lapte, etc.) și a perturbării comerțului internațional cu animale și produse animaliere.

Partea a II-a, „Contribuții personale” este structurată în șase capitole (III – VIII), în fiecare dintre acestea fiind descrise studiile efectuate privind tema de cercetare propusă, material, metodă și rezultatele obținute, iar în ultimul capitol sunt sistematizate concluziile desprinse în urma analizei de ansamblu.

Capitolul III,„Scopul cercetărilor, obiectivele propuse și cadrul organizatoric” aflat în deschiderea părții a doua a tezei, cuprinde, conform uzanțelor, descrierea succintă a scopului și a obiectivelor urmărite cât și cadrul organizatoric în care au fost efectuate cercetările. În ultimele decenii, Europa a devenit un spațiu tot mai expus pentru *Bluetongue*. Cauzele care stau la baza propagării bolii sunt diverse și ca urmare, distribuirea a fost aproape uniformă traversând întreg continentul, ajungând inclusiv în Nordul Europei. În România, primul caz de *Bluetongue* a fost semnalat pe 22 august 2014

în județul Buzău. După prima notificare, numărul cazurilor semnalate a avut o evoluție fulminantă. Astfel, la doar 5 zile de la confirmarea primului caz, ANSVSA a confirmat la Buzău 28 de focare de infecție, fiind identificate 73 de bovine și 5 ovine cu forme clinice de *Bluetongue*. În doar 7 zile de la alertă, boala s-a extins în județele învecinate, fiind semnalate 49 de focare. Pe 4 septembrie, *Bluetongue* s-a răspândit în 12 județe, declanșând 63 de focare fiind afectate 447 de animale. Distribuția rapidă a virusului *Bluetongue* în lunile august-septembrie a fost consecința condițiilor climatice prielnice proliferării vectorilor culicoizi existenți la acea dată în regiune. În aceste condiții, posibilitatea ca virusul *Bluetongue* să persiste și să fie distribuit în toate regiunile țării, era o certitudine. Având în vedere situația epidemiologică declanșată în 2014, ne-am propus ca în perioada 2014-2017, să participăm la colectarea probelor de sânge, evaluarea și testarea de laborator a probelor prelevate, centralizarea și compararea datelor obținute la monitorizarea *Bluetongue* în Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea, trei dintre aceste județe fiind învecinate cu zona unde a evoluat primul focar de boală.

Pentru realizarea acestui deziderat, în perioada 2014-2017, s-au monitorizat patru județe din regiunea de Sud Est a României (Galați, Vrancea, Brăila, Tulcea) și au fost stabilite următoarele obiective: - supravegherea serologică a bolii limbii albastre la rumegătoare domestice; - supravegherea virusologică a bolii limbii albastre la rumegătoare domestice; - capturarea și identificarea vectorilor transmițători ai virusului *Bluetongue* și - identificarea aspectelor clinice și lezionale la rumegătoarele cu infecții specifice virusului *Bluetongue*.

Capitolul IV, denumit „Investigații privind supravegherea serologică în boala limbii albastre la rumegătoarele din regiunea de Sud-Est a României” a urmărit realizarea unor investigații epidemiologice privind incidența anticorpilor anti-*Bluetongue* în probele de ser prelevate de la rumegătoarele din cele 4 județe monitorizate. În perioada 2014-2017, în regiunea de Sud-Est a României, au fost testate serologic 12846 de animale receptive, iar incidența anticorpilor anti-BTV, a fost variabilă în funcție de perioadă și arealul geografic luat în studiu. În anul 2014, județul Vrancea a avut cea mai ridicată incidență (58,5%) a animalelor seropozitive, urmat de Galați (3,21%), Brăila (2,24%) și Tulcea (0,58%).

În anul 2015, incidența animalelor seropozitive la *Bluetongue* s-a aflat într-o ușoară regresie, diminuându-se la 32% în Vrancea, la 2,74% în Galați, și la 0% în Tulcea, cu excepția județului Brăila, unde ponderea a crescut la 6,62%.

În anul 2016, s-a remarcat județul Galați, printr-o creștere semnificativă a incidenței de la 2,74% (2015) la 15,35% (2016), comparativ cu județul Vrancea, unde incidența a scăzut semnificativ de la 32% (2015) la 10,48%, iar în județul Brăila, indicele de incidență (6,21%) a fost apropiat valoric de cel din anul anterior (6,62%).

În anul 2017, incidența animalelor seropozitive: a suferit o diminuare semnificativă de la 15,35% (2016) la 0,81% (2017) în județul Galați, de la 6,21% (2016) la 3,35% (2017) în județul Brăila, și a crescut de la 10,48% la 15,85% în județul Vrancea, iar în județul Tulcea, în acest an, nu au fost identificate animale seropozitive la virusul *Bluetongue*. Variabilitate indicelui de incidență, în cadrul monitorizării serologice,

a arătat caracterul oscilant și capacitatea de propagare a virusului în regiunea de Sud-Est a României. Monitorizarea serologică efectuată în perioada 2014-2017, la rumegătoarele domestice, a evidențiat prezența continuă a anticorpilor specifici pentru virusul *Bluetongue*, în regiunea de Sud-Est a României.

Capitolul V, intitulat „*Investigații virusologice în Bluetongue*” cuprinde datele obținute în urma efectuării examenului virusologic prin testului RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays*) în vederea identificării genomului viral la rumegătoarele domestice din cele 4 județe monitorizate și de a stabili indicele de incidență în regiunea de Sud-Est a României. În perioada 2014-2017, au fost diagnosticate 1024 animale seropozitive la *Bluetongue*, de la care s-au prelevat probe de sânge, în vederea efectuării examenului virusologic.

În **județul Vrancea**, în perioada 2014-2017, examenul virusologic a fost efectuat pe 429 probe de sânge prelevate de la animalele cu seroconversie aflate în exploatațiile santinelă și 370 de animale cu suspiciuni de boală, care au fost identificate cu anticorpi anti-BTV. Diagnosticul virusologic a confirmat prezența genomului viral la 47,83% (n=77) din probe de sânge bovin (n=161) și 50% (n=102) din probe de sânge ovin (n=204), prelevate de la animalele seropozitive cu suspiciune de boală, identificate în anul 2014. În perioada 2015-2017, nu a fost identificat genomul viral *Bluetongue* la animale seropozitive din județul Vrancea. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele și ovinele din județul Vrancea, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 179 focare de *Bluetongue* semnalate în 43 localități.

În **județul Galați**, examenul virusologic s-a efectuat pe 61 probe de sânge recoltate de la animalele santinelă cu seroconversie și 35 de animale cu suspiciuni de boală, la care s-au identificat anticorpi anti-BTV. Diagnosticul virusologic a confirmat prezența genomului viral la 50% (n=2) din probe de sânge bovin (n=4) prelevate de la animalele seropozitive cu suspiciune de boală, identificate în anul 2014. În perioada 2015-2017, nu a fost identificat genomul viral *Bluetongue* la animale seropozitive din județul Galați. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele și ovinele din județul Galați, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 2 focare de *Bluetongue*, în anul 2014.

În **județul Brăila**, examenul virusologic prin tehnica *Real-Time- RT-PCR* s-a efectuat pe 114 probe de sânge recoltate de la animalele santinelă cu seroconversie și 11 probe de sânge prelevate de la animale cu suspiciuni de boală, la care s-au identificat anticorpi anti-BTV. Diagnosticul virusologic a confirmat prezența genomului viral la 66,66% (n=2) din probe de sânge bovin (n=161) prelevate de la bovinele cu seroconversie și 100% (n=3) din probe de sânge prelevate de la bovinele seropozitive cu suspiciune de boală, identificate în anul 2014. În perioada 2015-2017, nu a fost identificat genomul viral *Bluetongue* la animale seropozitive. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovine și ovine, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 4 focare de *Bluetongue* în anul 2014.

În **județul Tulcea**, examenul virusologic s-a efectuat pe 4 probe de sânge prelevate în anul 2014 de la 2 bovine și 2 ovine cu seroconversie. Diagnosticul virusologic a confirmat prezenta genomului viral la 50% (n=1) dintre bovinele (n=2) și 50% (n=1) dintre ovinele (n=2) cu seroconversie, identificate în anul 2014. În perioada 2015-2017, nu a fost identificat genomul viral *Bluetongue* la animale seropozitive. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele și ovinele din județul Tulcea, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 2 focare de *Bluetongue*, în anul 2014.

Infecția cu virusul bolii limbii albastre nu este persistentă. Datorită caracterelor de patogenitate, infecția cu virusul *Bluetongue* poate să nu fie diagnosticată o anumită perioadă de timp, timp în care totuși boala există și evoluează, animalele infectate constituind surse de infecție pentru insectele culicoide.

În epidemiologia *Bluetongue*, bovinele au un rol deosebit de important, datorat viremiei prelungită în absența semnelor clinice ale bolii. Cu toate acestea, nu există o explicație pentru rata foarte ridicată de morbiditate la bovinele din România.

Capitolul VI, intitulat „*Investigații privind aspectele clinice și anatomopatologice în boala limbii albastre la rumegătoare domestice din regiunea de Sud-Est a României*” sunt prezentate aspectele clinice și lezionale ale infecției cu virusul *Bluetongue*, la bovinele, ovinele și caprinele din cele 4 județe monitorizate. La bovine, boala evoluează frecvent fără aspecte clinice evidente, cu excepția serotipului 8 (BTV8) care se exprimă clinic cu febră, inflamație de tip cataral sau ulcero-necrotic la nivelul mucoasei nazale, bucale și a buretului coronarian. Cu toate acestea, în România a fost identificat serotipul BTV4, care s-a manifestat clinic și lezional cu simptomatologie asemănătoare serotipului BTV8. În perioada luată în studiu (2014-2017), au fost examinate clinic 1437 de rumegătoare domestice, dintre acestea 418 (29,08%) au prezentat aspecte clinice asemănătoare celor specifice infecției cu virusul (*Bluetongue*).

Tabloul clinic în infecția cu virusul *Bluetongue*, **la bovine** a fost reprezentativ, fiind identificate următoarele semne clinice: 100% (n=209) cu hiperemia mucoasei conjunctivale, 98,56% (n=206) cu epiforă, 98,56% (n=206) cu sialoree, 97,6% (n=204) ulcerații gingivale, 95,7% (n=200) cu tumefierea și cianoza limbii, 95,7% (n=200) cu edem nazal, 90,43% (n=189) cu ulcerații ale mucoasei nazale, 88,90% (n=186) cu jetaj muco-purulent, 80,38% (n=168) necroze circumscrise, ulcerații la nivelul ugerului, 76,07% cu slăbire accentuată; 73,2% (n=153%) congestia zonei coronare, 57,9% (n=121) cu fenomene nervoase (torticolis), 48,32% (n=101) cu diaree, 45,93% (n=96) cu imobilitate, 44,01% (n= 92) cu exongulări, 13,88% (n=29) cu ulcere pe trenul posterior și 5,26% (n=11) cu avorturi.

Tabloul clinic **la ovine** a fost similar cu cel de la bovine, evoluând la 94,66 % (n=195) cu stare de prostrație, 100% (n=206) cu secreții nazale muco-purulente, 100% (n=206) cu edeme și ulcerații nazale, 97,10% (n=200) cu cianoza mucoasei bucale și 100% (n=206) cu ulcerații ale buzelor, 100% (n=206) cu ulcerații și necroze circumscrise la nivelul mucoasei bucale, 99,5% (n=205) cu sialoree, 53,4% (n=110) cu epiforă, 99,5%

(n=205) tumefierea și cianoza limbii, 96,6% (n=199) au fost în incapacitatea de a se deplasa și 64,10% (n=132) prezentau slăbire accentuată.

La caprine, infecția cu virusul *Bluetongue*, a avut o exprimare clinică redusă, fiind observate următoarele: 100% (n=3) caprine cu stare de prostrație, 100% (n=3) cu jetaj muco-purulent, 100% (n=3) cu edeme și ulcerații nazale, 66,6% (n=3) cu cianoza mucoasei bucale și 100% (n=3) cu șchiopături.

Tabloul lezional a fost descris doar la bovinele sacrificate de necesitate, unde incidența leziunilor a variat în funcție de evoluția clinică: la 100 % (n=8) s-au identificat peteșii extinse la nivelul țesutului conjunctiv subcutanat, 75% (n=6) au fost cu congestii și hemoragii la nivelul pilierului anterior al rumenului, 100% (n=8) au fost cu hipertrofie splenică, 87,5% (n=7) au fost cu hemoragii multifocale splenice și 100% cu hemoragii la baza arterei pulmonare, 87,5% (n=7) cu congestia, edemul și cianoza laringelui și faringelui și 75% (n=6) prezentau edem pulmonar și spumozități traheo-bronșice.

Corelând rezultatele epidemiologice obținute prin investigațiile serologice, virusologice și entomologice, putem conchide faptul că virusul *Bluetongue* se găsește într-o stare latentă, care nu a permis identificarea sa în perioada 2015-2017, dar care se poate reactiva sub influența principalilor factori predispozanți: prezența insectelor vectoriale din genul *Culicoides* și creșterea populației de animale receptive.

Capitolul VII, intitulat „*Investigații privind supravegherea entomologică a vectorilor transmițători ai virusului Bluetongue*” cuprinde date obținute în urma monitorizării entomologice, având ca obiective: stabilirea prezenței și evaluarea incidenței insectelor *Culicoides*, identificarea speciilor de culicoide vectoriale și determinarea perioadei de activitate a insectelor culicoide vectoriale în arealul studiat. Județele monitorizate dețin forme variate de relief atât din punct de vedere al altitudinii cât și al formei, cu numeroase rezervații naturale unde flora și fauna crează habitate complexe pentru supraviețuirea și înmulțirea insectelor vectoriale.

În județul **Vrancea** au fost identificate insecte hematofage din complexul *C. obsoletus* și complexul *C. pulicaris*, considerate vectori pentru transmiterea bolii limbii albastre. În **anul 2014**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **1,76 %** (n=8), dintre acestea 37,50% (n=3) au fost *C. obsoletus* și 62,50% (n=8) *C. pulicaris*., iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în septembrie-octombrie la valori termice cuprinse între 6°C și 12°C pentru *C. pulicaris* și 7°C- 12°C pentru *C. obsoletus*. În **anul 2015**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **13,54%** (n=765) iar dintre acestea 79,95% (n=604) au fost *C. obsoletus*, 12,02% (n=161) *C. pulicaris*. și 9,02% (n=69) au fost culicoide non-vectoriale. Activitatea vectorială a speciei *C. obsoletus* a fost semnalată în perioada mai - septembrie, la valori termice cuprinse între 15°C și 33°C iar pentru *C. pulicaris*, activitatea s-a desfășurat la valori termice cuprinse între 12°C și 23°C În **anul 2016**, incidența insectelor culicoide a fost de **15,38%** (n=1182), iar dintre acestea: 61,50% (n=727) au fost *C. obsoletus* și 38,50% (n=455) *C. pulicaris*, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada aprilie - septembrie, la valori termice cuprinse între 7°C și 36°C pentru *C. obsoletus* și 7°C și 32°C pentru *C. pulicaris*. În **anul 2017**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **0,56%** (n=8) iar dintre acestea 50%

(n=4) au fost *C.obsoletus* și 50% (n=4) au fost *C.pulicaris*., iar activitatea vectorială a culicoidelor *C. obsoletus* și *C. pulicaris*. a fost semnalată în perioada iulie- septembrie, la valori termice cuprinse între 19°C și 34°C.

În județul **Brăila** au fost identificate insecte hematofage din complexul *C. obsoletus*, complexul *C.pulicaris*, și *C.nubeculosus*, considerate vectori pentru transmiterea bolii limbii albastre, cu o incidență diferită în funcție de ani.În **anul 2014**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **4.16 %** (n=175), dintre acestea 45,71% (n=80) *C. obsoletus*, 20,57% (n=36) *C.pulicaris* , 8,57%(n=15) *C.nubeculosus* și 22,14% (n=44) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în august-noiembrie la valori termice cuprinse între 3°C și 31°C pentru *C. obsoletus* , în aprilie-septembrie la valori termice cuprinse între 11°C- 30°C pentru *C. pulicaris* și în septembrie-noiembrie la valori termice cuprinse între 3°C și 30°C.În **anul 2015**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **1,61%** (n=641) iar dintre acestea 26,83% (n=172) au fost *C. obsoletus*, 72,38% (n=464) *C.pulicaris*, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada aprilie- septembrie, la valori termice cuprinse între 8°C și 34°C pentru *C. obsoletus* și în perioada aprilie-noiembrie la valori termice cuprinse între 5°C și 34°C pentru *C. pulicaris*. În **anul 2016**, incidența insectelor culicoide a fost de **4,15%** (n=1182), iar dintre acestea: 21,25%(n=112) *C. obsoletus*, 77,22% (n=407) *C.pulicaris*și 1,51% (n=8) au fost specii de *Culicoides*„non-vectoriale”; iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada mai- septembrie, la valori termice cuprinse între 7°C și 34°C pentru *C. pulicaris*, în perioada iunie-septembrie când valorile termice au fost cuprinse între 7°C și 34°C pentru *C. obsoletus* și în lunile iunie-iulie la valori termice cuprinse între 13°C și 33°C *Culicoides*„non-vectoriale”. În **anul 2017**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **1,33%** (n=62), iar dintre acestea 40,32% (n=25)*C.obsoletus* și 59,68% (n=37) *C.pulicaris*, iar activitatea vectorială a culicoidelor *C. obsoletus*și *C. pulicaris* a fost semnalată în perioada mai- octombrie, la valori termice cuprinse între 11°C și 36°C.

În județul **Galați** au fost identificate insecte hematofage din complexul *C. obsoletus*,complexul *C.pulicaris*, și *C.nubeculosus*, considerate vectori pentru transmiterea bolii limbii albastre.În **anul 2014**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **7,73 %** (n=249), dintre acestea 84,33% (n=210) au fost *C. obsoletus*, 10,84% (n=27) *C.pulicaris*, 2,83%(n=7) *C.nubeculosus* și 2,0% (n=5) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată: în luna aprilie, la valori termice cuprinse între 11°C și 20°C pentru *C. pulicaris*, în luna septembrie la valori termice cuprinse între 17°C- 29°C pentru *C. obsoletus*, în lunile aprilie și noiembrie la valori termice cuprinse între 3°C și 30°C pentru *C. nubeculosus*.În **anul 2015**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **0,93** (n=165), iar dintre acestea 99,40% (n=164) au fost *C. pulicaris*, 0,6% (n=1) *C.obsoletus*iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată doar în luna aprilie, la valori termice cuprinse între 5°C și 18°C pentru *C. obsoletus* și în perioada aprilie-octombrie la valori termice cuprinse între 5°C și 33°C pentru *C. pulicaris*. În **anul 2016**, incidența insectelor culicoide a fost de **6,04%** (n=732), iar dintre acestea: 60,24%(n=441) *C. obsoletus*, 39,30%(n=287) *C.pulicaris*și 0,55% (n=4) *C.nubeculosus*iar

activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada aprilie-noiembrie la valori termice cuprinse între 10°C și 28°C pentru *C. pulicaris*, în perioada iunie-august când valorile termice au fost cuprinse între 14°C și 28°C pentru *C. obsoletus* și în luna iulie la valori termice cuprinse între 21°C și 28°C pentru *C. nubeculosus*. În anul 2017, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **14,81%** (n=1050) iar dintre acestea 99,14% (n=1041) au fost *C. obsoletus* și 0,85% (n=36) *C. pulicaris*, iar activitatea vectorială a culicoidelor *C. pulicaris* a fost semnalată în luna mai- când valori termice au fost cuprinse între 13°C și 19°C și în perioada august-octombrie când valori termice au fost cuprinse între 6°C și 28°C, iar *C. obsoletus* și-a desfășurat activitatea vectorială în iulie-august când valorile termice au fost cuprinse între 11 și 28 °C. Analiza statistică arată tendința de creștere a densității culicoidelor în teritoriul județului Galați. *C. obsoletus* și *C. pulicaris* sunt constant într-o relație de coabitare fiind principalele specii vectoriale prezente în județul Galați.

În județul **Tulcea** au fost identificate insecte hematofage din complexul *C. obsoletus*, *C. pulicaris* considerate vectori pentru transmiterea bolii limbii albastre. În anul 2014, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **13,54 %** (n=1197), dintre acestea 64,66% (n=774) au fost *C. obsoletus*, 25,30% (n=303) *C. pulicaris* și 10,2% (n=120) specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată: în luna aprilie până în octombrie, la valori termice cuprinse între 8°C și 34°C pentru *C. obsoletus*, în perioada mai iulie și septembrie-octombrie când valori termice au fost cuprinse între 14°C- 29°C pentru *C. pulicaris*. În anul 2015, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **21,25** (n=2056) iar dintre acestea 71,30% (n=1466) au fost *C. obsoletus*, 13,13%% (n=270) *C. obsoletus* și 15,56% (n=320) specii de *Culicoides* „non-vectoriale”. Activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada aprilie-noiembrie, la valori termice cuprinse între 7°C și 34°C pentru *C. obsoletus* și în perioada aprilie-septembrie la valori termice cuprinse între 8°C și 34°C pentru *C. pulicaris*. În anul 2016, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **12,26%** (n=1865), iar dintre acestea: 62,14%(n=1159) au aparținut speciei *C. obsoletus*, **27,30%**(n=509) *C. pulicaris* și 10,56% (n=197) specii de *Culicoides* „non-vectoriale”. Activitatea vectorială a speciei *C. obsoletus* a fost semnalată în perioada mai-octombrie când valorile termice au fost cuprinse între 8°C -34°C. Activitatea vectorială a speciei *C. pulicaris* a fost identificată în perioada mai-septembrie, când valorile termice au fost cuprinse între 12°C și 34°C.

În anul 2017, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **9,86%** (n=1105), iar dintre acestea 60,82% (n=672) au fost *C. obsoletus*, 21,26% (n=235) *C. pulicaris* și 17,92% (n=198) specii de *Culicoides* „non-vectoriale”. Activitatea vectorială a culicoidelor *C. obsoletus* a fost semnalată în luna mai-octombrie când valori termice au fost cuprinse între 10°C -35°C și 12°C -35°C. pentru *C. pulicaris*. Analiza statistică efectuată pentru perioada 2014-2017, arată tendința de descreștere a densității culicoidelor în teritoriul județului Tulcea. Condițiile topo-geo-climatice ale județului Tulcea sunt favorizante pentru apariția unor noi specii vectoriale din genul *Culicoides*.

Analiza incidenței vectoriale, raportată la numărul de insecte capturate în toată perioada luată în studiu (2014-2017), a arătat că Tulcea a fost teritoriul cu cea mai mare

densitate de insecte culicoide (13,85%), urmată de Vrancea (12,9%), Galați (5,48%) și Brăila (2,3%).

Fenomenul de încălzire globală a condus la creșterea temperaturilor multianuale și la extinderea arealului culicoizilor în România, iar condițiile topo-geo-climaterice din județele Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea oferă regiunii caracterul de focalitate naturală.

În **capitolul VIII**, intitulat „**Concluzii finale și recomandări**” sunt însumate principalele concluzii desprinse din investigațiile seroepidemiologice, virusologice, entomologice, clinice și anatomopatologice efectuate. Având în vedere riscul crescut de producere a unor noi focare de *Bluetongue* în regiunea de Sud Est a României și efectele economice generate de această boală, au fost formulate 6 recomandări ce pot fi susținute pe termen lung.

SUMMARY

Key words: *epidemiology, virus, bluetongue, domestic ruminants,*

The PhD thesis, entitled "**Research on epidemic surveillance of bluetongue disease (Bluetongue) in some counties from South-East Romania**", is structured in two main parts. **Part I**, "*The current state of knowledge*", extended on 55 pages, represents a synthesis of the information extracted from the literature on the paper topic. **Part II**, "**Personal contributions**", which comprises a total of 136 pages, presents the results of the research undertaken during the doctoral studies.

The first part, "*The current state of knowledge*" is a synthetic review of the current issues regarding *Bluetongue* disease and an updated epidemiological situation of the disease, in Europe and Romania.

The first chapter entitled "**Bibliography data on Bluetongue disease**" presents the most important aspects regarding the description and etiology of the disease.

In the **second chapter**, entitled "**The epidemiological situation of Bluetongue disease in Europe and Romania**" the main effects produced by *Bluetongue* in Europe and Romania are presented. *Bluetongue* has a significant economic impact, mainly due to the effect of the disease on animals (morbidity, mortality, insufficient reproduction, decreasing of milk production and weight gain) and, in particular, disruption of international trade in animals and animal products.

Part II, "**Personal contributions**", is structured in six chapters (III - VIII), each one of them comprising the detailed studies performed on the proposed research topic, materials, methods and the results obtained. In the last chapter the general conclusions detached from the overall analysis are systematized.

Chapter III presents the "**Purpose of the research, objectives and organizational framework**". In the last decades, Europe has become an increasingly exposed space for *Bluetongue*. The causes underlying the spread of the disease are diverse and, as a result, the distribution was almost uniform across the continent, reaching even in Northern Europe. In Romania, the first case of *Bluetongue* was reported on August 22, 2014 in Buzău County. After the first notification, the number of reported cases showed a fast evolution. Thus, just 5 days after the confirmation of the first case, ANSVSA confirmed the evolution of 28 outbreaks in Buzău, 73 cattle and 5 sheep with clinical forms of

Bluetongue being involved. In just 7 days after the alert, the disease spread to neighboring counties, with 49 outbreaks reported. On September 4, *Bluetongue* spread to 12 counties, triggering 63 outbreaks of disease and 447 affected animals. The fast distribution of the *Bluetongue* virus in August-September was the consequence of the favorable climatic conditions for the proliferation of the culicoid vectors existing at that time in the region. In these circumstances, the possibility that the *Bluetongue* virus could persist and spread in all regions of the country was a certainty. In order to achieve the epidemiological situation that started in 2014, we set out to participate at the blood samples harvesting, the evaluation and laboratory testing of the samples, the centralization and analysis of the data obtained by surveillance of *Bluetongue* in Vrancea, Galați, Brăila and Tulcea, during 2014-2017, three of these counties being adjacent to the area where the first outbreak of disease evolved.

In order to achieve this goal, during the mentioned periode, the four counties from the South-East region of Romania were monitored and the following objectives were established: serological surveillance of the *Bluetongue* disease in domestic ruminants; virological surveillance of *Bluetongue* disease in domestic ruminants; capture and identification of the *Bluetongue* virus transmitting vectors and evaluation of the clinical and lesional aspects that have evolved in ruminants with *Bluetongue* virus infections.

Chapter IV, entitled "*Investigations regarding the serological surveillance in the Bluetongue disease in ruminants in the South-East region of Romania*" aimed to carry out epidemiological investigations regarding the incidence of *Bluetongue* virus (BTV) antibodies in the serum samples obtained from the ruminants from the 4 monitored counties. During 2014-2017, in the South-East region of Romania 12846 receptive animals tested by serological methods revealed a variable incidence of BTV antibodies according to the period and the geographical area. In 2014, Vrancea County had the highest incidence (58.5%) of seropositive animals, followed by Galați (3.21%), Brăila (2.24%) and Tulcea (0.58%).

In 2015, the incidence of positive *Bluetongue* animals was in a slight regression, decreasing to 32% in Vrancea, 2.74% in Galați, and 0% in Tulcea, except for Brăila county, where the share increased to 6.62%.

In 2016, Galați County was noted with a significant increase in the incidence from 2.74% (2015) to 15.35% (2016), compared to Vrancea County, where the incidence has decreased significantly from 32% (2015) at 10.48%, and in Brăila County, the incidence index (6.21%) was close in value to the previous year (6.62%).

In 2017, the incidence of seropositive animals suffered a significant decrease from 15.35% (2016) to 0.81% (2017) in Galați County, from 6.21% (2016) to 3.35% (2017) in Brăila County, and the incidence increased from 10.48% to 15.85% in Vrancea County. In Tulcea County, this year, no seropositive animals were identified for *Bluetongue* virus. The variability of the incidence index, within the serological monitoring, showed an oscillating character and the ability of the virus for propagation in the South-East region of Romania. Serological monitoring performed in domestic ruminants between 2014-

2017 revealed the continuous presence of specific antibodies for the *Bluetongue* virus in this region.

Chapter V, entitled "***Virological investigations in Bluetongue***" contains the data obtained following the virological examination by the *Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays* (RT-PCR) in order to identify the viral genome in the domestic ruminants from the 4 target counties and to establish the index of incidence in the South-East region of Romania. During 2014-2017, 1024 seropositive animals were diagnosed with *Bluetongue* and the blood samples were submitted to virological examination.

In **Vrancea County**, between 2014 and 2017, the virological examination was performed on blood samples harvested from 429 seroconversion animals from the sentinel farms and 370 animals suspected of *Bluetongue*. In 2014, the tests confirmed the presence of the viral genome in 47.83% ($n = 77$) bovine blood samples ($n = 161$) and 50% ($n = 102$) of sheep blood samples ($n = 204$), taken from animals seropositive with suspected disease. Between 2015 and 2017, the *Bluetongue* viral genome was not identified in seropositive animals from Vrancea County. Confirmation of the presence of *Bluetongue* virus in cattle and sheep, correlated with the results of entomological surveillance in the area of this county, led to the declaration of 179 *Bluetongue* outbreaks reported in 43 localities from Vrancea county.

In **Galați County**, the virological examination was performed on blood samples collected from 61 seroconversion sentinel animals and 35 animals suspected of *Bluetongue*, with positive BTV antibodies. Virological diagnosis confirmed the presence of the viral genome in 50% ($n = 2$) of bovine blood samples ($n = 4$) taken from seropositive animals with suspected disease, identified in 2014. During 2015-2017, *Bluetongue* viral genome was not identified in seropositive animals from Galați County. Confirmation of the presence of *Bluetongue* virus in cattle and sheep, correlated with the results of entomological surveillance in the area, led to the declaration of 2 *Bluetongue* outbreaks, in Galați County, in 2014.

In **Brăila county**, the virological examination by Real-Time-RT-PCR technique was performed on blood samples collected from 114 seroconversion sentinel animals and 11 animals suspected of *Bluetongue*, with positive BTV antibodies. Virological diagnosis confirmed the presence of the viral genome in 66.66% ($n = 2$) of bovine blood samples ($n = 161$) from seroconversion cattle and 100% ($n = 3$) of blood samples from seropositive cattle with suspected disease, identified in 2014. Between 2015 and 2017, the *Bluetongue* viral genome was not identified in seropositive animals from Brăila county. Confirmation of the presence of *Bluetongue* virus in cattle and sheep, correlated with the results of entomological surveillance in the area, led to the declaration of 4 *Bluetongue* outbreaks in 2014.

In **Tulcea county**, in 2014, the virological examination was performed on 4 blood samples harvested from 2 bovine and 2 sheep with seroconversion. Virological diagnosis confirmed the presence of the viral genome in 50% ($n = 1$) of cattle ($n = 2$) and 50% ($n = 1$) of sheep ($n = 2$) with seroconversion. During 2015-2017, *Bluetongue* viral genome was not identified in seropositive animals. Confirmation of the presence of *Bluetongue* virus in

cattle and sheep, correlated with the results of entomological surveillance in the area, led to the declaration of 2 *Bluetongue* outbreaks, in 2014.

The infection with the *Bluetongue* virus is not persistent. Due to their pathogenicity, the infection with *Bluetongue* virus may not be diagnosed for a certain period of time, but meanwhile the disease is still present and evolves and the infected animals are sources of infection for the culicoid insects.

In *Bluetongue* epidemiology, cattle play a particularly important role, due to prolonged viremia in the absence of clinical signs of the disease. However, there is no explanation for the very high morbidity rate in cattle in Romania.

Chapter VI, entitled "*Investigations on the clinical and anatomopathological aspects of the Bluetongue disease in the domestic ruminants in the South-East region of Romania*", presents the clinical and lesional aspects of the infection with the *Bluetongue* virus, in the cattle, sheep and goats from the 4 monitored counties. In cattle, the disease evolves frequently without obvious clinical features, with the exception of serotype 8 (BTV8) infection which is clinically expressed with fever, cataract or ulcero necrotic inflammation in the nasal, oral and coronary mucosa. However, in Romania the BTV4 serotype was identified, clinically and lesionally expressed as the BTV8 serotype. During the research periode, 1437 domestic ruminants were clinically examined, 418 (29.08%) showing symptoms similar to those specific to the *Bluetongue*virus infection.

The clinical picture in *Bluetongue* virus infection **in cattle** was representative: 100% (n = 209) with conjunctival mucosal hyperemia, 98.56% (n = 206) with epiphora, 98.56% (n = 206) with sialorrhea, 97.6% (n = 204) gingival ulcerations, 95.7% (n = 200) with swelling and cyanosis of the tongue, 95.7% (n = 200) with nasal edema, 90.43% (n = 189) with ulcers of the nasal mucosa, 88.90% (n = 186) with muco-purulent discharge, 80.38% (n = 168) circumscribed necrosis, ulcers in the uterus, 76.07% with marked weakening, 73.2% (n = 153%) congestion of the coronary area, 57.9% (n = 121) with nervous phenomena (torticollis), 48.32% (n = 101) with diarrhea, 45.93% (n = 96) with immobility, 44.01% (n = 92) with exongulation, 13.88% (n = 29) with ulcers on the posterior areas and 5.26% (n = 11) with abortions.

The clinical picture in **sheep** was similar to that in cattle, evolving to 94.66% (n = 195) with prostration, 100% (n = 206) with muco-purulent nasal secretions, 100% (n = 206) with edema and nasal ulceration, 97.10% (n = 200) with cyanosis of the oral mucosa, 100% (n = 206) with ulceration of the lips, 100% (n = 206) with ulcers and necrosis circumscribed in the oral mucosa, 99.5% (n = 205) with sialoree, 53.4% (n = 110) with epiphora, 99.5% (n = 205) swelling and cyanosis of the tongue, 96.6% (n = 199) were incapacitated and 64.10% (n = 132) showed marked weakness.

Infection with the *Bluetongue* virus **in goats** had a reduced clinical expression, the following being observed: 100% (n = 3) with prostration, 100% (n = 3) with muco-purulent discharge, 100% (n = 3) with edema and nasal ulceration, 66.6% (n = 3) with oral mucosal cyanosis and 100% (n = 3) with lameness.

The lesion picture was described only in bovines slaughtered by necessity, where the incidence of the aspects varied according to the clinical evolution: in 100% (n = 8)

bovine animals, enlarged petechiae were identified in the subcutaneous connective tissue, 75% (n = 6) presented congestion and bleeding at the anterior pillar of the rumen, 100% (n = 8) showed splenic hypertrophy, 87.5% (n = 7) with splenic multifocal hemorrhages and arterial pulmonary hemorrhage. In 87.5% (n = 7) congestion, edema and cyanosis of the larynx and pharynx were observed and 75% (n = 6) of animals showed pulmonary edema and tracheo-bronchial foam.

Correlating the epidemiological results obtained by the serological, virological and entomological investigations, we can conclude that the *Bluetongue* virus is in a latent state, which did not allow its identification during 2015-2017. In the same time the BTV can be reactivated under the influence of predisposing factors: the presence of vector insects from genus *Culicoides* and increasing number of the receptive animals.

Chapter VII, entitled "*Investigations regarding the entomological surveillance of the Bluetongue virus transmitting vectors*" presents data obtained from the entomological monitoring, that followed some objectives: evaluation of presence and incidence of *Culicoides* insects, identification of the culicoid species and the evaluation of the vector activity in the studied area. Because the monitored counties have various relief forms, both in terms of altitude and shape, with numerous natural reserves, flora and fauna create complex habitats for the survival and propagation of these vector insects.

In **Vrancea County**, hematophagous insects from *C. obsoletus* complex and *C. pulicaris* complex were identified, considered vectors for the transmission of the *Bluetongue* disease. **In 2014**, the incidence of *Culicoides* insects was 1.76% (n = 8), from which 37.50% (n = 3) were *C. obsoletus* and 62.50% (n = 8) were *C. pulicaris*. Vector activity was reported in September-October at thermal values between 6°C and 12°C for *C. pulicaris* and 7°C-12°C for *C. obsoletus*. **In 2015**, the incidence of *Culicoides* insects was 13.54% (n = 765); 79.95% (n = 604) were *C. obsoletus*, 12.02% (n = 161) were *C. pulicaris*. and 9.02% (n = 69) were non-vector culicoids. Vector activity of the culicoids was reported between May and September, at thermal values between 15°C and 33°C for *C. obsoletus* and 12°C and 23°C for *C. pulicaris*. **In 2016**, the incidence of culicoid insects was 15.38% (n = 1182). Of these, 61.50% (n = 727) were *C. obsoletus* and 38.50% (n = 455) were *C. pulicaris*. Vector activity of the culicoids was reported between April and September, at thermal values between 7°C and 36°C for *C. obsoletus* and 7°C and 32°C for *C. pulicaris*. **In 2017**, the incidence of *Culicoides* insects was 0.56% (n = 8) and of these 50% (n = 4) were *C. obsoletus* and 50% (n = 4) were *C. pulicaris*. Vector activity of the *C. obsoletus* and *C. pulicaris* culicoids was reported during July - September, at thermal values between 19°C and 34°C.

In **Brăila county**, hematophagous insects from *C. obsoletus* complex, *C. pulicaris* complex, and *C. nubeculosus* were identified and considered vectors for the transmission of the *Bluetongue* disease, with different incidence depending on the years. In 2014, the incidence of *Culicoides* insects was 4.16% (n = 175), from which 45.71% (n = 80) were *C. obsoletus*, 20.57% (n = 36) were *C. pulicaris*, 8.57% (n = 15) were *C. nubeculosus* and 22.14% (n = 44) were "non-vector" *Culicoides* species. Vector activity of the culicoids was reported in August-November at thermal values. between 3°C and 31°C, for *C.*

obsoletus, in April-September at thermal values between 11°C-30°C; for *C. pulicaris*, in September-November at thermal values between 3°C and 30°C. In 2015, the incidence of *Culicoides* insects was 1.61% (n = 641) and 26.83% (n = 172) were *C. obsoletus*, 72.38% (n = 464) were *C. pulicaris*. Vector activity of the culicoids was reported during April-September, at thermal values between 8°C and 34°C for *C. obsoletus* and during April-November at thermal values between 5°C and 34°C for *C. pulicaris*. In 2016, the incidence of culicoid insects was 4.15% (n = 1182), and of these, 21.25% (n = 112) were *C. obsoletus*, 77.22% (n = 407) were *C. pulicaris* and 1.51% (n = 8) were "non-vector" *Culicoides* species. Vector activity of the culicoids was reported during May-September, at thermal values between 7°C and 34°C for *C. pulicaris*, during June -September when the thermal values were between 7°C and 34°C for *C. obsoletus* and in June-July at the thermal values between 13°C and 33°C "non-vector" *Culicoides*. In 2017, the incidence of *Culicoides* insects was 1.33% (n = 62) and 40.32% (n = 25) were *C. obsoletus*, 59.68% (n = 37) were *C. pulicaris* and the vector activity of the *C. obsoletus* and *C. pulicaris* culicoids was reported during the period May-October, at thermal values between 11°C and 36°C.

In Galați County, hematophagous insects from *C. obsoletus* complex, *C. pulicaris* complex, and *C. nubeculosus* have been identified as vectors for the transmission of the *Bluetongue* disease. In 2014, the incidence of *Culicoides* insects was 7.73% (n = 249), of which 84.33% (n = 210) were *C. obsoletus*, 10.84% (n = 27) were *C. pulicaris*, 2.83% (n = 7) were *C. nubeculosus* and 2.0% (n = 5) were "non-vector" *Culicoides* species. Vector activity of the culicoids was reported in April, at thermal values between 11°C and 20°C for *C. pulicaris*, in September at thermal values between 17°C and 29°C for *C. obsoletus*, in April and November at thermal values between 3°C and 30°C for *C. nubeculosus*. In 2015, the incidence of *Culicoides* insects was 0.93% (n = 165) and 99.40% (n = 164) were *C. pulicaris*, 0.6% (n = 1) were *C. obsoletus*. Vector activity of the culicoids was reported only in April, at thermal values between 5°C and 18°C for *C. obsoletus* and in April-October with thermal values between 5°C and 33°C for *C. pulicaris*. In 2016, the incidence of culicoid insects was 6.04% (n = 732), and of these 60.24% (n = 441) were *C. obsoletus*, 39.30% (n = 287) were *C. pulicaris* and 0.55% (n = 4) were *C. nubeculosus*. Vector activity of the culicoids was reported during April-November at thermal values between 10°C and 28°C for *C. pulicaris*, during June-August when the thermal values were between 14°C and 28°C for *C. obsoletus* and in July at thermal values between 21°C and 28°C for *C. nubeculosus*.

In **2017**, the incidence of *Culicoides* insects was 14.81% (n = 1050) and of these 99.14% (n = 1041) were *C. obsoletus* and 0.85% (n = 36) were *C. pulicaris*. Vector activity of the *C. pulicaris* culicoids was reported in May when thermal values were between 13°C and 19°C and during August-October when the thermal values were between 6°C and 28°C. *C. obsoletus* carried out its vector activity in July-August when the thermal values were between 11°C and 28°C. The statistical analysis shows the tendency to increase the density of culicoids in Galați County area. *C. obsoletus* and *C. pulicaris* are

constantly in a cohabitation relationship, being the main vector species present in Galați County.

In **Tulcea County**, hematophagous insects from *C. obsoletus* complex and *C. pulicaris* were identified as vectors for the transmission of the *Bluetongue* disease. In 2014, the incidence of *Culicoides* insects was 13.54% (n = 1197), of which 64.66% (n = 774) were *C. obsoletus*, 25.30% (n = 303) were *C. pulicaris* and 10.2% (n = 120) were "non-vector" *Culicoides* species. Vector activity of the culicoids was reported from April to October, at thermal values between 8°C and 34°C for *C. obsoletus*, between July and September-October when thermal values were between 14°C and 29°C for *C. pulicaris*. In 2015, the incidence of *Culicoides* insects was 21.25 (n = 2056) and of these 71.30% (n = 1466) were *C. obsoletus*, 13.13 % (n = 270) were *C. obsoletus* and 15.56% (n = 320) were "non-vector" *Culicoides* species. Vector activity of the culicoids was reported during April-November, at thermal values between 7°C and 34°C for *C. obsoletus* and during April-September at thermal values between 8°C and 34°C for *C. pulicaris*.

In **2016**, the incidence of *Culicoides* insects was 12.26% (n = 1865), and of these 62.14% (n = 1159) were *C. obsoletus*, 27.30% (n = 509) were *C. pulicaris* and 10.56% (n = 197) were "non-vector" *Culicoides* species. The vector activity of the species *C. obsoletus* was reported during the period May-October when the thermal values were between 8°C and 34°C, The vector activity of the species *C. pulicaris* was identified during the period May-September, when the thermal values were between 12°C and 34°C. In **2017**, the incidence of *Culicoides* insects was 9.86% (n = 1105) and of these 60.82% (n = 672) were *C. obsoletus*, 21.26% (n = 235) were *C. pulicaris* and 17.92% (n = 198) were "non-vector" *Culicoides* species. Vector activity of *C. obsoletus* culicoids was reported in May-October when thermal values were between 10°C and 35°C and 12°C - 35°C for *C. pulicaris*. The statistical analysis performed during 2014-2017, showed the tendency of decreasing the density of the culicoids on the territory of Tulcea county. The topo-geo-climatic conditions of Tulcea County are favorable for the emergence of new vector species of the genus *Culicoides*.

Analysis of the vector incidence, related to the number of insects captured during the entire research period (2014-2017), showed that Tulcea was the territory with the highest density of culicoid insects (13.85%), followed by Vrancea (12, 9%), Galați (5.48%) and Brăila (2.3%).

The global warming phenomenon has led to the increase of multiannual temperatures and to the extension of the *Culicoides* area in România. In the same time topo-geo-climatic conditions in Vrancea, Galați, Brăila and Tulcea counties offer the region a natural focal character.

In **chapter VIII**, entitled „*Final conclusions and Recommendations*” entitled the main conclusions drawn from the seroepidemiological, virological, entomological, clinical and anatomopathological investigations are summarized. Considering the increased risk of producing new *Bluetongue* outbreaks in the South-East region of Romania and the economic effects generated by this disease, six recommendations that can be sustained in the long term have been formulated.

PARTEA I
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

PART I
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL I

DATE BIBLIOGRAFIE PRIVIND BLUETONGUE

CHAPTER I

BIBLIOGRAPHIC DATA ON BLUETONGUE DISEASE

Potrivit Organizației Mondiale pentru Sănătatea Animală (OIE), febra catarală ovină sau boala limbii albastre (*Bluetongue*) este o boală infecțioasă, necontagioasă care poate afecta rumegătoarele domestice (ovine, caprine, bovine, bivoli) sau sălbătice. Boala nu afectează oamenii și nu se transmite prin consumul de lapte sau carnea animalelor bolnave, dar are importante implicații economice.

1.1. Istoricul și importanța bolii limbii albastre

Boala limbii albastre are o importanță considerabilă socio-economică în domeniul comerțului internațional de animale și produse de origine animală, în condițiile în care, înainte de 1998, a fost considerată o boală exotică în Europa, situație care, între timp, s-a schimbat.

1.1.1. Istoric

Boala limbii albastre a fost cunoscută pentru prima dată, în Africa de Sud, unde a evoluat endemic la rumegătoarele sălbătice (Verwoerd, Erasmus, 2004).

Primul raport oficial cu privire la *Bluetongue* a fost semnalat la sfârșitul secolului al XVIII-lea, ca urmare a importului de ovine Merinos din Europa, în provincia pe Cape din Africa de Sud. Boala a fost denumită inițial "febră" sau "*catarrh epizootic*", dar mai târziu a fost menționată ca "febra catarală a oilor", datorită convingerii greșite că boala a fost cauzată de un parazit intracelular (Hutcheon, 1881; Hutcheon, 1902, Dungu, ș.a., 2004).

Mai târziu, în 1905, boala a fost redenumită "boala limbii albastre", cu referire la limbile cianotice caracteristice, observate ocazional la oile infectate (Spreull, 1905; Dungu, ș.a., 2004).

În 1906, Sir Arnold Theiler a demonstrat că agentul etiologic al bolii limbii albastre, ar putea fi trecut printr-un filtru, indicând astfel că boala a fost cauzată de un virus (Theiler, 1906; Dungu, ș.a., 2004, Răpunteanu ș.a., 2014).

Theiler a introdus, de asemenea, primul vaccin împotriva *Bluetongue*, produs dintr-o singură tulpină de virus (BTV-4) atenuată prin trecerea în serie pe oi. Acest

vaccina indus o protecție încrucișată remarcabilă pentru alte serotipuri și a fost folosit de fermierii de ovine din Africa de Sud timp de peste 40 de ani (Theiler, 1908; Dungu, ș.a., 2004).

Analiza circumstanțelor în care a apărut boala și rezultatele obținute prin evitarea expunerii nocturne a animalelor sensibile precum și apariția sezonieră a bolii au dus la ipoteza implicării unor vectori. Prin urmare, în zona unde a evoluat boala, Du Toit (1944) capturează insecte din genul *Culicoides*, din care prepară broiaje pe care le inoculează la animalele receptive și reproduce boala după o anumită perioadă de incubare (Du Toit, 1944; Dungu ș.a., 2004).

Prepararea unui vaccin cu tulpina Theiler și eșecul constant al vaccinării a determinat-o pe Neitz (1948) să continue cercetările. În urma studiului experimental, s-a constatat faptul că animalele vaccinate au manifestat imunitate protectoare pe parcursul întregii vieți față de tulpina vaccinală și parțială față de alte infecții, ceea ce a dus la ipoteza pluralității tulpinilor de virus *Bluetongue* (Neitz, 1948; Dungu, ș.a., 2004). Aceste constatări au dus la primele studii privind serotipizarea tulpinilor virale *Bluetongue*.

Diversitatea antigenică a tulpinilor virale izolate combinată cu izolarea pe culturi celulare a dus la apariția primelor vaccinuri pentavalente care și-au demonstrat eficacitatea pentru specia ovină (Alexander și Gaig, 1951; Dunguș.a., 2004). Acestea sunt folosite și la ora actuală pentru imunizarea ovinelor din Africa de Sud (Dunguș.a., 2004).

În anul 1940, febra catarală ovină, considerată o boală specifică zonei de Sud a Africii, a fost recunoscută și în alte regiuni geografice ale continentului african (Gibbs ș.a., 1994)

În scurt timp, a fost declarat primul focar de boală care a evoluat în afara Africii și care s-a manifestat în 1943, în Cipru (Gambles, 1949; Dunguș.a., 2004).

Infecția cu virusul *Bluetongue* (BTV) evoluează la nivel mondial, în aceleași zone în care sunt prezenți și vectorii, respectiv zone delimitate de paralelele de 55°N și 35°S (Baranguță, 2010).

Începând cu această perioadă, virusul s-a propagat constant către alte regiuni geografice: în California (1952), Peninsula Iberică (1957), Australia (1976), etc. (Hardy ș.a., 1952; Manso-Ribeiro ș.a., 1957; Kirkland, 2004).

Ulterior, virusul *Bluetongue* și-a făcut simțită prezența în tot mai multe regiuni din Africa, America, Orientul Mijlociu, subcontinentul indian, China, Asia de Sud-Est, Australia de Nord și Europa și se crede că doar Antarctica este în prezent indemnă de *Bluetongue*.

Distribuția și prevalența infecțiilor produse de virusul *Bluetongue* în aceste regiuni sunt influențate de climă, altitudine, prezența animalelor receptive, precum și de prezența și activitatea vectorilor. În unele țări precum Australia, au fost detectați anticorpi anti-BTV la un număr foarte mare de animale care nu prezentau simptomatologie (Wilson ș.a., 2008; Moț ș.a. 2018).

Datorită capacității de propagare a virusului la nivelul mondial și a efectelor produse prin apariția bolii, la mijlocul anilor 1960, Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (OIE) a clasificat boala limbii albastre (*Bluetongue*) în categoria de

boală tip "A". Ca urmare, s-au reglementat și s-au impus anumite rigori privind importul și exportul animalelor și a materialului seminal provenit din regiuni geografice afectate de Buetongue (Gibbs și Greiner ,1994). Toate aceste măsuri specifice au produs efecte economice nedorite în țările afectate de această boală, afectând zootehnia la nivel mondial (Gibbs ș.a., 1994; Coetzee ș.a.2012). Virusul a continuat să se răspândească către noi zone geografice , producând astăzi, una din cele mai importante boli ale secolului XXI (Purse ș.a.2005; Maclachlan ș.a.2010; Peter Coetzee ș.a.2012).

1.1.2. Importanța

O datăcu apariția bolii într-o anumită regiune geografică sunt demarate o serie de măsuri administrative și specifice care implică anumite costuri. La nivel național, prima măsură care trebuie luată este interzicerea imediată a importului de animale din țări cu risc, urmată de monitorizarea fermelor pentru creșterea rumegătoarelor (examen clinic, teste serologice și virologice pe animale, monitorizarea vectorilor de insecte). În unele cazuri, se recomandă efectuarea vaccinării preventive și evitarea contactului animalelor cu insecte vectoriale (Stanciu și Sârbu, 2014).

Pierderile economice globale datorate bolii Bluetongue nu pot fi calculate cu exactitate dar există estimări care le aproximează la 30 de miliarde de dolari pe an (Tabachnick, 1996)

Velthuis ș.a. (2010) au realizat un model matematic de estimare a costurilor totale raportate în urma epidemiei cu serotipul BTV-8 în Olanda(2006 și 2007). S-a avut în vedere impactul economic creat prin diminuarea capacității productive a animalelor, mortalitate și malformații fetale, cheltuieli cu imunizarea animalelor receptive, restricții comerciale, reducerea prețului de valorificare economică a animalelor din speciile receptive (bovine și ovine) și a produselor provenite de la acestea. În acest caz, costurile totale au fost estimate la 32,4 milioane de lire sterline în 2006 și 164-175 milioane de lire sterline în 2007, autorii considerând că 91% dintre aceste cheltuieli au fost direcționate pentru control și supraveghere.

Având în vedere toate aceste costuri aferente apariției focarelor de Bluetongueși influența semnificativă a acestei boli asupra comerțului de carne, lapte și alte produse de origine animală, se poate deduce ipoteza conform căreia virusul *Bluetongue* are implicațiile unei arme biologice (Blancou și Pearson, 2003; Sperlova și Zendulkova, 2011, Stanciu și Sarbu, 2014).

1.2. Etiologia

Boala limbii albastre este produsă de virusul *Bluetongue* care, alături de alte 27 de specii virale, aparțin genului *Orbivirus*, subfamilia *Sedoreovirinae* din familia *Reoviridae*(<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>,2018). În același gen taxonomic sunt incluși și virusul pestei ecvine africane (*african horse sickness – AHS*), virusul bolii hemoragice virale epizootice (*Epizootic haemorrhagic disease - EHD*) și virusul encefalitei ecvine (*Equine encephalosis virus-EEE*) (tabelul 1.1.).

Clasificarea reovirusurilor cu semnificație veterinară (OIE, 2015)

Classification of reoviruses of veterinary significance (OIE, 2015)

FAMILIA	SUBFAMILIA	GENURILE	SPECIILE
REOVIRIDAE	SEDOREOVIRINAE	ORBIVIRUS	Bluetongue virus
			African Horse sickness virus
			Epiyootic haemorrhagic disease virus
	SPINAREOVIRINAE	ROTAVIRUS	Equine encephalosis virus
			Palyam virus
			Rotavirus A,B,C,D,E,F,G
REOVIRIDAE	SPINAREOVIRINAE	ORTHOREOVIRUS	Avian orthoreovirus
			Mammalian orthoreovirus
		COLTIVIRUS	Colorado tick fever virus

Virusul *Bluetongue*, în funcție de serotip, afectează rumegătoarele domestice precum oile, caprele și bovinele, dar și pe cele sălbatice cum ar fi: bivoli, căprioare, antilope și cămile.

În comun cu celelalte genuri ale familiei *Reoviridae*, prima determinantă a includerii izolatelor de virus ca aparținând speciilor din *Orbivirus* este compatibilitatea de recombinare a segmentelor genomului viral în timpul coinfecțiilor și, prin urmare, posibilitatea schimbului de informații genetice și generarea de descendenți viabili de sușe virale.

Oricum, furnizarea de date directe evidențiază că reasortarea segmentelor între izolate este limitată, iar comparația serologică implică, în primul rând, imunodominanța serogrupului/speciei – antigenul specific VP7 ca temei uzual în diagnosticul prin analiza cantitativă pentru fiecare specie virus (serogrup).

Aceste virusuri, aparținând familiei *Reoviridae*, pot fi diferențiate și identificate prin structura genomului viral, categoriile de animale gazdă, proprietățile serologice, compoziția proteinelor, simptomele maladiilor și prin analizarea și compararea secvențelor de genom prin testul PCR.

La nivel mondial, au fost raportate 27 serotipuri (Maan S ș.a., 2007; Bhanuprakash V. ș.a., 2009), dar ele nu evoluează simultant, în aceeași zonă geografică. De exemplu, în SUA au fost raportate 13 serotipuri (1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 19, 22 și 24), în Europa au fost semnalate 9 serotipuri (1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 16 și 25) sau în Kuwait a fost identificat serotipul 26 (Temesgen Abera ș.a., 2018).

Între membrii serogrupului BTV, există reactivitate imunologică încrucișată semnificativă (Monaco ș.a., 2006). În cadrul speciilor, tulpinile virale sunt diferențiate pe baza testelor de genotip și seroneutralizare. Fiecare serotip conferă o imunitate solidă față de el însuși, dar variabilă, adeseori ușoară și, uneori, nulă față de altele (OIE, 2012; Batten ș.a. 2013, Răpuncean ș.a., 2014).

Din punct de vedere morfologic, virusul *Bluetongue* prezintă un fragment de acid nucleic viral ARN neînvelit, cu structură icosaedrică și dimensiuni de 70 – 90 nm, cu capsidă dublă, a cărei suprafață este constituită din 32 capsomere (Vasiu, 2003; Răpunțean ș.a., 2014).

Particula virală se replică în citoplasma celulei gazdă, conține ARN dublu helicoidal și are dimensiuni de 50-100 nm (Perianu, 2005). Faptul că virusul nu are înveliș la exterior, îl face sensibil la acțiunea tripsinei.

Genomul virionului cuprinde 10-12 segmente de ARN liniar, dublu catenar. În afara segmentului 10 care codifică proteinele NS3 și NS3a, restul segmentelor codifică, fiecare, câte o proteină structurală sau nestructurală (Manual de diagnostic *Bluetongue*, Ionescu, 2014).

Natura genomului permite reasortarea între segmente și, în consecință, în cazul coinfecțiilor, genomul viral suferă mutații genetice (genetic drift) într-un procent crescut, contribuind la o derivă antigenică, particularitate ce explică variabilitatea antigenică a virusului (Heidner ș.a., 1991, citat de Perianu, 2005).

Virusul este constituit din 5 proteine structurale, respectiv două proteine majore (VP7 și VP3) și trei proteine minore (VP1, VP4 și VP6) fiind înconjurat la exterior de capsida exterioară formată din proteinele VP2 și VP5. Proteinele structurale sunt importante deoarece au rol în atașarea virusului de celule și realizarea infecției și, pentru că acestea conțin epitopi neutralizanți care stabilesc serotipul viral și imunitatea.

Virusul se cultivă pe embrioni de găină de 8 zile (antrenând moartea acestora în 3-5 zile, cu formarea de leziuni congestive și hemoragice), pe culturi celulare renale de miel, vițel și hamster, pe celule testiculare de bovine, ovine, pe fibroblaste de pui, pe celule din liniile BHK 21, VERO (Vasiu, 2003), L- 929, efectul citopatic apărând în 3-4 zile, precum și pe sistemul nervos central al șoarecilor nou născuți, în urma inoculărilor intracerebrale.

Efectul citopatic în cultura de monostraturi de celule renale de miel apare în 24-72 ore (Carp – Cărare, 2001).

Virusul se replică nu numai în mediul natural (pe rumegătoare, ca gazdă și pe insectele *Culicoides*, ca vector), dar se adaptează și se replică și în mediul artificial. Astfel, virusul a fost cultivat pe culturi celulare (linia BHK-21 – celule renale de hamster tânăr, L929 – fibroblaste de șoarece) și embrioni de găină (Howell ș.a., 1967). De asemenea, virusul se cultivă în sistemul nervos central al șoarecilor sugari în vârstă de o zi sau al hamsterilor inoculați intracerebral.

Virusul prezintă o mare stabilitate. În sângele citratat, la 4°C, își menține virulența timp de 4 ani, iar în stare uscată și în soluție de glicerină se păstrează activ ani de zile. Rezistă mult timp și la putrefacție. La 50°C, virusul se inactivează în 3 ore, iar la 60°C în 30 minute (OIE., 2015). Este rezistent la acțiunea cloroformului, eterului, deoxicolatului de sodiu, dar este sensibil la acțiunea tripsinei (tabel 1.2.)

Oneț (1983), menționează că virusul rezistă în sânge, la temperatura camerei, până la trei luni păstrându-și virulența, iar în substanța nervoasă păstrată la rece (- 40°C) își conservă virulența timp de 7 ani.

Rezistența virusului *Bluetongue* (Manual OIE, 2015)
***Bluetongue* virus resistance (Manual OIE, 2015)**

Temperatură	
ph	Sensibil la pH <6,0 și >8,0
Agenti chimici	Inactivat de β -propiolactona
Dezinfectante	Inactivat de iodofori și de compuși fenolici
Rezistența	Foarte stabil în prezența proteinelor (rezistă perioade îndelungate în sângele conservat la 20°C)

Virusul *Bluetongue* este sensibil la temperaturi de + 20°C, pH acid și alcalin, iodoform, formalină 3%, alcool de 70°C, tripsină și concentrații joase de β - propiolactonă. Este rezistent la factorii mediului extern, la congelări/decongelări, iradiere și solvenți organici (Răpuntean ș.a., 2014, OIE, 2015).

1.3. Caractere epidemiologice

Conduita analizei epidemiologice globale privind evoluția *Bluetongue* impune disponibilitatea de a împărtăși date între statele membre afectate, colectarea și standardizarea acestora, în așa fel încât ele să fie incluse într-o singură analiză de date.

Caracterele epidemiologice sunt reprezentate de sursele de infecție și de modul de transmitere, receptivitate (tabelul 1.3.).

Tabel 1.3./Table 1.3.

Receptivitatea, sursele de infecție și transmiterea în *Bluetongue*
Receptivity, sources of infection and transmission in *Bluetongue*

Receptivitate	Surse de infecție	Mod de transmitere
ovine bovine caprine bubaline rumegătoare sălbatic	rumegătoare viremice bovine purtătoare fără semne clinice caprine rumegătoare sălbatic/rozătoare insectele ce s-au hranit cu sânge infectat	hematogenă prin insecte hematofage veneriană, mai rară prin contact direct, extrem de rară transplacentară transfer embrioni

1.3.1. Receptivitate

Sunt receptive la boală ovinele, bovinele, caprinele, bubalinele, rumegătoarele sălbatic: lama, alpaca, cerb cu coada albă, bivolul de apă, bivolul african (*Syncerus caffer*), bizonii, muflonii, elanii, unele specii de antilope din Africa și alte biongulat cum ar fi cămila (Perianu, 2012; Moga Mânzat, 2005).

Studii recente au sugerat posibilitatea ca virusul să infecteze și unele specii de carnivore, cum ar fi: câinii, pisicile, gheparzii, lei, etc. (Alexander ș.a.1994; Oura, 2011).Din 2006 până în 2010, anticorpi anti- BTv1, 4 și 8 au fost identificați la cerb (*Cervus elaphus*), căprior (*Dama dama*), mufloni (*Ovis aries musimon*), căprioare (*Capreolus capreolus*), oaia cu coamă (*Ammotragus levia*) și capra spaniolă (*Capra pyrenaica*) în Spania, la care au fost descrise epidemii cu mortalitate ridicată

(CFSPH,2015; Schulz ș.a., 2012; Zanolari ș.a., 2010; Purse, 2015). Virusul nu afectează caii, porcii și nu se transmite la om.

Originea *Bluetongue* este cel mai probabil din Africa, iar rumegătoarele sălbatice sunt gazde naturale ale BTV, deși se crede că bovinele au înlocuit antilopele ca gazdă de întreținere a virusului *Bluetongue* (Alexander ș.a., 1994). În America de Nord s-au făcut studii care să demonstreze rolul rumegătoarelor sălbatice în menținerea și răspândirea BTV. În Europa, astfel de studii sunt aproape inexistente.

1.3.2. Surse de infecție și transmitere

Surse de infecție sunt reprezentate de către animalele domestice bolnave (ovine și bovine) sau cele trecute prin boală, rumegătoarele sălbatice infectate și cu forma inaparentă de boală precum și de insectele care s-au hrănit cu sângele animalelor bolnave (Moga Mânzat, 2005, Perianu, 2012).

Transmiterea virusului *Bluetongue* la animalele receptive se realizează exclusiv prin intermediul unor vectori reprezentați de insecte hematofage din genul *Culicoides*. În zona mediteraneană și în sudul Europei sunt predominanți vectori din complexul *Culicoides imicola*, iar în zona continentală europeană (zona paleartică), vectori din complexele *Culicoides obsoletus* (*C. obsoletus sensu stricto*, *C. dewulfi*, *C. scoticus*), *Culicoides pulicaris*, *Culicoides nubeculosus* (fig.1.1).

Boala se transmite prin intermediul înțepăturii culicoidizilor, după cel puțin 10 zile de la momentul când insecta s-a infectat. Dipterele hematofage, după prima infectare, rămân permanent purtătoare (Foster 1963, citat de Perianu, 2006).

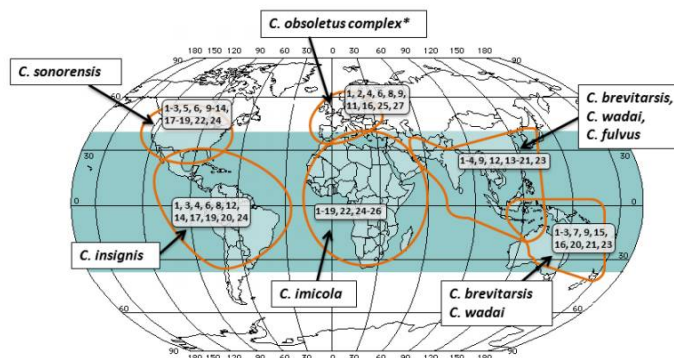


Fig.1.1. Distribuția geografică a serotipurilor de virus BT și vectorii majori transmițători (FAD PreP -BTV, USDA, 2016)

Fig. 1.1. Geographic distribution of BT virus serotypes and major transmitting vectors

Insectele din genul *Culicoides* transmit virusul *Bluetongue* la animalele receptivedupă ce femelele s-au infectat de la un animal viremic prin înțepare și ingerarea de sânge (fig.1.2.). Femelele *Culicoides* se hrănesc cu sângele animalelor doar noaptea.În momentul hrănirii culicoidelor, virusul ajunge în organismul insectei unde se replică și în 10-15 zile, virusul ajunge în glandele salivare (Purse ș.a.2005), (fig.1.3.).

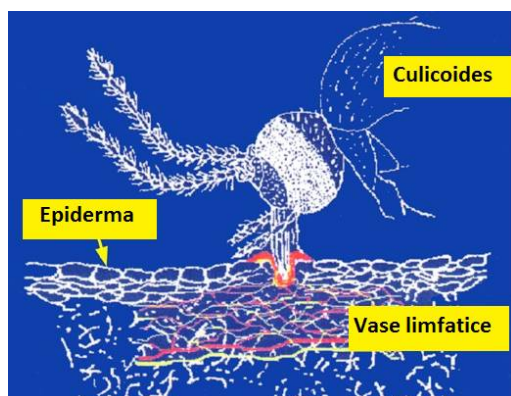


Fig.1.2. Metoda de hrănire a culicoidelor (Toby Dix St George)
Fig.1.2. Midges feeding method (Toby Dix St George)

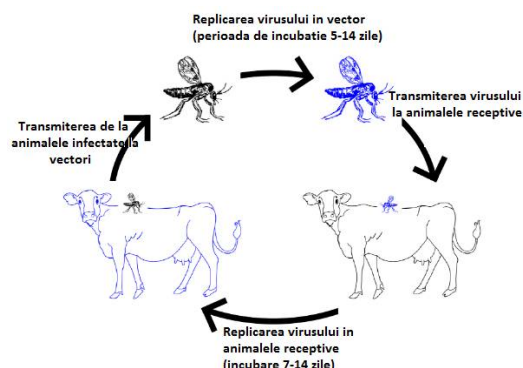


Fig.1.3. Ciclul de transmitere a virusului de la vector la animalele receptive (adaptat după Purse ș.a.2005)
Fig.1.3. BTV-vector-borne transmission cycle (adapted from Purse ș.a.2005)

Virusul persistă în organismul insectelor toată viața lor (70 zile) și se poate transmite transovarian, astfel încât noile generații de diptere sunt deja infectate și purtătoare de virus (Purse ș.a.2005).

Sângele animalelor infectate reprezintă sursa virulentă esențială, viremia se poate prelungi 30 zile la ovine și mai multe luni la bovine și rumegătoare sălbatice. Sperma taurilor infectați este uneori virulentă (Singer ș.a., 2001).

Alte modalități de transmitere a virusului sunt posibile doar ocazional: pe cale veneriană, congenitală sau prin transfer de embrioni. Este posibilă și transmiterea transplacentară a virusului *Bluetongue*, motiv pentru care, la nivel european s-au implementat noi măsuri de precauție pentru prevenirea răspândirii bolii (Regulamentul comisiei CE 1266/2007).

Nu s-a dovedit transmiterea prin coabitarea animalelor infectate cu cele sensibile.

1.3.3. Dinamica epidemiologică a bolii

Bluetongue evoluează diferit în funcție de teritoriul geografic unde acționează fiind în strânsă legătură cu distribuția și ciclul biologic al insectelor vector. În zonele cu climă temperată, boala are caracter sezonier evoluând la sfârșitul primăverii, începutul verii și toamna, când se ating vârfurile densității culicoidelor (EFSA, 2017). În zonele tropicale, unde culicoidele rămân active tot anul, boala evoluează endemic. Boala poate evolua și epidemic în zonele în care incidența animalelor cu manifestări clinice variază în funcție de densitatea vectorială, de virulența tulpinii virale, de imunitatea animalelor, etc. Incidența animalelor infectate cu virusul *Bluetongue* este mai ridicată în zonele mlăștinoase și de-a lungul cursurilor de apă. Insectele culicoide pot fi antrenate cu ajutorul curenților de aer dintr-o zonă cu risc *Bluetongue* într-o zonă îndemnată de boală (Moga Mânzat, 2005).

Morbiditatea și mortalitatea variază în funcție de anumiți factori care țin de

specia afectată și virulența tulpinii virale. În general, rata morbidității și mortalității este crescută atunci când efectivul de animale este la primul contact cu virusul și tulpina are virulență crescută (Zanolari ș.a., 2010; Schulz ș.a., 2012; Perianu, 2012).

1.3.3.1. Mecanismul overwintering

Virusul *Bluetongue* poate supraviețui 9-12 luni fără implicarea vectorilor culicoizi. În această perioadă nu sunt detectate animale viremice, bolnave sau cu seroconversie pe specia gazdă (Takamatsu ș.a., 2003). Mecanismul de supraviețuire a virusului în absența vectorilor, este denumit “overwintering” și nu este pe deplin cunoscut.

Atunci când contactul dintre vectorul principal și populația de animale receptivă este întrerupt în lunile de iarnă, există trei modalități prin care virusul ar putea supraviețui: fie prin infecție cronică sau latentă a unor indivizi, prin transmiterea transplacentară de la mamă la făt sau transmisie orizontală în timpul actului sexual. Gazdele cu infecție cronică rămân în permanență infecțioase pentru perioade îndelungate de timp, în timp ce virusurile latente, cum ar fi herpesul, stau ascunse în interiorul unei gazde infectate, dar pot fi stimulate pentru a relua replicarea prin anumiți factori cum ar fi scăderea capacității imunitare din cauza stresului sau a altor infecții sau în urma administrării unor medicamente (Wilson ș.a., 2008).

Prin urmare, atunci când lipsește contactul dintre vector și animalele gazdă, există trei posibilități ca virusul să supraviețuiască: în interiorul vectorilor, în interiorul animalelor gazde sau există un ciclu alternativ de transmitere (fig.1.4.) (Wilson ș.a., 2008, Moga Mânzat, 2005).

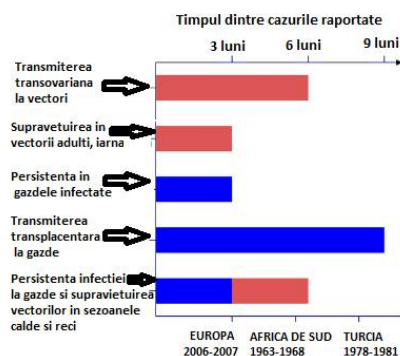


Fig 1.4. Posibile exemple de overwintering (după A Wilson , Darpel K, Mallor PS 2008)

Fig 1.4. Possible examples of overwintering (Wilson and al., 2008)

1.3.3.2. Fenomenul overwintering la insecte

Reaparitia virusurilor după perioade lungi de timp și în aceleași regiuni, pare să fie o proprietate distinctă a arbovirusurilor (White ș.a., 2005).

Arbovirurile au capacitatea de a supraviețui în organismul femelelor culicoide și prin transmitere verticală, infectează descendenții. Unele studiile arată că, larvele de culicoide infectate pot supraviețui iarna chiarși în condiții neprielnice de mediu ceea ce ar putea fi cel mai plauzibil fenomen de overwintering a virusului (Beaty ș.a., 1991; Alb ș.a.,

2005, White ș.a. 2005).Cu toate acestea, unii autori (Osborne ș.a.,2015), prin studiile experimentale efectuate pe ouăle, pupele și larvele culicoidelor *C. sonorensis*, colectate la sfârșitul verii când reapar infecțiile cu *Bluetongue* în zona temperată a Californiei, nu a reușit să identifice virusul prin tehnici de RT-PCR. Ca urmare, autorii consideră că transmiterea verticală este anevoioasă și reapariția focarelor, mai ales în regiunile temperate, pare să fie consecința unei supraîncărcări a mediului cu virusuri *Bluetongue* (Mayo ș.a., 2014).

De asemenea, este cert faptul că virusul *Bluetongue* putea supraviețui iarna în vectorul populației adulte. Deși culicoizii nu tolerează temperaturi sub 0 grade și nu supraviețuiesc mai mult de 10 zile, studiile de laborator arată că s-ar putea prelungi această perioadă de viață în condițiile unei ierni mai blânde. Experimentele au arătat ca culicoizii pot supraviețui în condiții de laborator la 10°C timp de trei luni (Lyszk și Danyk, 2007).

În ierni blânde este posibil ca o parte din culicoizii infectanți să fi protejați în funcție de alegerea locului lor de staționare. În aceste ierni, este posibil ca o mică parte dintre adulții *Culicoides* infectați să poată supraviețui suficient de mult pentru a reduce decalajul dintre anotimpurile de transmitere a virusului.

Comportamentul speciilor de culicoizi este adaptat astfel încât să le asigure supraviețuirea. Un exemplu poate fi modul în care culicoizii nord europeni s-au protejat în interiorul clădirilor atunci când temperaturile erau foarte scăzute, aspect care nu era cunoscut la aceste specii (Losson B. ș.a. 2006).

1.3.3.3. Fenomenul overwintering la populațiile de rumegătoare

Virusul *Bluetongue* poate produce infecții cronice sau latente la rumegătoarele receptivă în organismul cărora ar putea persista o perioadă de timp care să-i permită trecerea transplacentară de la mamă la făt (fig.1.5).

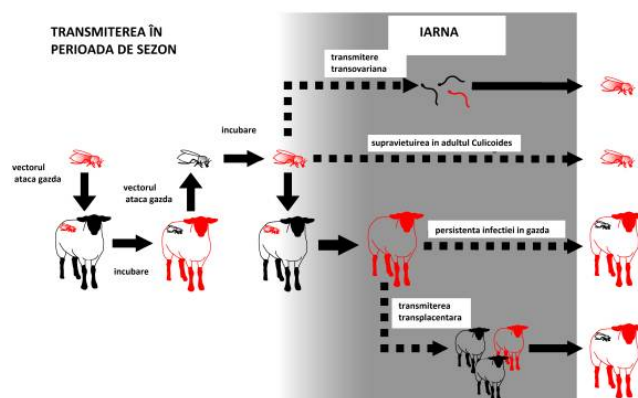


Fig 1.5. Transmiterea BTV în sezonul cald și rece (după Wilson ș.a., 2008)

Fig 1.5. The transmission of BTV in summer and winter (Wilson and al., 2008)

În infecțiile cronice, animalele infectate mențin virusul în stare de latență o perioadă lungă de timp până când apare o imunosupresie care va permite replicarea

virusului. În sângele bovinelor, virusul poate persista o perioadă mai lungă de timp de 3-4 luni, supraviețuind astfel perioadei de absență a vectorului (Battenș.a., 2013; Van der Sluijs ș.a., 2016).

Deoarece infecțiile latente se caracterizează prin absența detectabilă a virusului, acest tip de persistență a cauzelor dau cele mai mari probleme în supraveghere și control. *Bluetongue* și majoritatea arbovirozelor sunt detectate în mod normal prin testarea probelor de sânge, virusul infectând și anumite organe, dar absența în sânge face imposibilă detectarea acestuia prin screeningul serologic ELISA efectuat prin programele de supraveghere, care, începând cu anul 2008, sunt cofinanțate de Uniunea Europeană (Bărănguță, 2010; Diaconu, 2018).

Încă din 1955, a fost demonstrată transmiterea transplacentară a serotipurilor BTV2, BTV-4, BTV-8, BTV-9, BTV-10, BTV-11, BTV-13, BTV-16, BTV-23 la rumegătoare (Van der Sluijs ș.a., 2016). Transmiterea transplacentară a virusului constă în traversarea corionului și invadarea fătului. În funcție de specia de rumegătoare afectată și stadiul gestației, efectele sunt diferite. Astfel, dacă infectarea se produce într-o fază incipientă a gestației consecința este avortul și dacă infectarea apare într-o etapă târzie a gestației, fătul este infectat și purtător de virus (Gibbs ș.a., 1979). După focarul de *Bluetongue* apărut în Europa centrală în 2007-2008, De Clercq ș.a. (2008) examinează și testează 300 de avortoni proveniți de la bovine fără simptomatologie clinică de *Bluetongue*. În urma investigațiilor prin RT-PCR a fost pusă în evidență o tulpină a serotipului BTV-8, atât la bovine cât și la avortonii acestora. Transmiterea transplacentară a serotipului BTV-8 fost demonstrată și la ovine (Saegerman ș.a., 2011) și caprine (Belbis ș.a., 2013; Coetzee ș.a., 2013).

Virusul *Bluetongue* a fost detectat în materialul seminal al taurilor și berbecilor și poate fi detectat doar în perioada de vârf a viremiei, prezența lor datorându-se celulelor sanguine infectate existente la un moment dat în spermă (Osburn, 1994). Riscul transmiterii BTV de către embrioni bovini există, dar este neglijabil dacă embrionii sunt spălați între colectare și congelare și sunt transportați conform protocolului stabilit de International Embryo Transfer Society (IETS) (Acree ș.a., 1991; Bowen și Howard 1984, Estelle ș.a. 2011).

1.3.3.4. Alte mecanisme overwintering

Transmiterea virusului *Bluetongue* se poate face și prin intermediul altor gazde. Astfel, Bouwknegt ș.a (2010), au examinat potențialul rol vectorial al capușelor *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus bursa* și *Ornithodoros savignyi*, care au ingerat sânge contaminat cu serotipul 8 al virusului *Bluetongue*. Virusul *Bluetongue* a fost preluat de căpușe, a traversat bariera intestinală și s-a distribuit prin hemolimfă în glandele salivare, ovare și testicule. Utilizând tehnica RT-PCR, virusul *Bluetongue* a fost detectat în aceste țesuturi după 21 de zile de la infectare. Experimentul, demonstrează faptul că, căpușele pot transmite serotipul BTV-8.

De asemenea, există ipoteza transmiterii virusului *Bluetongue* la carnivorele salbatice. Un studiu serologic efectuat pe carnivorele din Sudul și Estul Africii a evidențiat

o gamă largă de carnivore africane (gheparzi, lei, hiene, șacali, câini sălbatici) la care s-au pus în evidență anticorpii specifici pentru virusul *Bluetongue* (Alexander ș.a., 1994; Coetzee ș.a., 2012).

Pentru a ajunge la o înțelegere a epidemiologiei bolii pe termen lung, a programelor entomologice și virusologice trebuie reexaminată întrebările cu privire la comportamentul culicoizilor, insecte capabile să acționeze ca vectori ai bolii. Examinarea și revizuirea traseelor de migrare a acestora pot fi utile în analiza riscului de reapariție a focarelor de boală. Cât timp cât nu se cunosc pe deplin, mecanismele de *overwintering*, distribuția virusului *Bluetongue* în Europa va fi surprinzătoare și în continuă schimbare.

1.4. Patogeneza

Patogeneza în *Bluetongue* se caracterizează prin replicarea virusului pe două tipuri de gazde, respectiv gazde vertebrale (mamifere rumegătoare) și gazde nevertebrale, respectiv vectorii culicoizi (Moga Mânzat, 2005; Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014), (fig.1.6).



Fig.1.6 Posibilitățile replicării virusului *Bluetongue*: virus-gazda nevertebrată-gazda vertebrată

Fig.1.6 Possibilities of *Bluetongue* virus replication: virus- invertebrate host-vertebrate host

1.4.1. Replicarea pe gazde nevertibrate

După preluarea virusului *Bluetongue* de către vectori, în urma hrănirii pe animale viremice și eliberarea acestuia, ca urmare a digerației hematiilor, virusul pătrunde în celulele mezenteronului, unde se replică fără a distruge celulele (fig.1.7)

Ulterior, virusul este eliberat în hemolimfă, infectează epiteliul intestinal (de la 2 ore de la ingerare, până la 3-4 zile), se replică în celulele intestinale și, în final, este depozitat în glandele salivare ale vectorului, conferind acestuia posibilitatea de a-l inocula la animale sănătoase la următoarea acțiune de hrănire (Moga Mânzat, 2005, Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

1.4.2. Replicarea pe gazde vertebrale

La nivelul gazdelor vertebrale, replicarea virală are loc în două faze (Perianu ș.a., 2012).

În prima fază, respectiv la 2-3 zile post infecție, se produce replicarea inițială la nivelul limfonodurilor regionale.

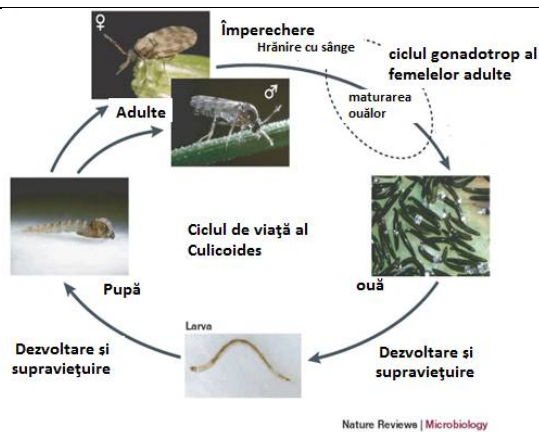


Fig.1.7. Ciclu de transmitere a virusului pe gazde nevertebrate (Bethan V. Purse ș.a., 2005)
Fig.1.7. The cycle of transmission of the virus on invertebrate hosts (Bethan V. Purse ș.a., 2005)

Ulterior, virusul ajunge prin intermediul vaselor limfatice eferente, în sistemul circulator sanguin și, ulterior, în situsurile de replicare secundară (splină, limfonoduri, pulmoni). Totodată, se instalează viremia primară la 6 – 20 zile. În această etapă, replicarea virală are loc în celulele endoteliului vaselor de sânge mici, a celulelor dendritice, limfonodurilor, limfocitelor și macrofagelor, după care virusul este din nou transferat în torrentul sanguin (viremia secundară), (Bethan V. Purse ș.a., 2005; Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014), (fig.1.8).

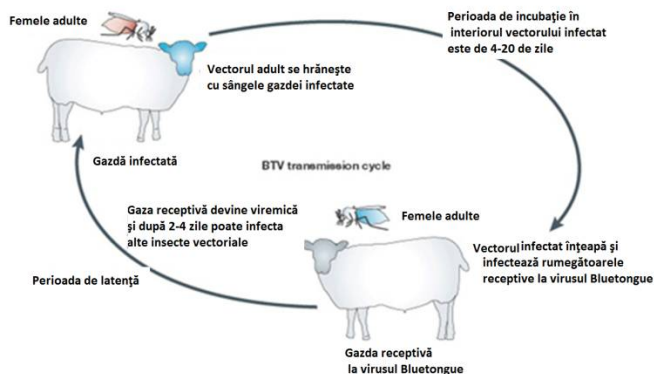


Fig.1.8. Ciclu de transmitere a virusului pe gazde vertebate (Bethan V. Purse ș.a., 2005)

Fig. 1.8. Virus transmission cycle on vertebrate hosts

În organismul gazdelor vertebate virusul este asociat hematiilor și plachetelor sanguine, fiind protejat timp îndelungat, de faldurile membranei acestora, față de acțiunea anticorpilor specifici. Doar o mică parte din cantitatea virală se află liber în sânge. În acest mod se explică perioada îndelungată de viremie a animalelor care au luat contact cu virusul (60 zile la ovine, 90 – 150 zile la bovine), precum și coexistența virusului și a anticorpilor pe același animal (Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Durata viremiei în gazdele vertebrate depinde de: specia de animale afectate, serotipul viral, metoda de detectare a virusului(Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Insectele transmițătoare preiau virusul o dată cu sângele pe care îl consuma de la animalele în stare de viremie și, după cel puțin 10 zile de incubatie în interiorul insectei, acesta se localizează în glandele salivare unde se multiplică și, apoi, este excretat prin salivă, inoculându-l animalelor (Vasiu, 2003, Perianu ș.a., 2012).

Inocularea virusului de către culicoid se face în momentul hrănirii pe gazda vertebrată. Dezvoltarea viremiei primare este urmată de infectarea nodurilor limfatice, a splinei și pulmonului(Perianu ș.a., 2012).

Replicarea virusului are loc la acest nivel și în endoteliul vaselor mici. Apariția de microtrombi plachetari și fibrinoși este urmată de hiperemie, hemoragii, edeme, necroze ischemice în organe și țesuturi. Totodată, are loc replicarea în stratul Malpighian și descuamativ la nivelul limbii, pielii, buzelor, esofagului și rumenului(Răpunțean ș.a., 2014).

Replicarea virusului în monocite și macrofage, cu producerea viremiei secundare, între a 5-a și a 12-a zi de la infecție, este momentul propice pentru izolarea virusului *Bluetongue*(Răpunțean ș.a., 2014).

La animalele gestante are loc traversarea barierei placentare și infectarea fătului, urmată de efecte teratogene ca hidrocefalia, hipoplazia cerebrală, avort tardiv și apariția de produși neviabili (Vasiu, 20103; Perianu ș.a. 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Durata viremiei este în funcție de specie, individ, tulpină și serotipul utilizat. La bovine este, în medie, de 4 săptămâni, rar 8 săptămâni, la ovine 54 de zile, la caprine 21 de zile, la rumegătoarele sălbatice este foarte variabilă, în funcție de specie și serotipul viral (Vasiu, 20103; Perianu ș.a. 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Virusul posedă un tropism pentru celulele hematopoetice și endoteliale în care se multiplică și provoacă degenerarea și necroza endoteliului vascular. Asocierea virusului cu membranele celulare ale hematiilor este, probabil, responsabilă de prelungirea viremiei la mai multe săptămâni, chiar în prezența anticorpilor neutralizanți. Animalele suferă, probabil, tulburări de coagulare ce evoluează în coagulopatie de consumație ce predispune la sindrom hemoragic (Vasiu, 2003, Perianu ș.a., 2012).

Virusul traversează placenta și produce simptome variabile, în funcție de momentul gestației (mortalitate embrionară și fetală, anomalii congenitale, hidroencefalie și hipoplazie cerebeloasă), ca o consecință a distrugerii de către virus a precursorilor neuronali și a celulelor gliale, înainte de migrarea lor în diferitele regiuni ale creierului. În cazul în care infecția se produce în ultima treime a gestației, fătul sau mielul dezvoltă un răspuns imunitar care elimină infecția (Vasiu, 2003, Perianu ș.a., 2012).

Brewer ș.a.(1992) consideră că rezervorul natural de boală este reprezentat de bovinele purtătoare de virus *Bluetongue*.Astfel, acestora li s-a inoculat virusul *Bluetongue*, serotipul 10 și, apoi, li s-au examinat prin microscopie electronică monocitele, eritrocitele și limfocitele, pentru a putea caracteriza interacțiunea virusului *Bluetongue* cu celulele. Replicarea virusului *Bluetongue* în monocite și stimularea (replicarea) limfocitelor a fost morfopatologic similară cu cea apărută în celulele VERO.

După infecția cu virusul *Bluetongue* la oaie sau după vaccinare, apar anticorpii anti-virus neutralizanți, responsabili de răspunsul imun celular (Răpunțean ș.a., 2014)..

Bovinele sunt gazde purtătoare, cu infecții asimptomatice, fiind asociate cu persistența viremiei. Din interacțiunea virusului *Bluetongue* cu membrana celulară a eritrocitelor, rezultă infecția bovinelor care facilitează viremia prelungită, precum și infecția altor insecte vector (Vasiu, 20103; Perianu ș.a. 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Varietatea gazdei și factorii de mediu pot influența clar manifestarea acestei boli. Patogenitatea în infecția cu virus la bovine și ovine este similară (Perianu ș.a., 2012).

Rumegătoarele dezvoltă o varietate de răspunsuri după infecția cu virus. Anticorpii specifici de serogrup și de serotip sunt detectați, iar dacă animalul nu a mai fost expus la infecția cu *Bluetongue*, anticorpii neutralizanți formați elucidează acest aspect (Răpunțean ș.a., 2014; Diaconu, 2018).

Patogeneza *Bluetongue* este similară în cazul bovinelor, oilor și cerbilor. Inițial, replicarea are loc în limfonoduri, iar virusul diseminează apoi în celelalte țesuturi, inclusiv pulmoni și splină, replicarea principală fiind în celulele endoteliale și fagocitele mononucleare (MacLachlan ș.a., 1990).

Nu se cunoaște sigur de ce în infecția cu virusul *Bluetongue*, bovinele sunt rezistente, dar viremice și rămân purtătoare de virus fără semne clinice, cel mai frecvent (De Maula ș.a., 2003, Perianu ș.a., 2012).

1.5. Tabloul clinic

Boala limbii albastre (*Bluetongue*), cunoscută și ca febra catarală, afectează atât rumegătoarele domestice (ovinele, bovine, caprine, bivoli) cât și cele sălbatice (antilope, căprioare, cămile, etc) (OIE, 2019).

Evoluția clinică a bolii este diferită în funcție de specia la care evoluează, ovinele fiind cele mai sensibile la acțiunea agentului viral (OIE, 2019). Se caracterizează prin febră și inflamația catarală sau ulcero-necrotică a mucoaselor nazale, bucale și a buretului coronarian (Vasiu, 2003; Perianu ș.a., 2012, OIE, 2019)

La ovine, morbiditatea poate fi de 100% iar mortalitatea se situează între 2-30% dar poate atinge și 70% (OIE, 2019).

La ovine, perioada de incubație este de 3-8 zile și evoluția poate fi acută, subacută și abortată (Vasiu, 20103; Perianu ș.a. 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Forma acută debutează cu hipertermie (2-4 zile), dispnee, hiperemia mucoasei bucale și a pielii de pe față, pavilioanele urechilor și membre. Limba devine hipertrofiată, puternic tumefiată, cianotică, de unde și denumirea de „Boala limbii albastre” (Vasiu, 2003; Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014; OIE, 2019). La nivelul cavității bucale, și în special la nivelul buzelor, gingiilor și limbii apar eroziuni de diferite dimensiuni, însoțite de hemoragii și ulcere sângerânde. Din cavitatea bucală și din fosele nazale se scurg secreții seroase, filante care devin în timp mucopurulente (Vasiu, 2003; Perianu ș.a., 2012, OIE, 2019). La nivelul membrilor, zona coronară devine congestionată, hiperemiată, hemoragică și sensibilă la atingere, ceea ce face imposibilă deplasarea animalelor. Toate

aceste simptome se asociază uneori cu conjunctivite, cheratite, enterite, pneumonie de aspirație, semne nervoase (torticolis), avorturi, fătări de produși neviabili sau cu malformații neonatale și infertilitate. Evoluția este nefavorabilă, animalul slăbește treptat și moartea intervine în 8-10 zile, în 70-90% din cazuri (Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Forma subacută (benignă) este cea mai frecvent întâlnită formă de manifestare și evoluează cu aceeași simptomatologie dar mai puțin intensă. Simptomele evoluează timp de 2-3 săptămâni și se finalizează prin vindecare sau moartea animalelor în 20-60% din cazuri (Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Forma avortată evoluează discret cu ușoară indispoziție, oboseală, stare febrilă, discrete leziuni de stomatită și rinită catarală iar după câteva zile, animalul se vindecă spontan.

La bovine, simptomele pot fi uneori prezente după 60-80 de zile de la infectare și evoluția este influențată de virulența tulpinii de virus. Bovinele manifestă aceeași receptivitate față de virusul *Bluetongue* ca și ovinele dar evoluează subclinic ceea ce atribuie bovinelor rolul de rezervor natural de infecție pentru ovine (Vasiu, 20103; Perianu ș.a. 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Atunci când tulpina este virulentă, simptomatologia este similară cu cea de la ovine și se asociază cu sistarea lactației, apar necroze la nivelul ugerului urmate de un proces de vindecare și formarea unor cruste (Vasiu, 20103; Perianu ș.a. 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

La caprine, boala apare foarte rar cu o evoluție inaparentă iar atunci când apar manifestări clinice, ele sunt similare cu cele de la bovine (Bărbănguță, 2010, Perianu ș.a., 2012). Comuniunea cu ovinele și bovinele fac ca această specie să aibă un grad înalt de receptivitate iar numărul animalelor infectate să fie chiar mai mare decât cel al ovinelor, ceea ce indică un rol epidemiologic important în epidemiologia bolii *Bluetongue* (Biteu ș.a. 2013; Yilma ș.a. 2015; Temesgen ș.a., 2018).

1.6. Tabloul anatomopatologic

La toate speciile, leziunile macroscopice relevante sunt localizate la nivelul cavității bucale, rumenului, cordului și mușchilor (Perianu, 2012). Mucoasa bucală este hiperemiată, cogenitivă, cu peteșii și apar eroziuni și ulcere acoperite de pseudomembrane. Limba apare tumefiată, hipertrofică și uneori gangrenoasă (Paul, 1982; Manuel terestre de l'OIE, 2005, Perianu ș.a., 2012).

De asemenea, se identifică leziuni gangrenoase datorate complicațiilor bacteriene anaerobe, hiperemie, edem, eroziuni, hemoragii ale faringelui, laringelui, papilelor rumenale, rețelei, cheagului și, mai rar, ale intestinului. Regiunea valvei ileocecale poate fi sediul unor inflamații catarale sau hemoragice și se mai poate observa hiperemia splinei și a limfonodurilor (Manuel terestre de l'OIE, 2005, Bărbănguță, 2010).

La baza arterei pulmonare precum și celei situate de-alungul pilierului anterior al rumenului și a gutierei esofagiene apar leziuni hemoragice pe care unii autori, le consideră

specifice infecției cu virusul *Bluetongue*. De asemenea, leziuni caracteristice sunt considerate șipeteșiile de la nivelul pericardului, hemoragiile subepicardice și subendocardice, necrozele ale mușchilor papilari din ventricolul stâng sau ale întregului miocard, hemoragiile de diferite intensități la baza arterei pulmonare și aortei (Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014). Musculatura striată prezintă distrofii, hemoragii, necroze, iar țesutul conjunctiv subcutanat și intermuscular este infiltrat cu lichid serohemoragic (Bărănguță, 2010; Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Tabloul lezional este completat cu leziuni distrofice ale rinichiului și ficatului, leziuni congestiv - distrofice în pereții vezicii biliare și urinare, leziuni hemoragice pe mucoasa ureterală, prepuțială și vulvară și edeme ale regiunii fronto- nazale, spațiul intermandibular (Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Histopatologic, se observă edeme, tromboze și hemoragii cu alterarea pereților vasculari, degenerescență și necroza de coagulare a mediei și, mai puțin, a adventiceii, (Perianu ș.a., 2012; Verwoerd și Erasmus, 2004; Răpunțean ș.a., 2014).

1.7. Diagnosticul

Diagnosticul în boala limbii albastre (*Bluetongue*) se realizează pe baza coroborării datelor epidemiologice, clinice și de laborator.

Boala se confirmă prin examene serologice și virusologice clasice sau de biologie moleculară (Răpunțean ș.a., 2014; Diaconu, 2018). Există multiple posibilități de identificare a virusului, unele elaborate în ultima perioada de timp, ca urmare a necesității testării unui număr mare de probe prelevate din tot mai multe focare de *Bluetongue* desfășurate la nivel mondial (tabelul 1.4.).

Cu toate acestea, metodele clasice de identificare a virusului rămân în vigoare (Tojas ș.a., 2018). Izolarea virusului se face prin metode clasice de izolare *in vivo*, cea mai eficientă fiind realizată pe embrioni de găină de 10-11 zile, cărora li se inoculează intravenos probe de sânge sau suspensii tisulare obținute de la animalele infectate cu virusul *Bluetongue* (Clavijo ș.a., 2000). Această tehnică este convenabilă dar poate eșua dacă în probele biologice testate, număr de virusuri este redus.

O tehnică alternativă de izolare *in vivo* a virusului *Bluetongue*, dar care nu este utilizată în mod obișnuit, constă în inocularea intravenosă sau subcutanată a probelor de sânge sau suspensii tisulare la ovine seronegative.

Tehnicile *in vitro* de izolare a virusului constau în utilizarea unor linii celulare tip VERO, linia celulară BHK-21, linia celulară KC (Mcholland ș.a. 2003).

Diagnosticul diferențial se realizează față de: ectima contagioasă, febra Văii de Rift, variola ovinelor și caprinelor, boala virală hemoragică epizootică (EHD), pesta bovina, boala Akabane, cenuroza, pesta micilor rumegătoare, IBR/IPV, BVD/MD, pneumonii, necrobaciloza, abcese podale, poliartrite, intoxicații cu plante toxice (Perianu ș.a., 2012; Răpunțean ș.a., 2014).

Tabel 1.4. /Table 1.4.

Metode de identificare a virusului *Bluetongue* și a anticorpilor specifici
Methods for identifying *Bluetongue* virus and specific antibodies

TESTE	STAREA DE UTILIZARE	AVANTAJE	UTILIZARE
Metode de detecție a virusului <i>Bluetongue</i>			
Imunofluorescența	Utilizare medie	Prezența și caracterizarea virusului	Protocoale experimentale
ELISA de captură (c-ELISA)	Utilizare frecventă	specificitate ridicată	Identificarea antigenelor BTV
Imunobloting	Rar utilizată	Specificitate ridicată pentru serotipurile 1-18 și 20	Detectarea virusului
Microscopie electronică	Rar utilizată pentru diagnostic	Identificarea virusului și modificările celulare produse	Utilizată când nu se cunoaște virusul
RT-PCR standard	A fost înlocuit cu Real Time RT-PCR	specificitate	Identificare ARN BTV
Real Time RT-PCR	Utilizată	Identificare și contaminare redusă a probelor	Identificare ARN BTV
PCR Multiplex	Utilizată	Identificarea simultană a serotipurilor de virus	Identificare ARN BTV
Secvențiere	Utilizată	Incadrarea în serogrup, serotip și topotip	Identifica și cuantifica ARN din genom
Metode de identificare a anticorpi anti-BTV			
Imunodifuzia în gel de agar	În testare	Ușor și rapid de realizat	Detectarea Atc.anti – BTV
i-ELISA și ELISA-c	Cele mai utilizate	Teste fiabile, disponibile, ușor de utilizat	Detectarea Atc.anti – BTV
VNT	Utilizare redusă datorită costurilor	Foarte utilizate în studiile epidemiologice	Detectarea Atc.specifici pentru serotipurile BTV
IgM-ELISA	Complementar testului curent	Tehnici noi	Detectarea Atc.anti – BTV în infecțiile acute la bovine
Imunocromatografie	Utilizare limitată	Test rapid și specificitate înaltă	Detectarea Atc.anti – VP7
Cipuri proteice	Utilizare limitată	Tehnica nouă în curs de dezvoltare	Detectarea Atc.anti – VP7
Seroaglutinare cu latex	Utilizare limitată	Tehnica nouă în curs de dezvoltare. Recomandat pentru număr mare de probe	Detectarea Atc.anti – VP7
Dulu antigen MIA	Utilizare limitată	Specificitate și fiabilitate ridicată comparativ cu c-ELISA	Detectarea simultană a Atc.anti -VP2 și VP7

Abrevieri: BTV- virusul *Bluetongue*, i-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)- testul imunoenzimatic indirect, c-ELISA – ELISA de competiție; MIA- testul de imunoanaliză a microsferii; RT-PCR. *reverse-transcription polymerase chain reaction*; VNT- testul de seroneutralizare a virusului

Datele epidemiologice care oferă elemente deosebit de importante pentru diagnosticul în *Bluetongue* sunt: caracterul sezonier, prezența insectelor vectoriale, evoluția enzootică și aspectul necontagios al bolii, evoluția acută a bolii cu manifestări clinice reprezentative, cum sunt: inflamația și eroziunea mucoasei bucale și a buzelor, rinita și edemul capului, pododermatita cu șchiopături și imposibilitatea de deplasare (Perianu ș.a., 2012; Răpuntean ș.a., 2014).

CAPITOLUL II. SITUAȚIA EPIDEMIOLOGICĂ A BOLII LIMBII ALBASTRE ÎN EUROPA ȘI ROMÂNIA

CHAPTER II THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION OF BLUETONGUE DISEASE IN EUROPE AND ROMANIA

Bluetongue are un impact economic semnificativ, în principal datorită efectului bolii asupra animalelor (morbiditate, mortalitate, insuficiență de reproducere, reducerea producției de lapte și slăbirea animalelor) și, mai ales, perturbării comerțului internațional de animale și produse animale (Saegerman ș.a., 2008).

La ora actuală, la nivel mondial au fost identificate 27 de serotipuri imunologic distincte ale virusului *Bluetongue* (BTV) (Schwartz-Cornil ș.a. 2008, Chaignat ș.a., 2009, Mann ș.a. 2011).

Bluetongue este o boală endemică în multe regiuni tropicale, subtropicale și temperate ale lumii (America, Australia, Africa și unele regiuni din Asia), între latitudinile 40°S și 53°N, în perioadele optime ale anului pentru activitatea vectorială (Mellor ș.a. 2000).

2.1. Evoluția bolii limbii albastre în Europa

Europa a cunoscut doar incursiuni sporadice de *Bluetongue*, implicând un singur serotip de virus în fiecare focar de boală (Mellor și Boorman 1995). Cu toate acestea, din 1998, probabil din cauza schimbărilor climatice, virusul *Bluetongue* s-a răspândit înspre Bazinul Mediteranean, unde au fost identificate cinci serotipuri (1, 2, 4, 9 și 16) (Purse ș.a., 2005, Savini ș.a., 2008, Maclachlan ș.a. 2010; Moulin ș.a. 2012).

În 1999, apar rapoarte de focare cu *Bluetongue* din zonele endemice din Grecia, Italia, Franța (Corsica), Spania și Portugalia. Conform, Organizației Mondiale pentru Sănătatea Animalelor (OIE), astfel de episoade au avut loc și în Europa: în Albania, Bosnia și Herțegovina, Bulgaria, Cipru, Croația, Republica Macedonia, Serbia, Muntenegru și Turcia (OIE, 2010; European Commission Decision; 2009/19).

În vara anului 2006, pentru prima dată, virusul *Bluetongue* a traversat latitudinea 50 °N și au apărut focare de *Bluetongue* produse de serotipul 8 (BTV-8) în Europa de Nord-Vest: Olanda, Belgia, Germania, Franța și Luxemburg (Szmaragd ș.a., 2007; Wilson și Mellor 2008, EC.2017). În 2007-2008, situația *Bluetongue* s-a deteriorat, BTV-8 răspândindu-se în celelalte regiuni din Europa, iar numărul focarelor a crescut rapid (au

fost raportate aproximativ 50000 cazuri de BT). În plus, au fost detectate două noi serotipuri: BTV1 și BTV6 (Wilson și Mellor 2009). Implementarea programelor de vaccinare obligatorie *Bluetongue* în Europa în primăvara anului 2008, a dus la reducerea cazurilor de BTV-8 de la aproximativ 50000 în 2007-2008 la 350 în 2009 și 19 în 2010. Ultimul caz de *Bluetongue* determinat de serotipul 8 a fost raportat în mai 2011 în nordul Sardiniei (Italia) (E.C.2017; <http://eubtnet.izs.it/btnet.reports/BTV8.html>).

În august 2006, autoritățile olandeze, belgiene și germane au anunțat oficial Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (OIE) despre apariția și confirmarea unui focar de febră catarală la oile dintr-o fermă din provincia Limburg. Autoritățile olandeze, belgiene și germane au luat măsuri clasice de combatere a bolilor, cum ar fi zonarea și controlul mișcării dar și supravegherea continuă în țară.

În septembrie 2007, în Marea Britanie, a fost raportat primul caz de boală *Bluetongue*, la o vacă de la o fermă de lângă Ipswich, Suffolk. Din august 2006 până în septembrie 2007, în Germania este confirmată boala la 1.833 de ferme iar într-o săptămână numărul fermelor afectate a crescut la 5.686. Originea infecției nu a fost clară, dar a fost una dintre cele mai importante boli care au evoluat în Europa de Nord, cel mai probabil, ca urmare a încălzirii globale.

În octombrie 2007, *Bluetongue* evoluează pe teritorii tot mai extinse din Scandinavia și Elveția și a fost raportat primul focar în Danemarca. În toamna anului 2008, au fost raportate mai multe cazuri în provinciile sud-suedeze Småland, Halland și Skåne, precum și în zonele Olandei de la granița cu Germania.

Norvegia a înregistrat prima sa semnalare de boală în februarie 2009, la vacile din două ferme din Vest-Agder, în sudul Norvegiei. În 2011, Norvegia a fost declarată indemnă la boala *Bluetongue*. În aprilie 2008, în Comisia Europeană, la Direcția de Sănătate și Bunăstare animală, au fost prezentate rezultatele preliminare privind posibilitatea de transmitere placentară a BTV-8. Toate aceste dezbateri și rezultate au pornit de la un caz în Irlanda de Nord cu 54 de viței din 20 de ferme au fost infectate trans-placentare în proporție de 1/3 cu BTV-8. Același mod de transmitere a fost observat și în fermele din Belgia, Olanda și Slovacia, dar în Spania rezultatele dovedite nu au identificat niciun caz de transmisie transcentrală cu BTV-1 la viței. BTV8 a evoluat în toată Europa determinând în perioada 1998 și 2005 multiple focare de boală în sudul Europei, iar în 2006, BTV-8 a fost raportată în nordul Europei. BTV-8 s-a răspândit pe scară largă din 2006 până în 2008. Se utilizează vaccinarea obligatorie a ovinelor și bovinelor în Marea Britanie (2007) și Scoția (2008).

În 2010 au fost înregistrate focare izolate de boala limbii albastre produse cu BTV-1, BTV-2, BTV-4 și BTV-8 în Sudul și Sud-Vestul Europei. În 2011, doar 9 focare cu *Bluetongue* au fost înregistrate în Sudul Europei și 2 focare în Sud-Vestul Europei, cu aceleași serotipuri, plus BTV-9 (Carpenter ș.a.2011). În anul 2012, evoluția *Bluetongue* a produs câteva focare cu serotipuri BTV-1, BTV-2, BTV-4 și BTV-9 în aceleași zone.

La începutul anului 2014, serotipul BTV-4a fost izolat în Corsica (Franța), unde au fost raportate 137 de focare. Mai mult, patru cazuri BTV-1 au fost înregistrate în vestul Spaniei (provincia Caceres), 59 de cazuri BTV-4 în sudul Spaniei (Andaluzia) și 10 în

regiunea Algarve din Portugalia. În perioada mai-iulie 2014, în Grecia au fost confirmate aproximativ 200 de focare de BTV-4 (regiunile Peloponessus și Evros). La 4 iulie, primul focar de BTV-4 a fost, de asemenea, raportat la sudul Bulgariei (regiunea Burgas, lângă granița cu Turcia), iar până la 5 septembrie 2014 boala a fost confirmată în 21 din 28 de districte administrative ale Bulgariei. În plus, la 21 august 2014, primul focar de boală a fost notificat în sud-estul României, iar pentru 8 septembrie 184 focare de BTV4 au fost confirmate în 17 județe ale acestei țări (<http://ec.europa.eu>). Zonele afectate de *Bluetongue* în Europa, începând cu 3 septembrie 2014, au fost următoarele (fig. 2.1):

- Zona B - BTV2 și BTV 16, Italia-regiuni Abruzzo, Campania și Molise.
- Zona D - BTV16, Italia- regiunile Basilicata și Umbria (cu excepția zonei Z).
- Zona G - BTV1, BTV 2, BTV 4 și BTV 16, Italia- Regiunea Sarna (cu excepția zonei T).
- Zona H - Serotipurile BTV neprecizate, Malta (întreg teritoriul).
- Zona I - BTV1 și BTV 4: Spania- provincii Huelva, Cadiz, Malaga, Sevilla și Portugalia, regiunea Algarve.

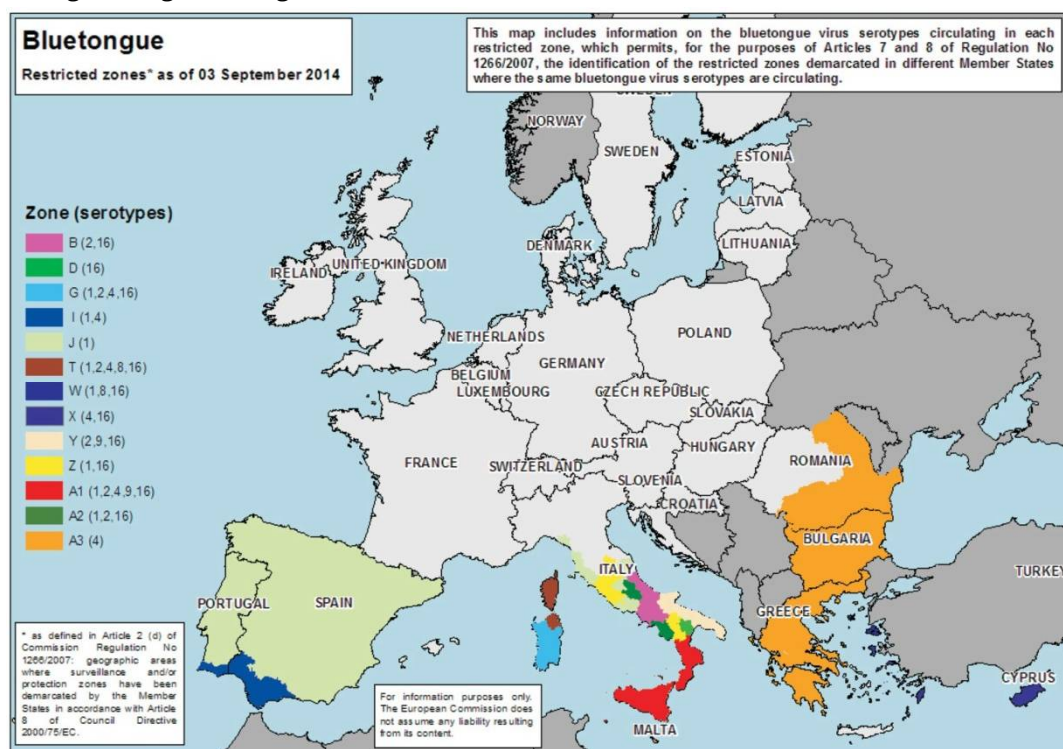


Fig.2.1. Harta epidemiologică a Europei cu zonele afectate de virusul *Bluetongue*, în septembrie 2014 (<http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/control-measures/bt-restrictedzones-map.jpg>)

Fig.2.1. Epidemiological map of Europe with areas affected by the *Bluetongue* virus, in September 2014

- Zona J - BTV1, Spania, întreg teritoriul (cu excepția zonei I), Portugalia-întregul teritoriu continental (cu excepția zonei I) și Italia- regiuni Lazio, Liguria, Marche și Tosca.
- Zona T - BTV1,BTV 2,BTV 4, BTV 8 și BTV16, Franța, Corsica și Italia-regiunea Sardegna (numai provincia Olbia Tempio).
- Zona W - BTVBTV1, BTV8 și BTV16, Grecia- insula Lesbos.
- Zona X - BTV4 și BTV16, Cipru- întreg teritoriul și Grecia, insulele Dodekanisa și Samos.
- Zona Y - BTV2, BTV 9 și BTV 16, Italia- regiunea Puglia.
- Zona Z - BTV1, BTV 16, Italia- regiunea Lazio (provinciaViterbo), Basilicata (provincia Potenza) și Umbria (provincia Terni).
- Zona A1 - BTV1, BTV 2, BTV 4, BTV 9 și BTV 16, Italia, regiunile Calabria și Sicilia.
- Zona A2 - BTV1, BTV 2 și BTV 16, Italia- regiunea Campania (doar provincia Salerno) și Abruzzo (doar provincia Aquila).
- Zona A3 - BTV4, Grecia- toată Grecia continentală, plus insula Kerkyra și Lefkada (Defra, 2014).

***Bluetongue* la animalele sălbatice**

Bluetongue evolueazăendemicla animalele sălbatice în majoritatea regiunilor din Africa și America de Nord (Gerdes 2004).

Rumegătoarele sălbatice sunt incluse în Directiva 2000/75 / CE a Consiliului European din 20 noiembrie 2000, care stabilește dispoziții specifice pentru controlul și eradicarea febrei catarale, dar campaniile de vaccinare nu pot fi aplicate la gazdele sălbatice unde virusul *Bluetongue* evoluează liber. Majoritatea speciilor de rumegătoare sălbatice sunt sensibile la infecția cu virusul *Bluetongue*. Cu toate acestea, animalele infectate, de obicei, nu prezintă semne clinice, în special animalele indigene din regiunea în care *Bluetongue*este endemică (Johnson ș.a., 2006).

Deși au fost instituite măsuri de control obligatorii ale Uniunii Europene pentru a controla răspândirea boliila animale, rolul rumegătoarelor sălbatice ca și gazde sensibile, ar trebui să fie luat în considerare în orice strategie de control al bolii *Bluetongue* (Fernandez-Pacheco ș.a, 2008). Pentru a cunoaște rolul animalelor sălbatice în epidemiologia bolii *Bluetongue*,de-alungul timpul au fost cercetate mai multe specii de rumegătoare și camelide sălbatice în vederea stabilirii posibilului rolul în monitorizarea *Bluetongue* (Fernandez-Pacheco ș.a., 2008).

Supravegherea virusologică și serologică a bolii *Bluetongue* la animalelor sălbatice se realizează sistematic timp de mai mulți ani, în diferite regiuni ale Europei (Linden ș.a. 2008, García ș.a 2009, Rodriguez-Sanchez ș.a. 2010)

Cele mai mari titruri de anticorpi BTV au fost detectate în eșantioane de seruri prelevate de la cerbi și căprioare europene (*Dama dama*), din subfamilia *Cervinae* (Ruiz-Fons ș.a. 2008, Garcia ș.a., 2009, Linden ș.a, 2009).

ARN-ul serotipului BTV- 8 a fost detectat prin RT-PCR în timp real (rRT-PCR) la cerbii sălbatici infectați natural în Belgia (Linden ș.a., 2008), iar materialul genetic al BTV-1 și BTV-4 a fost identificat în sângele de cerb și muflon european din Spania (Garcia ș.a., 2009), în timp ce ARN-ul serotipurilor BTV1 și BTV8 a fost evidențiat la cerbii din Franța (Rossi ș.a. 2010).

Focarele de *Bluetongue* au avut o evoluție sezonieră în Europa, boala evoluând în general la sfârșitul verii și la începutul toamnei. Această variație sezonieră este în raport cu densitatea insectelor vectoriale, a căror evoluție depinde de factorii climatici, cum ar fi umiditatea și temperatura (Sleeman ș.a., 2009). În afară de sezonul anual, există cicluri interanuale în apariția *Bluetongue*. În zonele endemice din America de Nord, populațiile de căprioare sunt infectate cu cicluri de la unu la trei ani, în timp ce în zonele epidemice, boala apare într-un ciclu de opt până la zece ani. Aceste cicluri pot fi asociate cu efectele combinate ale imunității efectivelor și fluctuațiilor populațiilor vectoriale (Howerth ș.a. 2001). Mai mult, virusul *Bluetongue* poate fi transmis în mod excepțional de către vectori alternativi, de ex. căpușe (Bouwknegt ș.a. 2010). Au fost sugerate posibile mecanisme de transmitere a virusului *Bluetongue* prin traversare transplacentară, colostru, spermă, plăgi, etc. (Menzies ș.a. 2008, Lopez-Olivera ș.a. 2010, Santiago-Moreno ș.a. 2010).

Fauna sălbatică, în special erbivorele rumegătoare, din cauza distribuției lor tot mai largi în Europa, ar putea fi folosite ca sentințele pentru supravegherea *Bluetongue*. Anticorpii anti- BTV au fost identificați la cerbii europeni la scurt timp după ce au fost detectați la animale domestice (Linden ș.a. 2008, Ruiz-Fons ș.a. 2008, Rodriguez-Sanchez ș.a. 2010). Anticorpi specifici pentru virusul *Bluetongue* precum și ARN viral au fost detectați la rumegătoarele sălbatice chiar și la un an după remisia virală la rumegătoarele domestice din regiunea monitorizată (Rodriguez-Sanchez ș.a. 2010).

Datele epidemiologice confirmă mai multe cazuri de infecție cu virusul *Bluetongue* în rândul rumegătoarelor domestice din regiunile în care există animale sălbatice, în special din familia *Cervus*. Ca urmare, ungulatele sălbatice pot acționa ca un rezervor pentru virusul *Bluetongue* și joacă un rol important în transmiterea acestuia (Niedbalski, 2015).

2.2. Evoluția *Bluetongue* în România

În România, supravegherea *Bluetongue* a fost introdusă încă din 2000, iar supravegherea entomologică din 2005, când au fost identificați vectorii aparținând speciei *C. obsoletus*, *C. pulicaris*, *C. nubeculosus*.

În septembrie 2008, o parte a teritoriului României a fost integrată într-o zonă de supraveghere din cauza focarului de *Bluetongue* (BLV 8) pe teritoriul Ungariei.

În 2014, în urma apariției focarelor cu BTV-4 în Grecia și Bulgaria, au fost emise alerte zilnice cu scopul informării și intensificării supravegherii și a măsurilor de control al circulației animalelor.

Ca urmare, în august 2014, în România a fost semnalat și diagnosticat primul caz de *Bluetongue* în județul Buzău. După prima notificare, numărul de cazuri raportate a avut

o evoluție fulminantă. Astfel, la 27 august, la doar 5 zile de la confirmarea primului caz, ANSVSA a confirmat la Buzău 28 de focare de infecție fiind afectate 73 de bovine și 5 oi. În doar 2 zile de la alertă, boala s-a răspândit pe o arie largă, care a inclus pe 29 august 12 orașe și 49 de focare. Pe 4 septembrie, boala a cuprins 12 județe fiind identificate 63 de focare de boală care au afectat 447 de animale din care 47 au murit. La doar patru săptămâni de la prima apariție a BTV- 8, au fost semnalate focare de boală în 130 de orașe din 22 de județe, fiind identificate 130 de animale moarte și 757 de animale bolnave. Aproape jumătate din numărul total de bovine, caprine și ovine înregistrate la sfârșitul anului 2013 în România, adică aproximativ 6 milioane de animale aveau risc de contaminare virală. Cazurile de boală au fost raportate cu precădere în gospodăriile mici, mai degrabă decât în unitățile de creștere intensivă. Deși procentul de animale afectate de boală, în cele 22 de județe, este relativ mic (0,01%), epidemia nu a fost stopată. Răspândirea virusului în perioada august-septembrie s-a datorat în principal condițiilor meteorologice (precipitațiilor abundente și a temperaturilor ridicate), favorabile proliferării vectorilor *Culicoides*. Până pe 3 decembrie 2014, au fost confirmate focare de Bluetongue (BTV-4) în 34 din cele 42 de județe din țara noastră (Moț ș.a., 2018).

La 4 septembrie 2015, Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor (ANSVSA) a informat că a pus diagnosticul de *Bluetongue* în Bobulești, județul Botoșani, în apropierea râului Prut și la granița cu Republica Moldova. Ulterior, animalele infectate au fost identificate și în alte două localități din aceleași zone, respectiv Badiuți și Ștefănești. Până la această dată, boala a fost confirmată la 18 bovine din 18 exploatații.

În perioada 2014-2017, s-a recurs la vaccinarea animalelor receptive, fiind vaccinate 208.330 bovine și 190303 ovine.

Specialiștii în domeniu au ajuns la concluzia că România poate controla și elimina boala limbii albastre doar vaccinând toate animalele rumegătoare pentru o perioadă de trei ani. Regulamentul (CE) nr. 1266/2007 al Comisiei Europene (art.8) prevede ca scutirile de la interdicția de ieșire, trebuie să se bazeze pe măsuri de atenuare a riscurilor prezentate în anexa III din regulament sau pe orice alte garanții adecvate pentru sănătatea animală, obținute pe baza rezultatului pozitiv la evaluarea riscurilor. Aceste aspecte trebuie convenite între autoritatea competentă a locului de origine și aprobat de autoritatea competentă a locului de destinație (European Commission, 2018)

Comisia Europeană a centralizat și a actualizat situația focarelor de *Bluetongue* în Europa. Datele arată că, în majoritatea țărilor, situația bolii limbii albastre este sub control, cu excepția Franței și a Italiei, unde au apărut numeroase focare de boală în 2016 și 2017 (Paul ș.a., 2016; Femke Feenstra ș.a., 2017).

În România, conform ANSVSA în Declarația României privind redobândirea statului de țară indemnă formulată în 2018, ultimul focar de *Bluetongue* (BTV4) a fost raportat la 24 noiembrie 2015, iar forcarul a fost stins la 4 ianuarie 2016.

**PARTEA a II- a
CONTRIBUȚII PERSONALE**

**SECOND PART
PERSONAL CONTRIBUTIONS**

CAPITOLUL III

SCOPUL CERCETĂRILOR, OBIECTIVELE PROPUSE ȘI CADRUL ORGANIZATORIC

CHAPTER III

PURPOSE OF THE RESEARCH, OBJECTIVES AND ORGANIZATIONAL FRAMEWORK

Boala Limbii albastre este cunoscută din a doua jumătate a secolului al IX-lea, fiind corelată cu creșterea intensivă a ovinelor din rasa Merinos, în Africa de Sud. De-a lungul timpului, boala s-a extins până în nordul Africii, țările arabe, Asia, Australia și chiar SUA. În Europa, primele îmbolnăviri au fost semnalate în țările balcanice și la Nord de Marea Mediterană. Această extindere rapidă a bolii a fost posibilă datorită vectorilor *Culicoides* care pot transmite virusul *Bluetongue* și care și-au lărgit arealul datorită schimbărilor climatice și au migrat tot mai mult din zona Africii.

Suspectarea animalelor de boala limbii albastre depinde de semnele clinice tipice, de prevalența insectelor vectori necesare și, în special, de zonele în care boala are un caracter endemic. Sunt necesare analize de laborator pentru ca diagnosticul să poată fi confirmat. Insectele sunt principalul vector de transmitere al virusului bolii limbii albastre de la un animal la altul. Vectorii sunt infectați cu virusul bolii limbii albastre la contactul cu sângele ingerat de la animale infectate. Fără acest vector, boala nu se poate răspândi de la animalele infectate la alte animale. Boala limbii albastre nu prezintă niciun risc pentru sănătatea publică.

În ultimele decenii, Europa a devenit un spațiu tot mai expus pentru *Bluetongue*. Cauzele care stau la baza propagării bolii sunt diverse și ca urmare, distribuirea a fost aproape uniformă traversând întreg continentul, ajungând inclusiv în Nordul Europei (Wilson ș.a., 2009).

În regiunile în care boala este endemică, programele de monitorizare tip „santinelă”, presupun prelevarea de probe de sânge în mod activ de la animale din grupuri-santinelă pentru a supraveghea prezența și circulația virusului (EFSA, 2017).

Supravegherea febrei catarale ovine în România a început în anul 2006, ca urmare a *Programului acțiunilor de supraveghere, prevenire și control al bolilor la animale, al celor transmisibile de la animale la om, protecția animalelor și protecția mediului*, aprobat prin Ordinul președintelui Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor nr. 300/2006, care a avut ca scop creșterii eficienței și calității

sistemelor de supraveghere a principalelor transmisibile, în vederea identificării precoce a apariției unor epidemii și aplicării unor măsuri adecvate de control (HG 730/2000). În cadrul acestui program, au fost stipulate etapele privind depistarea precoce a febrei catarale la ovinele din România, intervenția urgentă și eficientă în cazul apariției unui focar; stabilirea prezenței vectorilor transmițători și a zonelor unde aceștia supraviețuiesc și identificarea zonelor favorizante pentru evoluția febrei catarale ovine în România.

În România, primul caz de *Bluetongue* a fost semnalat pe 22 august 2014 în județul Buzău. După prima notificare, numărul cazurilor semnalate a avut o evoluție fulminantă. Astfel, la doar 5 zile de la confirmarea primului caz, ANSVSA a confirmat la Buzău 28 de focare de infecție fiind identificate 73 de bovine și 5 ovine cu forme clinice de *Bluetongue*. În doar 7 zile de la alertă, boala s-a extins în județele învecinate, fiind semnalate 49 de focare. Pe 4 septembrie, *Bluetongue* s-a răspândit în 12 județe, declanșând 63 de focare de boală fiind afectate 447 de animale (ANSVSA, 2014). Serotipul identificat pe teritoriul României a fost BTV 4, așa cum a fost raportat în WAHIS la 3 septembrie 2014 și confirmat de laboratorul de referință al OIE la Pirbright la 1 octombrie 2014. Distribuția rapidă a virusului *Bluetongue* în lunile august-septembrie a fost consecința condițiilor climatice prielnice proliferării vectorilor culicoizi existenți la acea dată în regiune. În aceste condiții, posibilitatea ca virusul *Bluetongue* să persiste și să fie distribuit în toate regiunile țării, era o certitudine.

În urma difuziunii infecției cu virusul *Bluetongue*, începând cu 2014, în România a fost implementat un program de monitorizare și eradicare a bolii, în scopul demonstrării absenței unor noi cazuri infectate cu serotip BTV 4 și să detecteze noi incursiuni serotipice în România. Programul de monitorizare a avut trei componente: serologice, virologice și entomologice (ANSVSA, 2014).

Având în vedere situația epidemiologică declanșată în 2014, ne-am propus ca în perioada 2014-2017, să participăm la prelevarea probelor de sânge, evaluarea și testarea în laborator, la centralizarea și compararea datelor obținute și la monitorizarea *Bluetongue* în Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea, trei dintre aceste județe fiind învecinate cu zona unde a evoluat primul focar de boală.

Pentru realizarea acestui deziderat, în perioada 2014-2017 au fost stabilite următoarele obiective:

- supravegherea serologică a bolii limbii albastre la rumegătoare domestice.
- supravegherea virusologică a bolii limbii albastre la rumegătoare domestice.
- capturarea și identificarea vectorilor transmițători ai virusului bolii limbii albastre.
- aspectele clinice și lezionale identificate la rumegătoarele semnalate cu boala limbii albastre.

Activitățile de cercetare s-au desfășurat în perioada 2014-2017, în Laboratoarele de Serologie virală, Laboratoarele de Biologie moleculară și în Laboratoarele de Parazitologie din cadrul DSVSA județene.

CAPITOLUL IV

INVESTIGAȚII PRIVIND SUPRAVEGHEREA SEROLOGICĂ ÎN BOALA LIMBII ALBASTRE LA RUMEGĂTOARELE DIN REGIUNEA DE SUD-EST A ROMÂNIEI

CHAPTER IV

INVESTIGATIONS REGARDING THE SEROLOGICAL SURVEILLANCE IN THE BLUETONGUE DISEASE IN RUMINANTS IN THE SOUTH-EAST REGION OF ROMANIA

La nivel mondial, supravegherea epidemiologică a bolii limbii albastre s-a efectuat cu scopul prevenirii și constituirii unor rețele de epidemio-supraveghere care să cuprindă: detecția virusului *Bluetongue* circulant, identificarea vectorilor și a arealului de răspândire a acestora; stabilirea zonelor de risc pentru *Bluetongue*; monitorizarea documentelor specifice supravegherii epidemiologice și monitorizarea clinică a animalelor receptive sau a celor semnalate cu suspiciuni de boală.

În România, supravegherea epidemiologică pentru boala limbii albastre, a fost legiferată prin ordinul nr.154/2007, publicate în MO al României nr.580/2007, care aprobă normele sanitar veterinar privind această strategie.

În ansamblu, obiectivele generale ale programelor de monitorizare a bolii limbii albastre, s-au axat pe depistarea virusului *Bluetongue* și demonstrarea prezenței și absenței circulației anumitor serotipuri virale la animalele receptive precum și identificarea vectorilor transmițători (speciile de vectori, perioada de inactivitate a acestora, etc.) în noi areale geografice, (EC nr.1108/2008). Pentru realizarea acestui deziderat s-au elaborat proceduri structurate pe două direcții epidemiologice: **o supraveghere activă și o supraveghere pasivă**, fiecare dintre acestea având metodologii clare de aplicare.

Supravegherea pasivă a fost aplicată în zonele libere de *Bluetongue* și a avut ca scop principal identificarea, notificarea și raportarea precoce a animalelor receptive cu suspiciuni de boală și de la care s-au recoltat probe de sânge pentru investigații serologice și virusologice. De asemenea, s-a avut în vedere monitorizarea documentelor sanitar veterinar relevante pentru transportul animalelor receptive în cadrul activităților de comerț intracomunitar și import.

Supravegherea activă a constat în efectuarea *screening*-ului serologic care face parte din panelul de măsuri aplicate pentru controlul și eradicarea bolii limbii albastre și

care s-a realizat în conformitate cu *Programul de supravegherea bolii limbii albastre în România* elaborat în anul 2014 (Decizia nr. 722/2013/UE).

În studiu, s-a evidențiat indicele de incidență a anticorpilor specifici anti-BTV, la rumegătoarelor domestice din regiunea Sud-Est a României. Acest areal geografic este situat în imediata apropiere a județului Buzău, unde s-a manifestat primul focar de *Bluetongue* și de asemenea, se găsesc toate condițiile topo-climaterice pentru ca această boală să se propage.

Supravegherea serologică a fost efectuată pe animalele receptive (bovine, ovine și caprine) existente în localitățile desemnate (localități țintă) în cadrul unităților epidemiologice, identificate în urma carotajului teritorial de 50-50 km (2500 km²) și calculate în funcție de suprafața fiecărui județ: Galați, Brăila, Vrancea și Tulcea. Identificarea acestor circumscripții sanitare veterinare de asistență țintă a fost realizată de către DSVSA județene cu acordul ANSVSA (fig.4.1.)

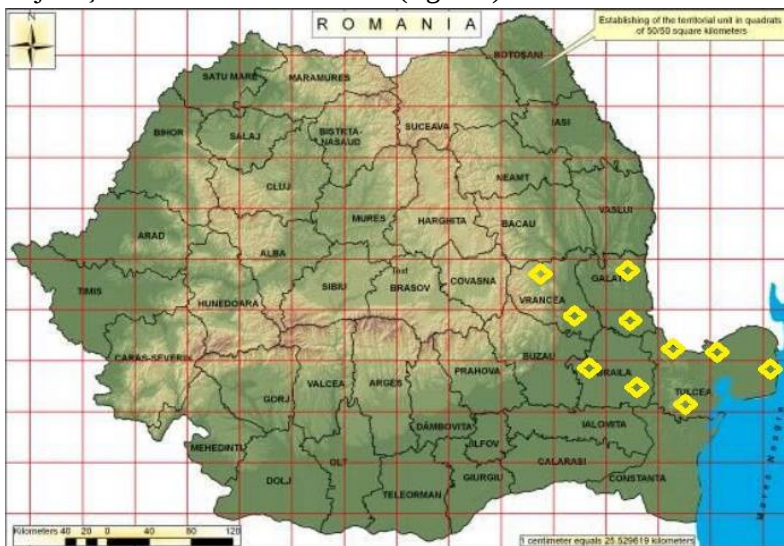


Fig. 4.1. Distribuția teritorială a Circumscripțiilor Sanitar Veterinare de asistență țintă, în județele Galați, Brăila, Vrancea, Tulcea

Fig. 4.1. Territorial distribution of veterinary units in the Galați, Brăila, Vrancea, Tulcea

Conform regulamentelor europene, pentru monitorizarea și supravegherea bolii limbii albastre, numărul minim de animale santinelă într-o unitate geografică de referință trebuie să fie reprezentativ și suficient pentru depistarea incidenței lunare a seroconversiei de 2 % cu un nivel de încredere de 95 % (E.C.1266/2007).

Pentru a nu influența serosupravegherea virusului *Bluetongue*, animalele selectate nu au fost niciodată vaccinate sau imunizate. În România, pentru toate speciile receptive (bovine, ovine, caprine) a fost stabilit un număr de 10 animalele santinelă. Selectarea animalelor santinelă, incluse în programul de monitorizare serologică, s-a efectuat pe baza analizelor serologice efectuate prin tehnica imunoenzimatică de competiție/blocare (ELISA) care au confirmat absența anticorpilor anti BTV, în perioadele libere de vectori (ianuarie-februarie)(Ord.35/2016).

4.1. Supravegherea serologică în județul Galați

Județul Galați are o suprafață de 4466 km² și în anul 2014, deținea un număr de 388985 rumegătoare domestice, dintre acestea 39.759 fiind bovine, 263.136 ovine și 86.090 caprine.

Având în vedere poziția sa geografică, în proximitatea județului Buzău unde au fost semnalate primele focare de boală extinderea virusului în prezența vectorilor culicoizi existenți a fost doar o problemă de timp. Ca urmare, anul 2014 reprezintă prima notificare a bolii în județul Galați.

4.1.1 Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, au fost testate 3052 probe de seruri, obținute de la rumegătoarele domestice (tabel 4.1.).

Tabel 4.1. /Table 4.1.

Distribuția numerică a probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele din județul Galați
Numerical distribution of blood samples collected from ruminants of the Galați

JUDEȚE	SPECII	ACȚIUNI	PERIOADA				
			2014	2015	2016	2017	TOTAL PROBE
GALAȚI	bovine	SP	275	1064	293	534	2166
		SB	5	65	0	636	706
	ovine	SP	0	0		0	
		SB	0	0		0	
	caprine	SP	0	0		0	
		SB	0	0		180	180
	TOTAL PROBE/AN		280	1129	293	1350	3052

Abrevieri: SP- supraveghere serologică; SB- suspiciuni de boală

Probele de ser au fost recoltate de la **animalele santinelă**, seronegative la *Bluetongue*, nevaccinate, cu vârsta cuprinsă între 4 luni și 3 ani, aflate în circumscripții sanitar veterinar de asistență țintă (tabelul 4.2.) precum și de la **animalele care au fost semnalate cu suspiciune de boală**. Prelevările s-au efectuat în lunile iunie, septembrie și noiembrie.

Tabel 4.2./Table 4.2.

Unitățile țintă de asistență sanitar veterinară conform Programului Național de Supraveghere a *Bluetongue*(Ord.35/2016).

The veterinary assistance units according to the National *Bluetongue* Surveillance Program (Ord.35 / 2016).

JUDETUL	Suprafața totală a județului/km ²	Nr. de C.S.V. de asistență țintă	Localitățile țintă
GALAȚI	4466	2	Drăgușeni Smârdan

A. Prelevarea și condiționarea probelor biologice

Prelevarea și transportul probelor biologice s-a efectuat în conformitate cu reglementările în vigoare, specificate în procedurile și documentația „Programului

strategic de supraveghere și în *Manualul operațional Bluetongue*”, ediția II-a 2014, metodologia fiind respectată în mod riguros.

Pentru identificarea serologică a anticorpilor anti-BTV la rumegătoarele din arealul luat în studiu, s-au recoltat probe de sânge venos, în vacutainere sterile fără anticoagulant. În paralel, s-au recoltat și probele de sânge pe EDTA în vederea efectuării examenului virusologic prin tehnica *Real time-RT-PCR*.

După prelevare, probele au fost ambalate, etichetate și prelucrate conform *Ordinului 25/2008* pentru aprobarea *Normei sanitare veterinare privind metodologia de prelevare, prelucrare primară, ambalare și transport al probelor destinate examenelor de laborator în domeniul sănătății animalelor*. Transportul probelor de sânge s-a realizat în condiții corespunzătoare de temperatură (4°C), în lăzi izoterme închise și sigilate, dezinfectate la exterior și etichetate cu mențiunea interzicerii deschiderii lăzilor în afara laboratorului.

Toate probele s-au prelucrat în Laboratorul de serologie din cadrul DSVSA Galați.

Metoda și etapele de lucru aplicate pentru testarea serologică au corespuns *Manualului OIE de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre*, cap.2.1.3., *Bluetongue*, ed.VII, 2014.

Serul obținut în urma coagulării probelor de sânge, a fost repartizat în micronix de 1 ml și au fost testate imediat sau congelat în vederea testării ulterioare.

B. Testul imunoenzimatic ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Testările serologice s-au efectuat cu scopul de a detecta prezența anticorpilor specifici virusului *Bluetongue* la rumegătoarele domestice din arealul luat în studiu.

Testul ELISA reprezintă la ora actuală, una dintre cele mai folosite metode de identificare și apreciere cantitativă a anticorpilor sau antigenelor. În general, principiul metodei se bazează pe reacția antigen-anticorp.

Testul ELISA pentru identificarea anticorpilor presupune că antigenul este legat la placă (antigen de captură) recunoaște și fixează anticorpii din proba de cercetat. Aceștia, la rândul lor, recunosc și fixează anticorpi-anti-anticorpi cuplați cu enzima (conjugatul imunoenzimatic) care descompune substratul specific producând oxidarea unui cromogen ce își schimbă culoare. Intensitatea acesteia se măsoară la spectofotometru, la o lungime de undă adecvată cromogenului și se exprimă în unități densitate optică (DO). În acest caz există o relație directă între cantitatea de anticorpi din probă și valoarea DO.

a. Materiale necesare efectuării acestei tehnici:

- Kituri ELISA,
- Cititor de microplăci tip TECAN SUNRISE,
- Centrifugă pentru tuburi sau microtuburi,
- Sistem de agitare tip vortex,
- Sistem de spălare a microplăcilor ce permite distribuirea a 300 microlitri pe godeu tip TECAN COLUMBUS ,
- Sistem de calcul cu imprimantă tip software MAGELAN,
- Pipete automate monocanal și multicanal de 10 microlitri și 100 microlitri,
- Vârfuri de pipetă de unică folosință,

- Cilindru gradat de 500 ml,
- Cititor de plăci 96 godeuri,
- Apă ultra pură (MilliQ sau bidistilată),
- Dispozitiv pentru aspirarea și depunerea în placă a soluției de spălare,
- Recipiente pentru soluția de aspirare și dezinfectant,
- Folii sigilante pentru plăci,
- Incubator de +37°,
- Congelator.

În Laboratorul de Serologie virală din județul Galați s-a utilizat kitul **ELISA Pourquier de competiție (IDEXX-Franța)** pentru detectarea anticorpilor specifici ai proteinei VP7 a virusului *Bluetongue* din serul și plasma rumegătoarelor.

b. Tehnica de lucru pentru kitul ELISA Pourquier de competiție (IDEXX-Franța)

Reagenți utilizați:

- Microplăci căptușite cu proteina VP7-BTV
- Control pozitiv
- Control negativ
- Conjugat concentrat (anti+VP7 HRPO)
- Tampon de diluție
- Substrat TMB
- Soluție de stopare
- Soluție de spălare concentrată (20x)

Cu excepția conjugatului, toate componentele kitului au fost aduse la temperatura de 21 °C înainte de efectuarea reacției.

Descrierea și principiul:

Microplăcile sunt căptușite cu proteina recombinată VP7. Probele de ser se diluează și se incubează după care se adaugă anticorpii specifici VP7, formându-se un complex imun cu VP7. În prezența complexului imun anticorpi VP7, conjugatul este împiedicat să se lege la epitopii corespunzători de pe placă. Conjugatul rămas nelegat, a fost spălat urmând a fi adăugat substratul enzimatic (TMB). În prezența enzimei, substratul este oxidat și se dezvoltă un compus albastru care devine galben după blocare. Intensitatea culorii este corelată cu cantitatea de anticorpi anti-VP7 din proba de testat. Relevanța diagnosticului rezultatului este obținută prin compararea densității optice (DO) a probelor testate cu media densității optice a controlului negativ.

Tehnica de lucru pentru kitul ELISA Pourquier de competiție:

- Probele au fost repartizate după cum urmează (fig 4.2.):
 - o 80 μl pe godeu tampon de diluție 2,
 - o 20 μl martor pozitiv nediluat în godeul A1 (fig.4.3.),
 - o 20 μl martor negativ nediluat în godeurile B1 și C1 (a se vedea adnotările 1 și 2).
 - o 20 μl seruri de testat în restul godeurilor (1 godeu/ probă)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Observatii
A	P												P = martor pozitiv
B	N												N = martor negativ
C	N												1 = proba nr. 1
D	1												2 = proba nr. 2
E	2												3 = proba nr. 3
F	3												... = restul probelor
G	4												
H	...												

Fig. 4.2. Modelul de distribuție al probelor în godeuri**Fig.4.2. Distribution model of the samples in the wells**

- S-a omogenizat conținutul godeurilor prin agitare ușoară a plăcii utilizând un agitator de microplăci.
- Microplăcile s-au acoperit cu capac cu folie adezivă și s-au incubat 15 minute la 21°C (fig.4.4.).

**Fig. 4.3. Repartizarea martorilor****Fig.4.3.Distribution of witnesses****Fig. 4.4. Incubarea plăcilor****Fig.4.4. Incubation of plates**

- Soluția de spălare și conjugatul s-au preparat în avans, după cum urmează:
 - a) – S-a diluat un flacon de soluție de spălare concentrată x 20 în 1900 ml apă distilată (sau cât este necesar). Această soluție este numită „soluție de spălare”.
 - b)- S-a diluat conjugatul 1/20 în Soluția de spălare(ex. 500 microlitri conjugat + 9500 microlitri soluție de spălare , ce reprezintă cantitatea necesară pentru efectuarea unei plăci);
- Fără golirea și spălarea godeurilor, s-a repartizat câte 100 μl conjugat în fiecare godeu (fig.4.5.) și s-a repetat incubarea timp de 15 minute la 21°C.

**Fig. 4.5. Repartizarea conjugatului****Fig.4.5. Distribution of the conjugate**

- Spălarea a constat în îndepărtarea conținutului godeurilor prin răsturnarea microplăcii sau prin metode automatizate, urmat de umplerea godeurilor cu 300 µl soluție de spălare după care s-a repetat operațiunea de 3 ori.
- După spălare, în fiecare godeu s-a adăugat câte 100 µl de substrat TMB.
- După incubare timp de 10 minute la 21°C, plăcile au avut culoarea albastră (fig.4.6.) care după blocarea reacției, culoarea a virat în galben(fig.4.7.). Intensitatea culorii este invers proporțională cu cantitatea de anticorpi prezenți în serurile de testat.



Fig. 4.6. Aspectul plăcilor ELISA după adăugarea substratului TMB

Fig. 4.6. The appearance of the ELISA plates after addition of TMB



Fig. 4.7. Aspectul plăcilor ELISA după blocarea reacției

Fig. 4.7. The appearance of ELISA plates after blocking the reaction

În funcție de condițiile de lucru, etapa de revelare poate duce la densități optice mai mari sau mai mici față de cele așteptate. Din acest motiv, reacția a fost blocată la 20 minute (± 10 minute).

Citirea și calcularea rezultatelor:

Citirea plăcilor s-a efectuat imediat la spectrofotometru cu lungimea de undă 450 nm.

S-au înregistrat densitățile optice la 450 nm (DO.450), apoi s-a calculat, pentru fiecare eșantion, procentajul E/N față de eșantionul de control negativ:

$$\% \text{ E/N} = (\text{DO. 450 a eșantionului de testat} / \text{DO.450 a eșantionului de control negativ}) \times 100$$

Criterii de validare rezultatelor:

Conform instrucțiunilor producătorului, reacția a fost considerată validată atunci când s-au îndeplinit următoarele criterii:

✓ Martorul negativ a avut o valoare minimă a densității optice (DO) de 0,700 și o valoare maximă de 3,00.

✓ Procentul de competiție al martorului pozitiv a fost mai mic de 30%.

Pentru validarea rezultatelor la fiecare test ELISA efectuat în laborator sau la interval de 2-3 testări s-au repartizat în placă (în minim 2 godeuri), alături de martorul pozitiv și negativ din trusa, serul intern de referință (control intern) pozitiv pentru virusul *Bluetongue* (SIRPBTv);

Interpretarea rezultatelor (fig.4.8.):

- Serurile cu un procent de competiție superior sau egal procentului de 80%provenite de la animalelefără anticorpi specifici virusului *Bluetongue* (rezultate negative).
- Serurile cu procent de competiție situat între 70% și 80% au fost considerate dubioase.
- Serurile cu procent de competiție inferior sau egal cu 70% au fost considerate seropozitive, provenind de la animale care posedă anticorpi specifici pentru virusul *Bluetongue* (rezultat pozitiv).

Raw data TESTUL ELISA COMPETITIV POURQUIER

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MN A	2.127	1.756	1.659	1.593	1.71	1.965	1.546	1.759	1.869	1.731	1.981	1.743
MR B	2.206	1.668	1.673	2.161	2.296	2.051	1.893	2.149	2.093	1.65	2.124	2.069
MP C	0.066	1.561	1.72	1.593	1.962	1.896	2.282	2.122	1.545	1.61	1.92	2.205
MP D	0.079	1.467	2.094	1.822	2.184	1.798	2.046	2.034	1.557	1.483	1.805	2.019
E	2.424	1.577	2.117	1.886	2.034	1.925	1.832	1.807	1.55	1.6	1.801	1.902
F	2.607	1.877	2.156	1.997	1.518	1.8	2.363	1.614	1.737	1.666	2.366	2.145
G	2.061	2.328	2.073	2.021	1.65	2.175	2.226	1.809	2.047	1.677	2.214	2.238
H	2.072	2.293	1.863	2.141	1.578	2.084	2.26	2.006	2.266	1.929	2.189	2.474

Fig.4.8. Valorile densității optice obținute în urma citirii la spectrofotometru pentru kitul ELISA Pourquoier de competiție

Fig.4.8. Optical density values obtained after reading the spectrophotometer -ELISA Pourquoier de competition

4.1.2. Rezultate și discuții

Detecția anticorpilor specifici prin teste serologice, a permis identificarea animalelor care au trecut prin boală sau sunt într-o anumită etapă de evoluție clinică a bolii, deși, de cele mai multe ori, *Bluetongue* poate evolua asimptomatic.

În perioada 2014–2017, numărul probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele domestice în vederea testării serologice, a variat de la un an la altul și de la o specie la alta în fiecare județ luat în studiu.

Pe parcursul celor 4 ani, în județul Galați, supravegherea serologică a fost aplicată doar la bovine. În aceeași perioadă, suspiciunile de boală au fost semnalate atât la bovine (în 2014) cât și la caprine (în 2017).

În tabelul 4.3.sunt prezentate rezultatele analizelor serologice centralizate anual și distribuite în funcție de speciile de rumegătoare receptive din județul Galați.

În perioada 2014–2017, au fost analizate 3052 probe de ser, prelevate de la rumegătoarele domestice în vederea identificării anticorpilor specifici anti-BTV, obținute atât prin programul anual de supraveghere serologică *Bluetongue* (n=2166) cât și de la animalele cu suspiciuni de boală (n=886).

Tabel 4.3.-Table 4.3.

Distribuția probelor prelevate și testate ELISA, în județul Galați, 2014-2017
Distribution of samples collected and tested by assays ELISA, in Galați, between 2014-2017

GALATI	Specificare	Probe testate prin SEROSUPRAVEGHERE			Probe testate în caz de suspiciune de boală			TOTAL		
		N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)
2014	Bovine	275	5	270	5	4	1	280	9	271
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	275	5	270	5	4	1	280	9	271
2015	Bovine	1064	0	1064	65	31	34	1129	31	1098
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	1064	0	1064	65	31	34	1129	31	1098
2016	Bovine	293	45	248	0	0	0	293	45	248
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	293	45	248	0	0	0	293	45	248
2017	Bovine	534	11	523	636	0	636	1170	11	1159
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	180	0	180	180	0	180
	Total	534	11	523	816	0	816	1350	11	1339
TOTAL		2166	61	2105	886	35	851	3052	96	2956

Din cele 3052 probe de ser analizate în perioada luată în studiu, 3,15% (n=96) au fost identificate cu anticorpi anti –BTV, iar 96,85% (n=2956) au fost negative la testarea serologică (tabel 4.4 .).

Tabel 4.4./Table 4.4.

Seroprevalența BTV la rumegătoarele din județul Galați, în perioada 2014-2017
BTV seroprevalence in ruminants from Galati , between 2014-2017

	NR.	SEROPOZITIVE		SERONEGATIVE	
	PROBE	NR	%	NR	%
SEROSUPRAVEGHERE	2166	61	2,81	2105	97,18
SUSPICIUNE DE BOALA	886	35	3,95	851	96,05
TOTAL PROBE	3052	96	3,15	2956	96,85

Din analiza sintetică a datelor obținute în perioada 2014-2017, reiese că din cele 2166 probe de ser prelevate, 97,18% (n=2105) au fost libere de anticorpi anti-BTV și doar 2,81% (n=61) au fost seropozitive. Același situație se identifică și la animalele cu suspiciune de boală. Din cele 886 de probe investigate, 96,05% (n=851) au fost raportate fără anticorpi anti BTV și doar 3,95% (n=35) au fost seropozitive la Atc.anti-BTV (fig.4.9).

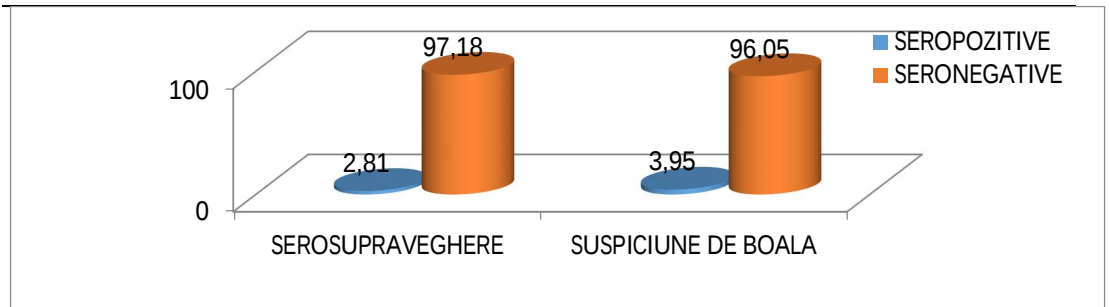


Fig. 4.9. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Galați, în perioada 2014-2017

Fig.4.9. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected *Bluetongue*, in Galați County, between 2014-2017

În **anul 2014**, din cele 280 probe de ser testate, 3,21% (n=9) au fost pozitive la testarea serologică pentru Atc anti-BTV și 96,79% (n=271) au fost negative. Serosupravegherea a inclus testarea a 275 de bovine. În urma prelevării și testării probelor de ser provenite de la aceste animale, 1,82% (n=5) au fost identificate cu anticorpi specifici pentru BTV și 98,18% (n=270) au fost seronegative. În această perioadă, au fost semnalate și testate serologic 5 bovine cu suspiciune de boală. În urma analizelor de laborator, 80% (n=4) au fost confirmate cu Atc.anti-BTV (fig.4.10.).

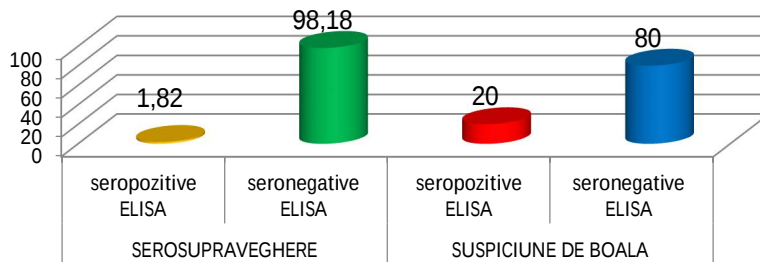


Fig. 4.10. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Galați, în 2014

Fig.4.10. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected *Bluetongue*, in Galați County, in 2014

În **anul 2015**, s-au testat 1129 probe de ser prelevate de la 1064 bovine incluse în supravegherea serologică și 65 bovine care au fost suspicionate cu *Bluetongue*. În urma efectuării testului ELISA de competiție nu s-au identificat anticorpi anti-BTV la animalele serosupravegheate dar au fost identificați la 47,70% (n=31) din animalele cu suspiciuni de boală (fig.4.11.).

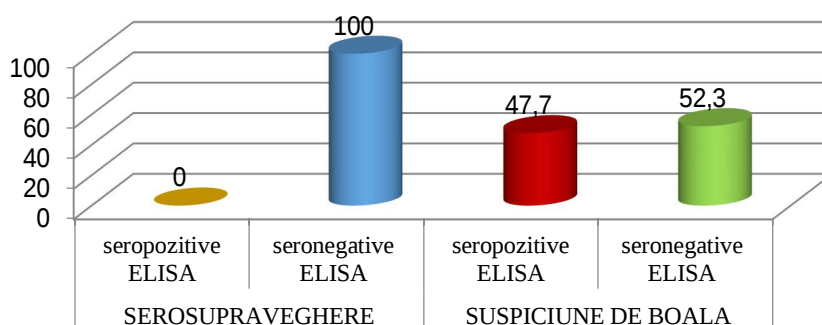


Fig.4.11. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Galați, în 2015

Fig.4.11. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected *Bluetongue*, in Galați County, in 2015

În anul 2016, au fost testate 293 de probe de ser prelevate de la bovinele aflate în monitorizare serologică. În acest an, nu au fost semnalate suspiciuni de boală. În urma testărilor serologice, anticorpii anti-BTV au fost identificați la 15,35 % (n=45) probe, iar 84,64% (n=248) au fost negative (fig.4.12.).

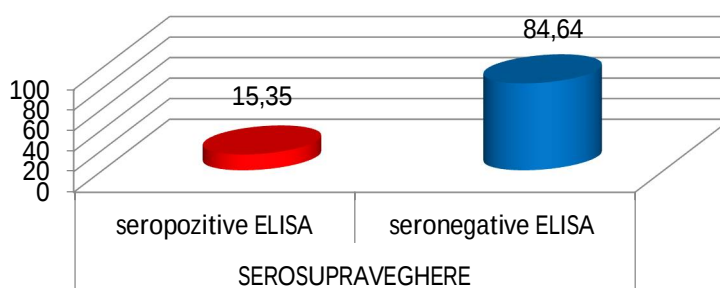


Fig.4.12. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă din județul Galați, în 2016

Fig.4.12. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals, in Galați County, in 2016

În anul 2017, au fost testate 1350 de probe de sânge prelevate de la 1170 bovine și 180 caprine.

Din cele 1170 de probe de sânge prelevate de la bovine, 534 de probe au fost prelevate de la animale clinic sănătoase incluse în grupul de animale serosupravegheate pentru *Bluetongue*, iar 636 de probe au fost prelevate de la bovine cu suspiciuni de boală.

Testul ELISA de competiție a pus în evidență prezența Atc anti-BTV la 2,10% (n=11) din cele 534 de bovine aflate sub supraveghere serologică *Bluetongue*. Suspiciunile de *Bluetongue* nu au fost confirmate prin testele serologice, toate cele 636 probe fiind libere de anticorpi anti-BTV (fig.4.13).

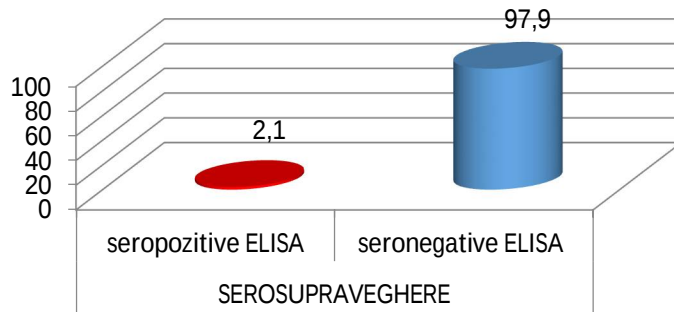


Fig.4.13 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă din județul Galați, în 2017
Fig.4.13. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected Bluetongue, in Galați County, in 2017

Din analiza datelor obținute la testarea serologică efectuată, s-a evidențiat o incidență fluctuantă a anticorpilor anti-BTV, pe parcursul perioadei analizate (fig.4.14). Suspiciunile de boală au fost confirmate în primii doi ani (2014, 2015) ai studiului, dar au lipsit în ultimii doi ani (2016, 2017).

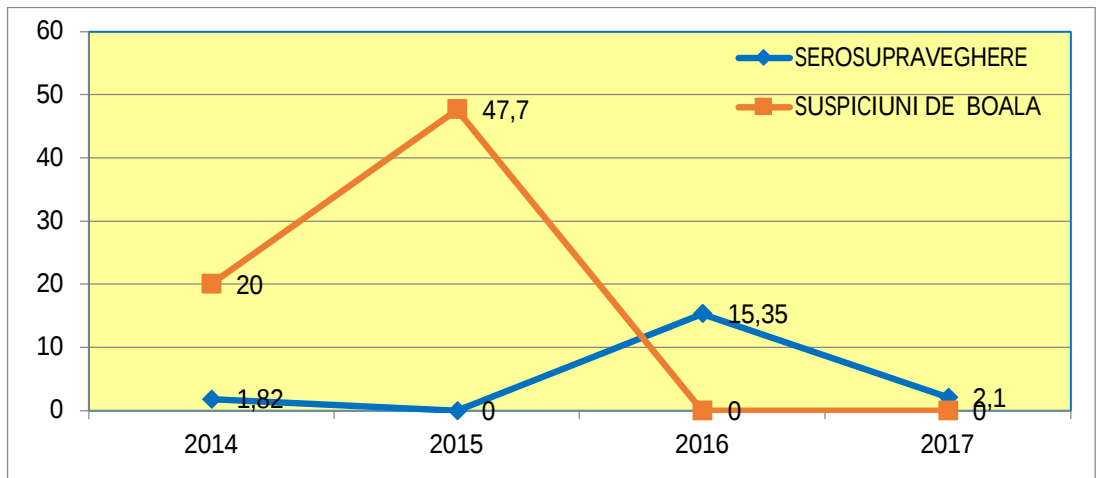


Fig. 4.14. Evoluția seroprevalenței anticorpilor anti-BTV în perioada 2014-2017, în Galați
Fig.4.14. Evolution of the seroprevalence of anti-BTV antibodies, between 2014-2017, in Galați

Serosupravegherea activă a surprins în primii doi ani o incidență relativ redusă și care s-a stopat la finalul anului 2015. Situația epidemiologică a bolii *Bluetongue* în regiunea de Sud-Est, microclimatul favorabil vectorilor transmițători, prezența bovinelor cu diagnostic confirmat de *Bluetongue*, sunt o parte din elementele care au dus la o creștere a incidenței anticorpilor anti-BTV în 2016. Măsurile de combatere și supraveghere desfășurate pe parcursul celor patru ani, au avut drept consecință limitarea circulației virusului *Bluetongue* în județ, aspect susținut de incidența scăzută a

anticorpilor specifici de la 1,82% în 2014 la 2,1% în 2017 la animalele monitorizate serologic. Prezența anticorpilor anti-BTV în 2017 arată faptul că virusul este încă prezent în organismul animalelor receptive și el se poate reactiva în perioada premergătoare studiului nostru, fiind necesară supravegherea activă a animalelor din acest teritoriu geografic al județului Galați.

4.1.3. Concluzii

În perioada 2014–2017, în **județul Galați** au fost testate prin tehnica ELISA de competiție, 3052 probe de ser prelevate de la 2872 bovine și 180 ovine iar rezultatele diferă în funcție de ani și specie.

1. În **anul 2014**, au fost testate:
 - a. 275 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, dintre care 1,82% (n=5) au fost identificate cu anticorpi anti-BTV și 98,18% (n=270) au fost seronegative,
 - b. 5 bovine semnalate cu suspiciune de boală, dintre care 80% (n=4) au fost seropozitive și 20% (n=1) seronegative la virusul *Bluetongue*.
2. În **anul 2015**, au fost testate:
 - a. 1064 bovine serosupravegheate *Bluetongue* care au fost 100% seronegative,
 - b. 65 bovine semnalate cu suspiciune de boală, dintre care 47,70% (n=31) au fost seropozitive și 53,3% (n=34) seronegative la virusul *Bluetongue*.
3. În **anul 2016**, au fost testate:
 - a. 293 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, dintre care 15,35% (n=45) au fost identificate cu anticorpi anti-BTV și 84,64% (n=248) au fost seronegative.
 - b. nu au fost semnalate suspiciuni de *Bluetongue* la bovine, ovine și caprine.
4. În **anul 2017**, au fost testate:
 - a. 534 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, dintre care 2,10% (n=11) au fost identificate cu anticorpi anti-BTV și 97,90% (n=270) au fost seronegative,
 - b. 636 bovine și 180 caprine semnalate cu suspiciune de boală, au fost seronegative la virusul *Bluetongue*.

4.2. Supravegherea serologică în județul Vrancea

Județul Vrancea are o suprafață de 4857 km² și un număr de 286377 animale domestice receptive la boala limbii albastre, dintre aceste 59.750 fiind bovine, 179.858 ovine și 46.769 caprine.

Județul Vrancea, aflat în regiunea de Sud-Est a României cu latura Sud-SudVest, limitrofă județului Buzău, unde au fost semnalate primele focare de boală, a fost cel mai expus teritoriu la circulația virusului *Bluetongue*, fiind semnalate cele mai multe focare de boală din regiunea de Sud-Est a României (OIE, 2014). Prin urmare, boala limbii albastre a fost pentru prima dată semnalată în anul 2014.

4.2.1 Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, au fost testate 2778 probe de seruri, obținute de la rumegătoarele domestice (tabel 4.5.).

Tabel 4.5. /Table 4.5.

Distribuția numerică a probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele din județul Vrancea
Numerical distribution of blood samples collected from ruminants of the Vrancea

Numbered and dated of blood samples collected from participants of the "Panda"							
JUDEȚE	SPECII	ACȚIUNI	PERIOADA				
			2014	2015	2016	2017	TOTAL PROBE
VRANCEA	bovine	SP	210	655	619	164	1648
		SB	179	1	0	0	180
	ovine	SP	0	261	449	0	710
		SB	235	1	0	0	236
	caprine	SP	0	0	0	0	0
		SB	0	4	0	0	4
	TOTAL PROBE/AN		624	922	1068	164	2778

Abrevieri: SP- supraveghere serologică; SB- suspiciuni de boală

Probele de sânge au fost prelevate de la rumegătoarele domestice santinelă din localitățile țintă stabilite pentru județul Vrancea (tabel 4.6.) și de la animalele care au fost semnalate cu suspiciuni de boală. Prelevările s-au efectuat în lunile iunie, septembrie și noiembrie.

Tabel 4.6./Table 4.6.

Unitățile țintă de asistență sanitară veterinară conform Programului Național de Supraveghere a Bluetongue(Ord.35/2016).

The veterinary assistance units according to the National Bluetongue Surveillance Program (Ord.35 / 2016).

JUDETUL	Suprafața totală a județului/km ²	Nr. de C.S.V. de asistență țintă	Localitățile țintă
VRANCEA	4857	2	Milcovul Răcoasa

A. Prelevarea și condiționarea probelor biologice

Prelevarea, transportul și prelucrarea probelor s-au efectuat conform metodologiei din *Manualului OIE de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre*, cap.2.1.3., Bluetongue,ed.VII,2014iar descrierea acestor etape a fost prezentată la subcap. 4.1.1.1.

Probele de sânge au fost prelucrate în Laboratorului de Serologie Virală din cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor din Vrancea.

Supravegherea serologică s-a efectuat cu scopul identificării anticorpilor specifici pentru virusul *Bluetongue* în probele de sânge prelevate de la rumegătoarele domestice receptiv, utilizând tehnica imunoenzimatică **ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

B.Testul imunoenzimatic ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

În județul Vrancea, probele au fost testate cu două kituri ELISA: în anul 2015-2017 a fost folosit kitul **ELISA Pourquier de competiție (IDEXX-Franța)** care a fost

descrișă la subcap. 4.1.1.2. iar în anul 2014, a fost utilizat kitul **ELISA VMRD (VMRD Inc, SUA)** pentru detectarea anticorpilor specifici *Bluetongue*.

Kitul ELISA VMRD de competiție (VMRD Inc, SUA) a fost utilizată pentru identificarea Atc anti-BTV din serul rumegătoarelor receptive la virusul *Bluetongue*.

a.Principiul kitului cELISA VMRD – Bluetongue :

Anticorpii specifici prezenți în serurile de testat împiedică legarea anticorpilor monoclonali conjugați cu peroxidază de antigenul care cătușește placa. În cazul serurilor care nu conțin anticorpi specifici, este liberă legarea de antigen a anticorpilor monoclonali conjugați cu peroxidază, legare care va fi evidențiată cu ajutorul unui substrat cromogen ce determină apariția în godeuri a unei reacții de culoare. În godeurile în care culoarea este intensă, lipsesc anticorpii specifici antivirali în serurile de testat, deci acestea sunt negative, iar în godeurile în care culoarea este absentă sau foarte slabă, serurile de testat prezintă anticorpi și, în consecință, sunt considerate pozitive

Pentru realizarea testului au fost necesare aceleași materiale prezentate la subcapitolul . 4.1.1.2.

b.Componentele Kitului VMRD:

- ✓ 5 microplăci cu 96 godeuri cătușite cu antigen (sau stripuri în rame);
- ✓ 1 flacon (A) x 4 ml cu ser martor pozitiv și un flacon (C) x 4 ml cu ser martor negativ, gata de lucru;
- ✓ 1 flacon (D) x 16 ml cu anticorpi monoclonali conjugați cu peroxidază, gata de lucru;
- ✓ 1 flacon (D) x 30 ml cu soluție de spălare concentrată x 50;
- ✓ 1 flacon (E) x 30 ml cu soluție substrat, gata de lucru;
- ✓ 1 flacon (F) x 30 ml cu soluție de stopare, gata de lucru;
- ✓ instrucțiuni și șabloane pentru înregistrarea probelor și rezultatelor.

c.Tehnica de lucru pentru kitul VMRD:

- Cu 30 minute înainte de efectuarea testului, s-au adus la temperatura camerei: trusa, reagenții, plăcile necesare din cutie și serurile de testat
- S-au notat martorii pozitivi și negativi precum și probele pe șablonul de lucru;
- S-a preparat soluția de spălare prin diluarea soluției concentrate de 50 de ori cu apă distilată sau deionizată.
- S-a adăugat 25 μ l ser martor pozitiv (A) în godeurile A1 și B1 și 25 μ l ser martor negativ (B) , în godeurile C1 și D1.
- Pentru serurile martor și pentru fiecare ser de testat s-a utilizat câte un vârful de pipetă separat.
- După depunerea serurilor în godeuri, s-a atins ușor peretele godeului cu vârful pipetei, aproape de fundul acestuia, pentru a lăsa în godeu și picăturile de ser care se formează și rămân atașate de vârful micropipetei.
- În restul godeurilor de pe placă s-a adăugat câte 25 μ l din fiecare ser de testat, respectând macheta de lucru.
- S-a lăsat placa la incubat, la temperatura camerei, timp de 15 minute.

- S-a adăugat în toate godeurile câte 25 μ l anticorpi conjugați cu peroxidază (C), și s-a agitat ușor placa pentru omogenizare.
- Placa a fost incubată timp de 15 minute la temperatura camerei.
- După incubare, placa s-a spălat de trei ori cu soluție de spălare, diluția de lucru după care s-a scuturat bine pe o suprafață absorbantă (hârtie de filtru).
- S-a adăugat în toate godeurile câte 50 μ l soluție substrat revelator (E) și s-a acoperit placa pentru incubare.
- S-a incubat 10 minute la temperatura camerei, la întuneric.
- Apoi, s-a depus în toate godeurile câte 50 μ l soluție de stopare și s-a agitat ușor placa pentru omogenizare.
- Citirea s-a făcut imediat după adăugarea soluției de stopare, la lungime de undă 620 nm. (fig.4.15.):

Workspace/Method/Sample ID list: 15022008-001.wsp - VMRD-Bluetongue.mth -

Time: 10:08:22

Page: 1

Raw data

MN1

MN2

MP1

MP2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.876	0.907	0.909	0.818	0.828	0.902	0.814	0.846	0.899	0.993	0.922	0.851
B	0.885	0.906	0.984	0.84	0.839	0.881	0.826	0.844	0.893	0.96	0.883	0.917
C	0.149	0.845	0.881	0.846	0.86	0.879	0.891	0.86	0.835	0.934	0.86	0.963
D	0.131	0.843	0.897	0.794	0.804	0.83	0.868	0.818	0.866	0.956	0.837	0.928
E	0.855	0.887	0.86	0.8	0.804	0.822	0.753	0.868	0.808	0.968	0.898	0.917
F	0.851	0.882	0.868	0.797	0.807	0.814	0.772	0.85	0.794	0.911	0.895	0.895
G	1.242	0.801	0.831	0.826	0.833	0.791	0.824	0.893	0.826	0.883	0.886	0.983
H	0.834	0.887	0.847	0.818	0.799	0.777	0.889	0.855	0.844	0.897	0.908	0.911

Cutoff results

Fig.4.15. Valorile densității optice obținute în urma citirii la spectrofotometru cu kitul cELISA VMRD

Fig.4.15. Optical density values obtained after reading the spectrophotometer (ELISA VMRD-Bluetongue antibody)

d. Validarea rezultatelor este conformă atunci când:

- ✓ Media densităților optice ale matorului negativ a fost mai mare decât 0,300 și mai mică decât 1,200
- ✓ Media densităților optice ale matorului pozitiv a fost mai mică sau egală cu 50% din media densităților optice ale matorului negativ.
- ✓ *Cut off*-ul a fost egal cu 50% din media densităților optice ale matorului negativ.

e. Interpretarea rezultatelor pentru kitul cELISA VMRD:

- ✓ Serurile ale căror densități optice s-au situat sub valoarea *cut off*-ului, au fost considerate pozitive.
- ✓ Serurile ale căror densități optice s-au situat peste valoarea *cut off*-ului, au fost considerate negative.

4.2.2 Rezultate și discuții

În perioada 2014–2017, în județul Vrancea, s-au analizat 2778 probe de ser, prelevate de la animalele santinelă (n=2358) și de la animalele cu suspiciune de boală (n=420) (tabel 4.7.).

Tabel 4.7./Table 4.7.

Distribuția probelor prelevate și testate ELISA, în județul Vrancea, în 2014-2017
Distribution of samples collected and tested by assays ELISA, in Vrancea, between 2014-2017

VRANCEA	Specificare	Probe testate prin SEROSUPRAVEGHERE			probe testate in caz de suspiciune de boală			TOTAL		
		N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)
2014	Bovine	210	0	210	179	161	18	389	161	228
	Ovine	0	0	0	235	204	31	235	204	31
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	210	0	210	414	365	49	624	365	259
2015	Bovine	655	291	364	1	1	0	656	291	365
	Ovine	261	0	261	1	1	0	262	1	261
	Caprine	0	0	0	4	3	1	4	3	1
	Total	916	291	625	6	5	1	922	295	627
2016	Bovine	619	112	507	0	0		619	112	507
	Ovine	449	0	449	0	0		449	0	449
	Caprine	00	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	1068	112	956	0	0	0	1068	112	956
2017	Bovine	164	26	138	0	0	0	164	26	138
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	164	26	138	0	0	0	164	26	138
TOTAL PROBE		2358	429	1929	420	370	50	2778	799	1979

Analiza generală a datelor obținute, au arătat că, din cele 2778 probe de ser analizate, 28,76% (n=799) au fost identificate cu anticorpi anti BTV, iar 71,23% (n=1979) au fost negative la testarea serologică (tabel 4.8).

Tabel 4.8. /Table 4.8.

Seroprevalența BTV la rumegătoarele din județul Vrancea, în perioada 2014-2017
BTV seroprevalence in ruminants from Vrancea, between 2014-2017

	NR.	SEROPOZITIVE		SERONEGATIVE	
	PROBE	NR	%	NR	%
SEROSUPRAVEGHERE	2358	429	18,20	1929	81.80
SUSPICIUNE DE BOALA	420	370	88,10	50	11,90
TOTAL PROBE	2778	799	28,76	1979	71,23

Analizele serologice efectuate pe probele de ser prelevate de la animalele santinelă au arătat o incidență de 18,20% (n=429) a anticorpilor anti-BTV, iar 81,80% (n=1929) fiind negative. Evaluările efectuate pe 420 de probe de ser provenite de la animalele cu suspiciune de boală, au evidențiat o prevalență de 88,10% (n=370), valoare

procentuală semnificativ mai ridicată comparativ cu rezultatele obținute la animalele santinelă serosupravegheate serologic (fig.4.16).

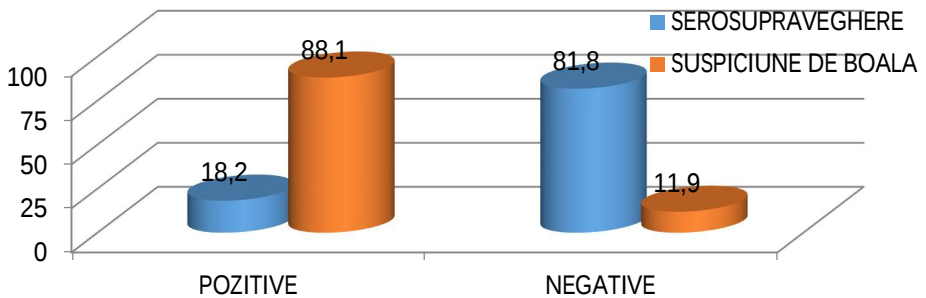


Fig.4.16. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Vrancea, în perioada 2014-2017

Fig.4.16.Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected *Bluetongue*, in Vrancea, between 2014-2017

În anul 2014, au fost testate 624 probe de ser provenite de la bovine (n=389) și de la ovine (n=235). În urma testării a 210 probe de ser prelevate de la animalele supravegheate serologic prin ELISA de competiție, nu au fost identificate animale seropozitive la *Bluetongue*. În aceeași perioadă, au existat 179 de bovine cu suspiciune de boală, iar testarea serologică, a evidențiat anticorpii anti-BTV cu o incidență de 89,94% (n=161). De asemenea, au fost semnalate 235 de ovine cu suspiciuni de boală de la care au fost prelevate probe de sânge. În vederea testării serologice indicele de incidență a anticorpilor anti-BTV a fost de 86,80% (n=204) (fig.4.17).

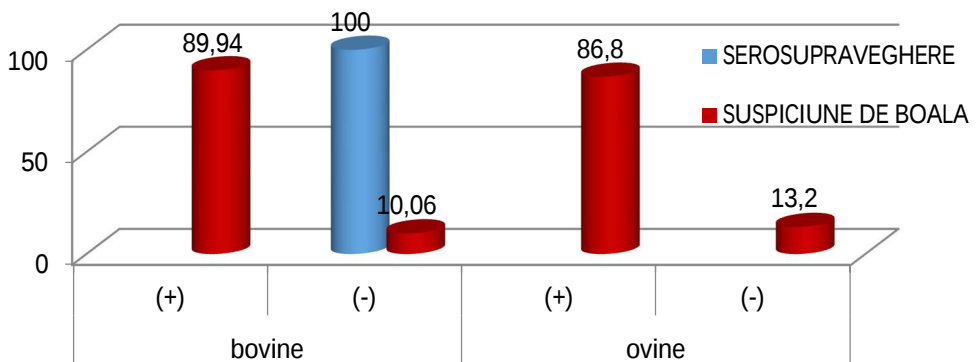


Fig. 4.17. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală, din județul Vrancea, în 2014

Fig.4.17.Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected *Bluetongue*, in Vrancea, in 2014

În anul 2015, au fost testate 922 probe de ser, care au fost prelevate de la 656 bovine, 262 ovine și 4 caprine.

Din cele 656 de bovine supravegheate serologic, 44,43% (n=291) au fost identificate cu anticorpi anti-BTV, iar 55,57% (n=364) au fost seronegative. În aceeași

perioadă, a fost semnalată o suspiciune de boală la o bovină și care, în urma testării serologice, a fost seropozitivă pentru anticorpi antiBTV (fig.4.18)

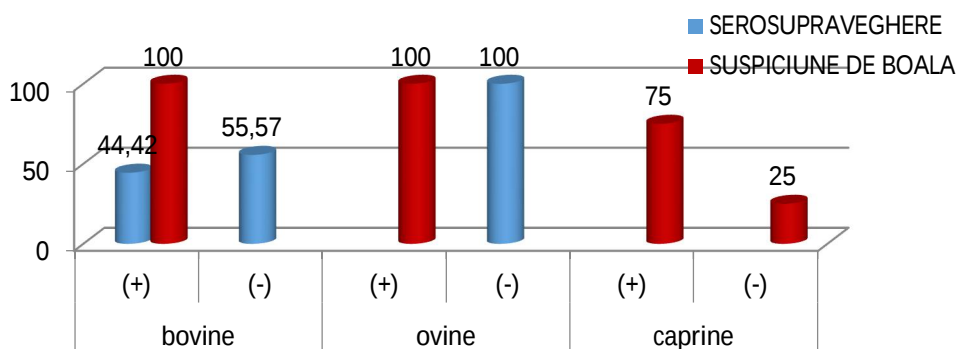


Fig.4.18 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de *Bluetongue* din județul Vrancea, în 2015

Fig.4.18.Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected *Bluetongue*, in Vrancea, in 2015

În acest an, serosupravegherea efectuată la ovine nu a pus în evidență anticorpilor specifici pentru *Bluetongue*, toate cele 261 (100%) probe fiind negative la testarea serologică ELISA. Cu toate acestea, a fost semnalată o suspiciune de boală, iar testarea serologică a confirmat prezența anticorpilor antiBTV.

În județul Vrancea, efectivele de caprine sunt reduse numeric, motiv pentru care această specie nu a fost reprezentativă pentru planul de supraveghere serologică teritorială. Totuși, au fost semnalate 4 animale cu suspiciune de boală, dintre acestea 75% (n=3) au fost identificate cu Atc anti-BTV și 25% (n=1) au fost seronegative pentru anticorpilor specifici.

În anul 2016, au fost testate 1068 de probe de ser provenite de la 619 bovine și 449 ovine, aflate sub supraveghere serologică. Pentru specia ovină nu au fost stabilite grupuri de animale santinelă care să fie testate serologic pentru *Bluetongue*. De asemenea, nu au fost semnalate suspiciuni de boală la animalele receptive din acest județ.

În urma testărilor serologice, efectuate pe cele 619 probe de ser bovin, 18,10% (n=112) au fost seropozitive pentru anticorpi anti-BTV, iar 81,90% (n=507) probe au fost seronegative. Testarea serologică a celor 449 de probe de ser ovine nu a pus în evidență anticorpi specifici pentru virusul *Bluetongue* (fig.4.19).

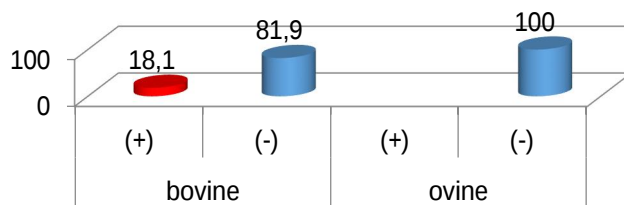


Fig. 4.19.Seroprevalența Atc. anti- BTV la animalele santinelă din județul Vrancea, în 2016

Fig.4.19. Seroprevalence Atc.anti-BTV in sentinel animals, in Vrancea, in 2016

În anul 2017, numărul probelor de ser testate a fost semnificativ mai redus, fiind prelevate 164 probe de ser bovin. În acest an, serosupravegherea s-a efectuat doar la bovine. În urma testărilor serologice, 15,85% (n=26) au fost seropozitive pentru anticorpi anti-BTV și 84,15 (n=138) au fost seronegative (fig.4.20.). În această perioadă, nu au existat suspiciuni de boală.

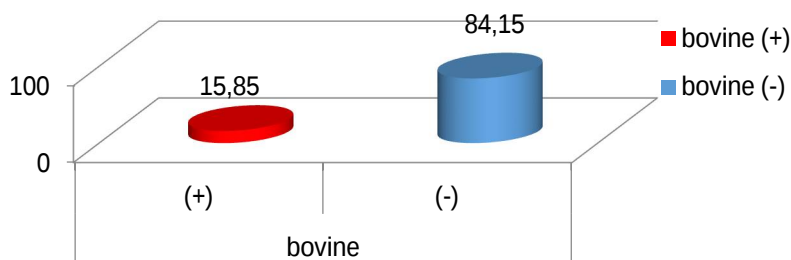


Fig.4.20. Seroprevalența Atc. anti-BTV la animalele santinelă din județul Vrancea, în 2017
Fig.4.20.Seroprevalence Atc. anti- BTV in sentinel animals, in Vrancea, in 2017

Analizând evoluția incidenței anticorpilor anti-BTV, în perioada 2014-2017, se observă că serosupravegherea activă efectuată în anul 2014 a fost eficientă, semnalând în 2015 prezența și dispersarea virusului circulant la bovine, pentru ca în ultimii doi ani ai studiului (2016 și 2017), să scadă procentul de animale seropozitive la *Bluetongue*.

De asemenea, suspiciunile de boală au fost semnalate doar în primii doi ani ai studiului (2014-2015), testarea serologică evidențiind anticorpii anti-BTV la bovine (89,94%) și ovine (86,8%) în 2014, iar în 2015 la bovine (100%), ovine (100%) și caprine (75%)(fig.4.21).

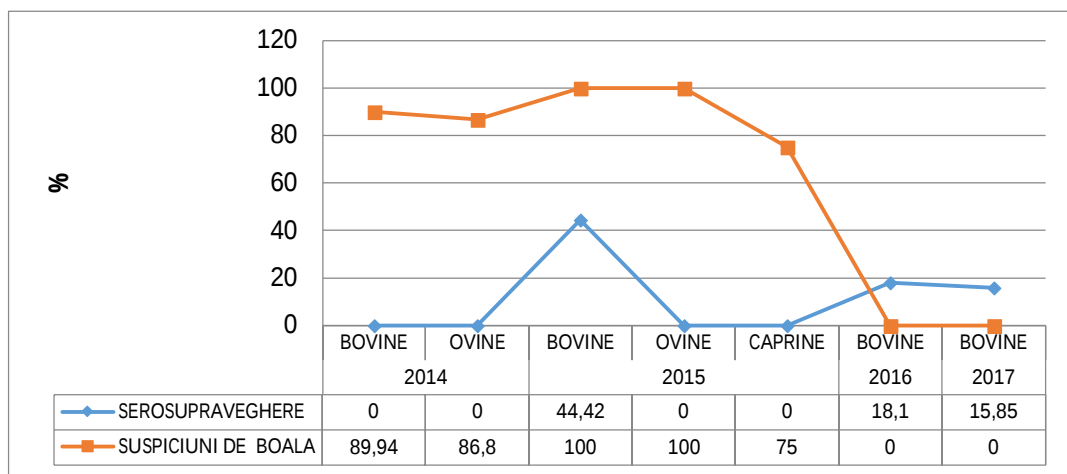


Fig. 4.21.Evoluția seroprevalenței anticorpilor anti-BTV în perioada 2014-2017, în Vrancea
Fig.4.21. Evolution of the seroprevalence of anti-BTV antibodies, between 2014-2017, in Vrancea

4.2.3. Concluzii

În perioada 2014–2017, în **judetul Vrancea** au fost testate prin tehnica ELISA de competiție, 2778 probe de ser prelevate de la 1828 bovine, 946 ovine și 4 caprine iar rezultatele diferă în funcție de ani și specie.

1. În **anul 2014**, au fost testate:
 - a. 210 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, nu au fost identificate cu anticorpi anti-BTV.
 - b. 179 bovine semnalate cu suspiciune de boală, din care 89,94% (n=161) au fost seropozitive și 10,06% (n=18) seronegative la virusul *Bluetongue*
 - c. 235 ovine cu suspiciuni de *Bluetongue*, dintre care 86,80% (n=204) au fost seropozitive și 13,20 (n=31) au fost seronegative la *Bluetongue*.
2. În **anul 2015**, au fost testate:
 - a. 655 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, din care 44,43% (n=291) au fost identificate cu anticorpi anti-BTV și 55,57% (n=364) au fost seronegative
 - b. 1 bovină cu suspiciune de boală, confirmată serologic cu anticorpi anti-BTV.
 - c. 261 ovine serosupravegheate *Bluetongue*, nu au fost identificate cu anticorpi anti BTV.
 - d. 1 ovină cu suspiciune de boală, confirmată serologic cu anticorpi anti-BTV.
 - e. 4 caprine cu suspiciune de boală, din care 75% (n=3) au fost seropozitive și 1% (n=25) seronegative la virusul *Bluetongue*.
3. În **anul 2016**, au fost testate:
 - a. 293 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, dintre care 15,35% (n=45) au fost identificate cu anticorpi anti-BTV și 84,64% (n=248) au fost seronegative.
 - b. nu au fost semnalate suspiciuni de *Bluetongue* la bovine, ovine și caprine.
4. În **anul 2017**, au fost testate:
 - a. 534 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, dintre care 2,10% (n=11) au fost identificate cu anticorpi anti-BTV și 97,90% (n=270) au fost seronegative,
 - b. 636 bovine și 180 caprine semnalate cu suspiciune de boală, care au fost seronegative la virusul *Bluetongue*.

4.3. Supravegherea serologică în județul Brăila

Județul Brăila are o suprafață de 4857 km² și un număr de 486349 animale domestice receptive la boala limbii albastre, dintre aceste 57.878 fiind bovine, 373.074 ovine și 55.397 caprine.

Aflat în regiunea de Sud-Est a României, Brăila are latura vestică limitrofă județului Buzău, unde au fost semnalate primele focare de boală. Prin urmare, boala limbii albastre s-a extins în județul Brăila fiind semnalată pentru prima dată, în anul 2014.

4.3.1 Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, au fost testate 2388 probe de seruri, obținute de la rumegătoarele domestice (tabel 4.9.).

Tabel 4.9. /Table 4.9.

Distribuția numerică a probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele din județul Brăila
Numerical distribution of blood samples collected from ruminants of the Brăila

Numerical distribution of blood samples collected from ruminants of the Brana							
JUDEȚE	SPECII	ACȚIUNI	PERIOADA				
			2014	2015	2016	2017	TOTAL PROBE
VRANCEA	bovine	SP	180	996	483	597	2256
		SB	5	45	0	0	50
	ovine	SP	36	0	0	0	36
		SB	0	0	0	0	0
	caprine	SP	36	0	0	0	36
		SB	10	0	0	0	10
	TOTAL PROBE/AN		267	1041	483	597	2388

Abrevieri: SP- *supraveghere serologică*; SB- *suspiciuni de boală*

Probele de sânge au fost prelevate de la rumegătoarele domestice santinelă din localitățile țintă stabilite (tabel 4.10) și de la animalele care au fost semnalate cu suspiciuni de boală. Prelevările anuale au fost efectuate în lunile iunie, septembrie și noiembrie.

Tabel 4.10./Table 4.10.

Unitățile țintă de asistență sanitară veterinară conform Programului Național de Supraveghere a Bluetongue(Ord.35/2016).

The veterinary assistance units according to the National Bluetongue Surveillance Program (Ord.35 / 2016).

JUDETUL	Suprafața totală a județului/km ²	Nr. de C.S.V. de asistență țintă	Localitățile țintă
BRĂILA	4766	2	Galbenu Gropeni

A. Prelevarea și condiționarea probelor biologice

Prelevarea, transportul și prelucrarea probelor s-au efectuat conform metodologiei din *Manualului OIE de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre*, cap.2.1.3., *Bluetongue*, ed.VII, 2014 iar descrierea acestor etape a fost prezentată la subcap. 4.1.1.1.

Probele de sânge au fost prelucrate în Laboratorului de Serologie Virală din cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor din județul Brăila.

Supravegherea serologică în județul Brăila s-a efectuat utilizând aceeași tehnică imunoenzimatică **ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**.

B.Testul imunoenzimatic ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

În județul Brăila, probele au fost testate cu două kituri ELISA: în anul 2014, a fost utilizat kitul **ELISA VMRD de competiție (VMRD Inc, SUA)** care a fost prezentat la subcapitolul 4.2.1. iar din 2015 până în 2017 s-a folosit kitul **ELISA Pourquier de competiție (IDEXX-Franța)**, care a fost descrisă la subcap. 4.1.1.

4.3.2. Rezultate și discuții

În perioada 2014–2017, au fost testate serologic 2388 probe de ser, din care 2328 au fost prelevate de la animalele aflate sub supraveghere serologică activă *Bluetongue* și 60 probe au fost prelevate de la animalele cu suspiciuni de boală (tabel 4.11.).

Tabel 4.11./Table 4.11.

Distribuția probelor prelevate și testate ELISA, în județul Brăila, 2014-2017
Distribution of samples collected and tested by assays ELISA, in Brăila, between 2014-2017

BRAILA	Specificare	Probe testate prin SEROSUPRAVEGHERE			probe testate in caz de suspiciune de boală			TOTAL/SPECIE		
		N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)
2014	Bovine	180	3	177	5	3	2	185	6	179
	Ovine	36	0	36	0	0	0	36	0	36
	Caprine	36	0	36	10	0	10	46	0	46
	Total/AN	252	3	249	15	3	12	267	6	261
2015	Bovine	996	61	935	45	8	37	1041	69	972
	Ovine	0	0		0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0		0	0	0	0	0	0
	Total	996	61	935	45	8	37	1041	69	972
2016	Bovine	483	30	453	0	0	0	483	30	453
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	483	30	453	0	0	0	483	30	453
2017	Bovine	597	20	577	0	0	0	597	20	577
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	597	20	577	0	0	0	597	20	577
Total probe		2328	114	2214	60	11	49	2388	125	2263

Analiza generală a datelor obținute în această perioadă de timp, a arătat că, din cele 2388 probe de ser analizate, 5,23% (n=125) au fost identificate cu anticorpi anti BTV, iar 94,77% (n=2263) au fost seronegative la testarea serologică (tabel 4.12).

Tabel 4.12/Table 4.12.

Seroprevalența BTV la rumegătoarele din județul Brăila, în perioada 2014-2017**BTV seroprevalence in ruminants from Brăila, between 2014-2017**

	NR.	SEROPOZITIVE		SERONEGATIVE	
	PROBE	NR	%	NR	%
SEROSUPRAVEGHERE	2328	114	4,90	2214	95,10
SUSPICIUNE DE BOALA	60	11	18,33	49	81,66
TOTAL PROBE	2388	125	5,23	2263	94,77

Din analiza sintetică a datelor obținute în perioada 2014-2017, reiese că din cele 2328 probe de ser testate pentru *Bluetongue*, 95,10% (n=2214) au fost libere de anticorpi anti BTV și doar 4,90% (n=114) au fost seropozitive.

De asemenea, din cele 60 de probe prelevate de la animalele cu suspiciuni de boală și testate serologic, 81,66% (n=49) au fost seronegative, iar 18,33% (n=11) au fost seropozitive la Atc.anti BTV (fig.4.2.2).

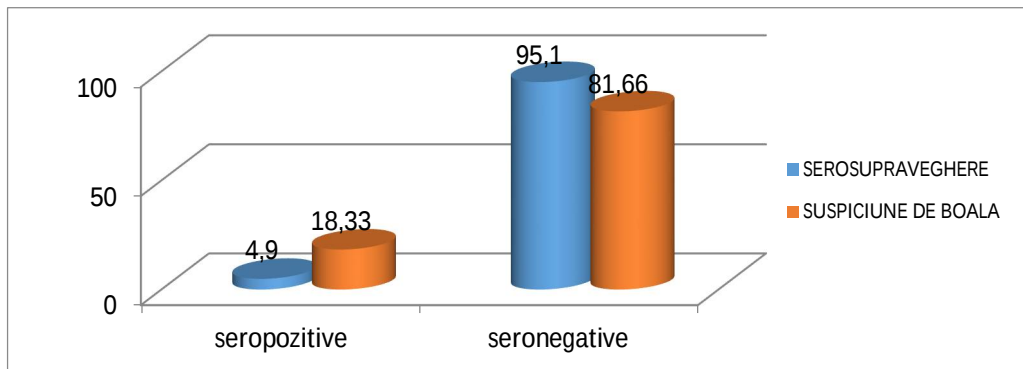


Fig.4.22. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Brăila, în perioada 2014-2017

Fig.4.22.Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected Bluetongue, in Brăila, between 2014-2017

Analiza în dinamică a rezultatelor obținute în urma testărilor serologice arată o scădere a incidenței anticorpilor specifici pentru *Bluetongue* la animalele selectate pentru supraveghere serologică activă.

Astfel, **în anul 2014**, au fost testate 252 de probe de ser provenite de la 180 bovine, 36 ovine și 36 caprine, selectate pentru serosupraveghere *Bluetongue*. Testarea serologică prin tehnica ELISA de competiție, a evidențiat prezența anticorpilor specifici anti-BTV la 1,66% (n=3) din probele de ser bovin. Nu au fost identificate probe seropozitive la ovinele și caprinele testate. În aceeași perioadă, au fost semnalate 5 suspiciuni de boală la bovine și 10 suspiciuni de boală la caprine. Analizele serologice efectuate pe probele de ser prelevate de la aceste animale au evidențiat 60% (n=3) probe pozitive la bovine, iar la caprine, nu au fost confirmate suspiciunile (fig.4.23).

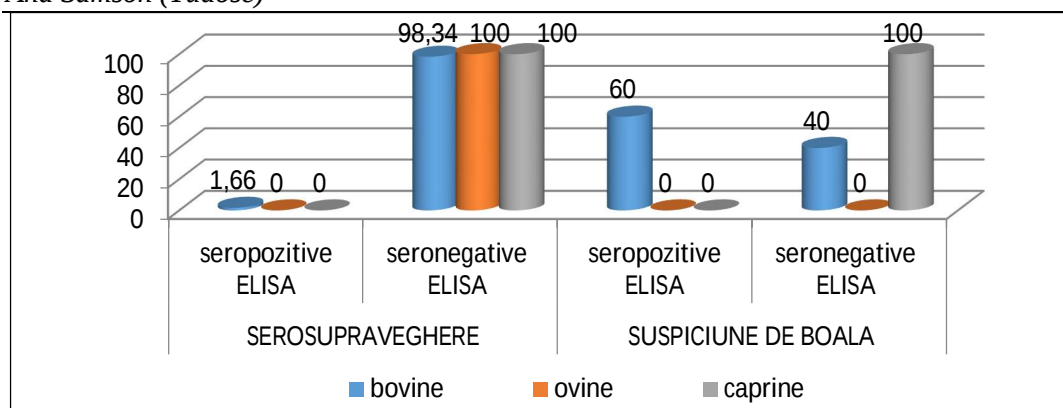


Fig.4.23. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și cu suspiciuni de boală, din județul Brăila, în 2014

Fig.4.23. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected *Bluetongue*, in Brăila, in 2014

În anul 2015, serosupravegherea activă s-a efectuat pe 996 probe de ser provenite doar de la bovine. Dintre acestea, 6,12% (n=61) au fost seropozitive pentru virusul *Bluetongue*. La aceeași specie, au fost semnalate 45 suspiciuni de boală din care doar 17,77% (n=8) au fost confirmate cu prezența de anticorpi specifici pentru virusul *Bluetongue* (fig 4.24.).

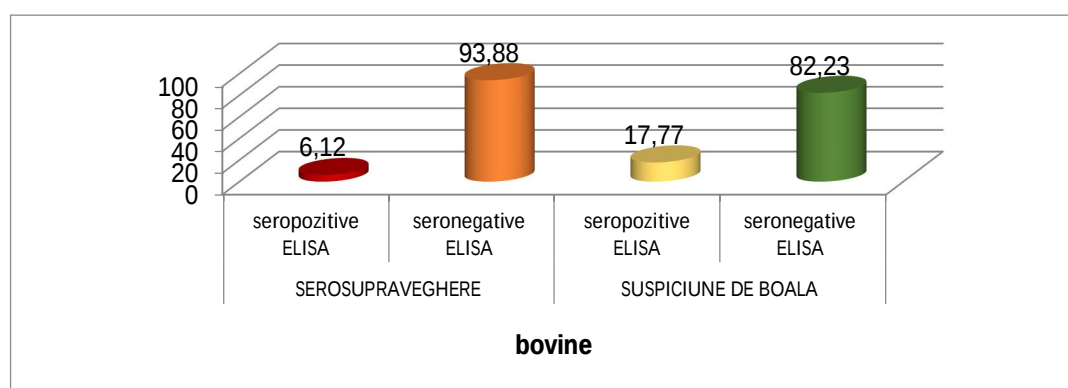


Fig. 4.24. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și cu suspiciuni de boală, din județul Brăila, în 2015

Fig.4.24. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected *Bluetongue*, in Brăila, in 2015

În anul 2016, serosupravegherea s-a efectuat doar la bovine, fiind analizate serologic 483 probe de ser din care 6,21% (n=30) au fost identificate cu anticorpi anti-BTV. În această perioadă nu au existat suspiciuni de boală la animalele receptive (fig.4.25).

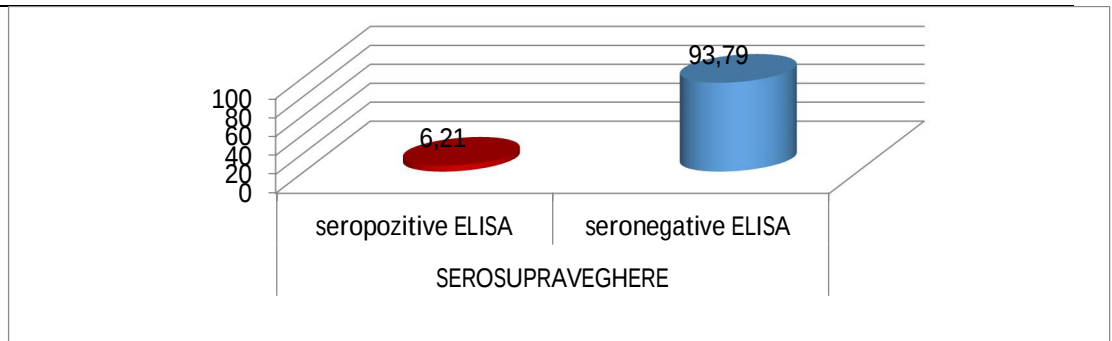


Fig.4.25. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă, din județul Brăila, în 2016

Fig.4.25.Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals, in Brăila,in 2016

În **anul 2017**, au fost analizate 597 probe de ser prelevate de la bovinele stabilite ca lot santinelă. În urma examenului serologic, au fost identificate 33,50%(n=20) probe seropozitive (fig.4.26).

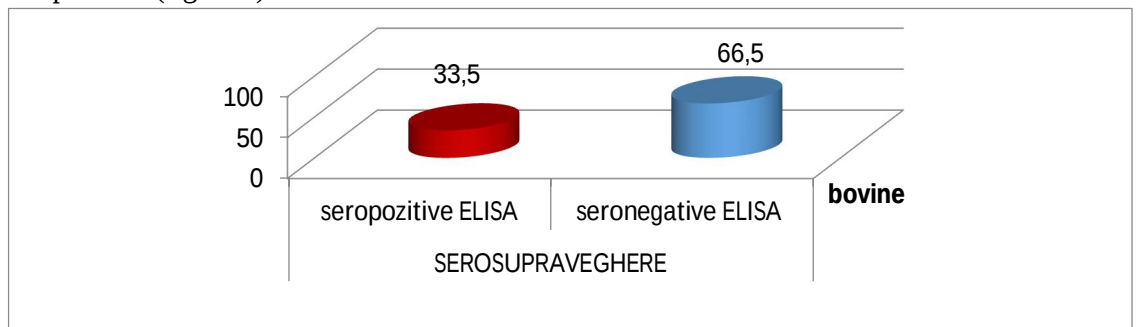


Fig.4.26 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă, din județul Brăila, în 2017

Fig.4.26.Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals, in Brăila,in 2017

Evoluția incidenței anticorpilor anti-BTV este diferit de celelalte județe luate în studiu (fig.4.27). Anul 2014 a fost reper în evoluția bolii *Bluetongue*, așa încât, situația în județele limitrofe județului Buzău a fost similară, în Brăila fiind identificate atât animale seropozitive la BTV precum și animale aflate în evoluție clinică (suspectați de boală și confirmați).

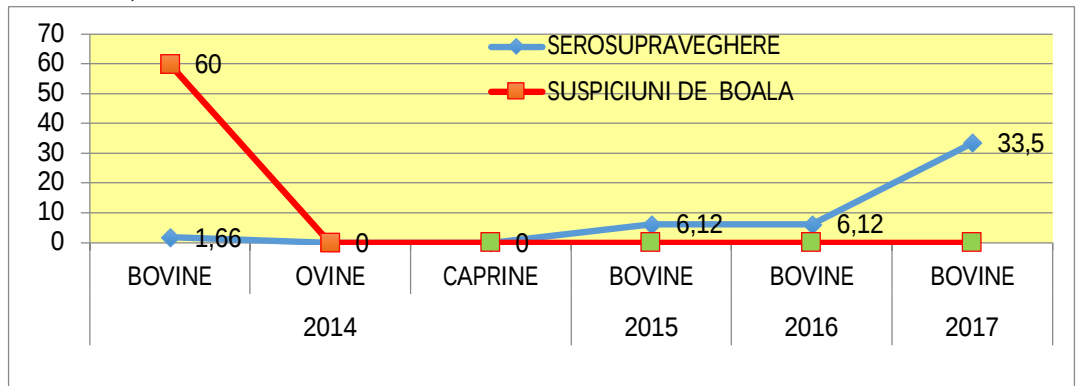


Fig. 4.27. Evoluția seroprevalenței anticorpilor anti-BTV în perioada 2014-2017, în Brăila

Fig.4.27. Evolution of the seroprevalence of anti-BTV antibodies, between 2014-2017, in Brăila

Atipic situației generale, în acest județ, începând cu 2015, nu au mai existat suspiciuni de boală la animalele receptive.

Analizând trendul evolutiv al incidenței anticorpilor anti BTV s-a constatat că, ponderea la bovine, a crescut de la un an la altul, ajungând în 2017 la un vârf procentual (33,5%). În acest context, incidența tot mai ridicată a anticorpilor specifici, identificați la animalele santinelă (aflate sub supraveghere serologică activă), arată faptul că, virusul circulant s-a extins continuu sub acțiunea conjugată a factorilor favorizanți.

4.3.3. Concluzii

In județul Brăila, în perioada 2014–2017, înau fost testate prin tehnica ELISA de competiție, 2388 probe de ser prelevate de la 2306 bovine, 36 ovine și 36 caprine iar rezultatele diferă în funcție de ani și specie.

1. În **anul 2014**, au fost testate:
 - a. 180 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, din care 1,66% (n=3) au fost seropozitive și 98,34% (n=18) seronegative la virusul *Bluetongue*,
 - b. 36 ovine serosupravegheate *Bluetongue*, au fost seronegative,
 - c. 36 caprine serosupravegheate *Bluetongue*, au fost seronegative,
 - d. 5 bovine semnalate cu suspiciune de boală, din care 60% (n=3) au fost seropozitive și 40% (n=2) seronegative,
 - e. 5 caprine semnalate cu suspiciune de boală, au fost seronegative la virusul *Bluetongue*.
2. În **anul 2015**, au fost testate:
 - a. 996 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, din care 6,12% (n=61) au fost seropozitive și 93,87% (n=935) seronegative la virusul *Bluetongue*
 - b. 45 bovine semnalate cu suspiciune de boală, din care 17,77% (n=8) au fost seropozitive și 82,22% (n=37) seronegative.
 - c. Nu au fost identificate suspiciuni de boală la ovine și caprine.
3. În **anul 2016**, au fost testate:
 - a. 483 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, din care 6,21% (n=30) au fost seropozitive și 93,78% (n=935) seronegative.
 - b. Nu au fost identificate suspiciuni de boală la bovine, ovine și caprine.
4. În **anul 2017**, au fost testate:
 - a. 597 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, din care 3,35% (n=20) au fost seropozitive și 96,64% (n=935) seronegative.
 - b. Nu au fost identificate suspiciuni de boală la bovine, ovine și caprine.

4.4. Supravegherea serologică în județul Tulcea

Aflat în extremitatea Sud-Estică a României, județul Tulcea, are o suprafață de 4857 km² și în anul 2014, deținea 535432 animale domestice receptive la boala limbii albastre, dintre aceste 41.051 fiind bovine, 407.862 ovine și 86.519 caprine (ANSVSA, 2014).

Deși, în Tulcea au existat și există condiții topo-climaterice favorabile culicoidelor vectoriali și animale receptive, totuși, virusul *Bluetongue* nu a fost identificat până în 2014 când au fost semnalate primele focare de boală în Buzău.

Virusul *Bluetongue* poate ajunge într-o zonă indemnă fie prin culicoide contaminate, fie prin animale gazdă (domestice sau sălbatic) infectate. În perioada ianuarie 2013-iunie 2014, în județul Tulcea au fost introduse prin comerțul intracomunitar, efective de ovine din Grecia, Italia și Ungaria unde, anterior au evoluat focare de boală (ANSVSA, 2014).

4.4.1 Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, au fost testate 4628 probe de seruri, obținute de la rumegătoarele domestice din județul Tulcea (tabel 4.13.).

Tabel 4.13. /Table 4.13.

Distribuția numerică a probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele din județul Tulcea
Numerical distribution of blood samples collected from ruminants of the Tulcea

JUDEȚE	SPECII	ACȚIUNI	PERIOADA				
			2014	2015	2016	2017	TOTAL PROBE
TULCEA	bovine	SP	672	1552	1218	1174	4616
		SB	0	0	0		0
	ovine	SP	8	0	0	0	8
		SB	0	0	0	0	0
	caprine	SP	4	0	0	0	4
		SB	0	0	0	0	0
	TOTAL PROBE/AN		684	1552	1218	1174	4628

Abrevieri: SP- *supraveghere serologică*; SB- *suspiciuni de boală*

Probele de sânge au fost prelevate de la rumegătoarele domestice santinelă din localitățile țintă stabilite pentru județul Tulcea (tabel 4.14.) și de la animalele care au fost semnalate cu suspiciuni de boală. Prelevările au fost efectuate în lunile iunie, septembrie și noiembrie.

A. Prelevarea și condiționarea probelor biologice

Prelevarea, transportul și prelucrarea probelor s-au efectuat conform metodologiei din *Manualului OIE de teste de diagnostic și vaccinuri pentru animale terestre*, cap.2.1.3., *Bluetongue*, ed.VII.2014, iar descrierea acestor etape a fost prezentată la subcap. 4.1.1.1.

Probele de sânge au fost expediate și prelucrate în Laboratorului de Serologie Virală, din cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor, din județul Tulcea.

**Unitățile țintă de asistență sanitară veterinară conform Programului Național de
Supraveghere a Bluetongue(Ord.35/2016).
The veterinary assistance units according to the National Bluetongue Surveillance Program
(Ord.35 / 2016).**

JUDETUL	Suprafața totală a județului/km ²	Nr. de C.S.V. de asistență țintă	Localitățile țintă
TULCEA	8499	4	Măcin Baia Nufăru Sulina

Supravegherea serologică s-a efectuat utilizând aceeași tehnică imunoenzimatică **ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).**

B.Testul imunoenzimatic ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Probele au fost testate cu două kituri ELISA: în anul 2014, a fost utilizat kitul **ELISA “Dubla Recunoaștere” (INGEZIM BTV DR/ INGENASA)**, iar din 2015 până în 2017 s-a folosit kitul **ELISA Pourquier de competiție (IDEXX-Franța)**, care a fost descrisă la subcap. 4.1.1.

Kitul ELISA “Dubla Recunoaștere”(INGEZIM BTV DR/ INGENASA) a fost utilizată pentru identificarea Atc anti-BTV din serul rumegătoarelor receptive la virusul *Bluetongue*.

a.Principiul kitului ELISA “Dubla Recunoaștere”(INGEZIM BTV DR/ INGENASA)

Faza solidă este reprezentată de microplăciile căptușite cu proteina VP7 a virusului *Bluetongue*. După adăugarea probei în godeu, dacă aceasta conține anticorpi specifici de BTV, ei se vor lega cu antigenul existent în căptușeala plăcii. În cazul în care, probele de ser conțin anticorpi specifici, acestea vor bloca antigenul de pe placă și nu vor permite legarea Mab (anticorpilor monoclonali). Dacă probele nu conțin anticorpi specifici BTV, Mab se vor lega de antigenul care captușește placa. Astfel, după spălarea godeurilor, pentru eliminarea tuturor materialelor nefixate, se poate detecta prezența sau absența anticorpilor monoclonali (Mab), adăugând substratul (TMB) care, în prezența peroxidazei, va dezvolta o reacție colorimetrică.

Pentru realizarea testului au fost necesare aceleași materiale prezentate la subcapitolul 4.1.1.2.

c. Componentele kitului:

- Placă cu 96 godeuri
- Fiola cu ser control pozitiv BTV (gata preparat).
- Fiola cu ser control negativ BTV (gata preparat).
- Flacon cu conjugat (BTV VP7-HRPO),(gata preparat).
- Flacon cu soluție de spălare concentrat 25x.
- Flacon cu diluant (DE01-01) (gata preparat).
- Flacon cu substrat (TMB) (gata preparat).
- Flacon cu soluție de stopare.

c. Tehnica de lucru pentru kitul ELISA imunoenzimatic “Dubla Recunoaștere

- Soluția de spălare concentrată a fost diluată 1/9 în apă distilată deionizată.
- Serurile de control s-au adăugat câte 100 μ l/godeu.
- Conjugatul s-a diluat în proporție de 1/100 cu diluantul livrat în trusă.
- Probele de ser de testat, s-au diluat în proporție de 1/2 în diluent. Diluarea s-a făcut direct în placă prin adăugarea a 50 μ l diluent și 50 μ l proba în fiecare godeu.
- S-a adăugat 100 μ l control pozitiv și 100 μ l control negativ în restul de godeuri. Martorii s-au lucrat în duplicat. Plăcile au fost sigilate și incubate timp de 1 ora la 37°C.
- Spălarea plăcilor a fost efectuată de 6 ori.
- După spălare, s-a adăugat 100 μ l de conjugat în fiecare godeu.
- Plăcile au fost sigilate și incubate timp de 1 ora la 37°C și spălate de 6 ori.
- S-a adăugat câte 100 μ l de substrat în fiecare godeu. Plăcile s-au menținut la temperatura camerei timp de 15 min.
- În fiecare godeu, s-a adăugat 100 μ l de soluție de stopare.
- Citirea densității optice (DO) s-a făcut la spectrofotometru cu lungimea de unda 450 nm (fig.4.28).

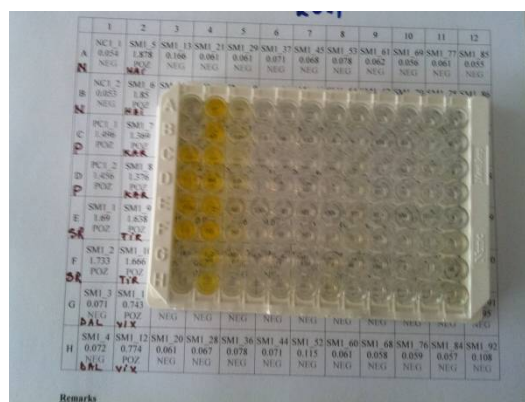


Fig.4.28 Valorile densității optice obținute în urma citirii la spectrofotometru utilizând kitul ELISA “Dubla Recunoaștere-INGEZIM BTV DR/ INGENASA
Fig.4.28. Optical density values obtained after reading the spectrophotometer -ELISA INGEZIM BTV DR/ INGENASA

c. Validarea rezultatelor:

Pentru validarea rezultatelor, la fiecare test ELISA efectuat în laborator sau la interval de 2-3 testări s-a repartizat în placă (în minim 2 godeuri), alături de martorul pozitiv și negativ din trusa, serul intern de referință (control intern) pozitiv pentru virusul *Bluetongue*.

Rezultatele au fost validate atunci când controlul pozitiv a fost mai mare de 0.8 iar controlul negativ mai mic decât *Cut off* (*Cut Off* = 0.15 x Control Pozitiv).

d. Interpretarea rezultatelor:

Probele au fost considerate **pozitive** (cu anticorpi specifici pentru virusul *Bluetongue*), dacă valoarea densității optice la 450 nm, a fost mai mare decât valoarea *cut off* (15% din controlul pozitiv).

Probele au fost considerate **negative** (au lipsit anticorpii specifici pentru virusul *Bluetongue* în proba) dacă valoarea densității optice la 450 nm, a fost egală sau mai mică decât valoarea pozitivă *cut off*.

4.4.3. Rezultate și discuții

În perioada 2014–2017, au fost analizate 4628 probe de ser, care au provenit de la animalele santinelă selectate pentru supraveghere serologică. În această perioadă, s-au prelevat doar probe de ser bovin, iar numărul testărilor a variat de la un an la altul: în 2014- 684 probe de ser, în 2015-1552 probe de ser, în 2016-1218 probe de ser , în 2017- 1174 probe de ser (tabel 4.15).

Tabel 4.15/Table 4.15.

Distribuția probelor prelevate și testate ELISA, în județul Tulcea, 2014-2017
Distribution of samples collected and tested by assays ELISA, in Tulcea, between 2014-2017

TULCEA	Specificare	Probe testate prin SEROSUPRAVEGHERE			Probe testate în caz de suspiciune de boală			TOTAL		
		N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)
2014	Bovine	672	2	670	0	0	0	672	2	670
	Ovine	8	2	6	0	0	0	8	2	6
	Caprine	4	0	4	0	0	0	4	0	4
	Total	684	4	680	0	0	0	684	4	680
2015	Bovine	1552	0	1552	0	0	0	1552	0	1552
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	1552	0	1552	0	0	0	1552	0	1552
2016	Bovine	1218	0	1218	0	0	0	1218	0	1218
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	1218	0	1218	0	0	0	1218	0	1218
2017	Bovine	1174	0	1174	0	0	0	1174	0	1174
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	1174	0	1174	0	0	0	1174	0	1174
Total probe		4628	4	4624	0	0	0	4628	4	4624

Din analiza datelor obținute în cei patru ani de monitorizare, a reieșit că, din cele 4628 probe de ser analizate, doar 0,08% (n=4) probe au fost identificate cu anticorpi anti-BTV, iar 99,92% (n=4624) au fost seronegative la testarea serologică. De asemenea, s-a remarcat absența suspiciunilor de boală la animalele receptive din acest areal geografic (tabel 4.16., fig.4.29).

Seroprevalența BTV la rumegătoarele din județul Tulcea, în perioada 2014-2017**BTV seroprevalence in ruminants from Tulcea, between 2014-2017**

	NR.	SEROPOZITIVE		SERONEGATIVE	
	PROBE	NR	%	NR	%
SEROSUPRAVEGHERE	4628	4	0,08	4624	99,92
SUSPICIUNE DE BOALA	0	0	0	0	0
TOTAL PROBE	4628	4	0,08	4624	99,92

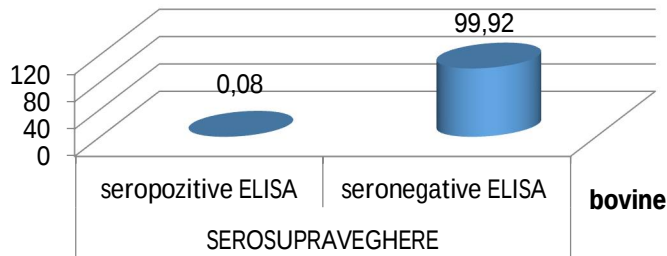


Fig. 4.29 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă din județul Tulcea, în perioada 2014-2017

Fig.4.29. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals, in Tulcea, between 2014-2017

Analizele serologice au pus în evidență anticorpilor specifici pentru virusul *Bluetongue* doar în anul 2014 când a fost semnalat și primul focar de boală în România, la Buzău. Probele seropozitive au provenit de la 0,3% (n= 2) bovine și 25% (n=2) ovine și au lipsit la caprinele monitorizate în acest an (fig.4.30)

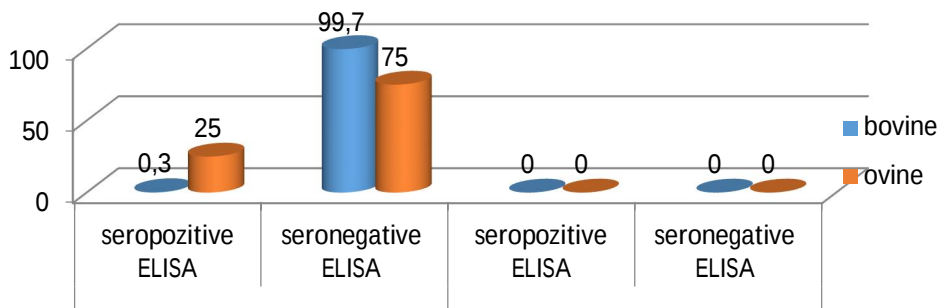


Fig. 4.30 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă, din județul Tulcea, în 2014

Fig.4.30.Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals in Tulcea,in 2014

În următorii trei ani (2015-2017), nu au mai fost identificate animale seropozitive la virusul *Bluetongue*. Prin urmare, animalele santinelă din localitățile monitorizate, nu au intrat în contact cu virusul *Bluetongue* circulant. Din punct de vedere epidemiologic, acest

aspect este remarcabil având în vedere că județul Tulcea este un areal cu deosebite condiții pentru supraviețuirea și înmulțirea vectorilor culicoizi.

4.4.3. Concluzii

În perioada 2014–2017, în **județul Tulcea**, au fost testate prin tehnica ELISA de competiție, 4629 probe de ser prelevate de la 4616 bovine, 8 ovine și 4 caprine iar rezultatele diferă în funcție de ani și specie.

1. În **anul 2014**, au fost testate:
 - a. 672 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, din care 0,29% (n=2) au fost seropozitive și 99,70% (n=670) seronegative,
 - b. 8 ovine serosupravegheate *Bluetongue*, din care 25% (n=2) au fost seropozitive și 75% (n=6) seronegative,
 - c. 4 caprine serosupravegheate *Bluetongue*, au fost seronegative.
2. În **anul 2015**, au fost testate:
 - a. 1552 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, la care nu s-au identificat anticorpi anti-BTV.
 - b. Nu au fost semnalate suspiciuni de boală la bovine, ovine și caprine.
3. În **anul 2016**, au fost testate:
 - a. 1218 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, la care nu s-au identificat anticorpi anti-BTV.
 - b. Nu au fost semnalate suspiciuni de boală la bovine, ovine și caprine.
4. În **anul 2017**, au fost testate:
 - a. 1174 bovine serosupravegheate *Bluetongue*, la care nu s-au identificat anticorpi anti-BTV.
 - b. Nu au fost semnalate suspiciuni de boală la bovine, ovine și caprine.

4.5. Analiza comparativă a supravegherii serologice pentru *Bluetongue* în Sud-Estul României

Supravegherea serologică a rumegătoarelor domestice din regiunea de Sud-Est, a permis detectarea din timp a prezenței virusului *Bluetongue* și colectarea de date și probe biologice care să evidențieze situația epidemiologică a bolii în această regiune.

4.5.1. Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, au fost testate 12846 probe de seruri, prelevate de la 11622 bovine, 990 ovine și 234 caprine din regiunea de Sud Est a României. (tabel 4.5.).

În toate județele, prelevările au fost efectuate în aceleași perioade ale anului: iunie, septembrie și noiembrie.

În laboratoarele județene de serologie virală, probele au fost testate utilizând tehnica imunoenzimatică ELISA de competiție, cu excepția anului 2014, când s-a utilizat kituri

ELISA diferite, pentru identificarea anticorpilor anti-BTV. Începând cu 2015 până în 2017, testările au fost efectuate cu kitul Pourquier de competiție (IDEXX-Franța).

4.5.2. Rezultate și discuții

Din analiza datelor obținute în urma monitorizării serologice, a celor 12846 de rumegătoare provenite din regiunea de Sud-Est, a reieșit faptul că incidența anticorpilor anti-BTV a fost diferită, în funcție de perioadă și arealul geografic luat în studiu (fig.4.31).

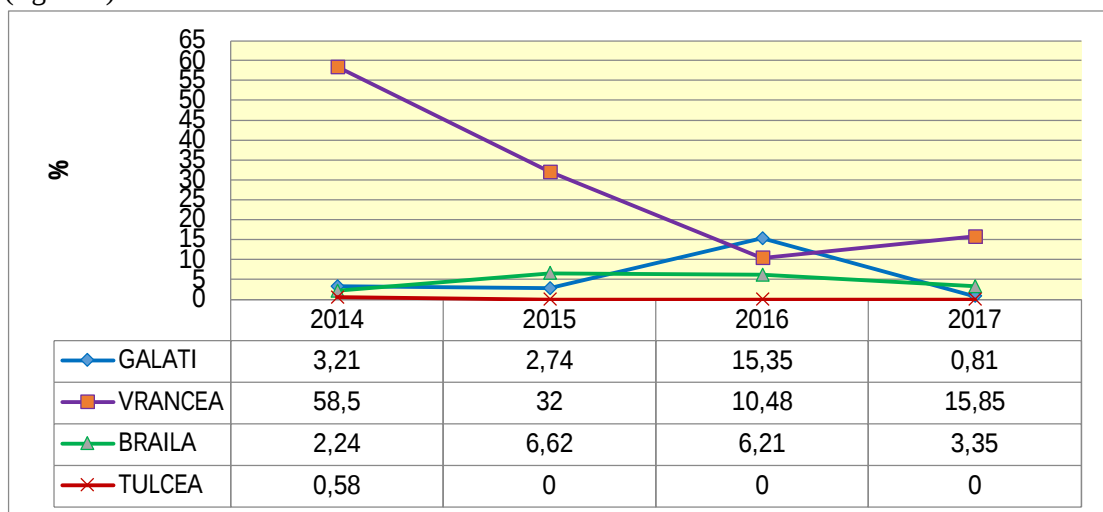


Fig.4.31. Evoluția incidenței Atc anti-BTV, în perioada 2014-2017

Fig.4.31. Evolution of the incidence of anti-BTV antibodies, between 2014-2017

Pe parcursul celor 4 ani, incidența animalelor seropozitive a fluctuat în majoritatea județelor din Sud Estul României, cu excepția județului Tulcea.

Apariția focarelor de *Bluetongue* în județul Buzău a avut drept consecință expunerea ridicată a județelor limitrofe, inclusiv județul Vrancea, care în anul 2014, s-a dovedit a fi zona cu cea mai ridicată incidență a animalelor seropozitive (58,5%). Județul Brăila, deși este un teritoriu aflat în vecinătatea directă a Buzăului, totuși, rezultatele analizelor serologice au pus în evidență o incidență redusă (2,24%) comparativ cu Vrancea. În același an, testarea serologică a animalelor receptive din județul Galați, a scos în evidență prezența anticorpilor anti-BTV fiind raportați cu o incidență de 3,21%, indicator cu valori apropiate de incidența din județul Brăila. În Județul Tulcea, 2014 a fost singurul an în care s-au identificat animale serologic pozitive la virusul *Bluetongue*.

În anul 2015, supravegherea serologică și testarea animalelor cu suspiciune de boală a scos în continuare în evidență, prezența anticorpilor anti-BTV în județele Vrancea (32%), Brăila (6,62%) și Galați (2,74%), dar incidența acestora se afla într-o ușoară regresie, cu excepția județului Brăila, unde ponderea a crescut de la 2,24% la 6,62%. Această accentuare a incidenței animalelor seropozitive în județul Brăila poate fi consecința propagării insectelor vectoriale în acest teritoriu, unde au găsit condiții topoclimatice optime pentru înmulțirea și supraviețuirea acestora.

În anul 2016, rata de morbiditate generală sau incidența animalelor seropozitive la *Bluetongue*, a oscilat între 6,21% în județul Brăila și 15,35% în județul Galați. S-a remarcat județul Galați, unde s-a evidențiat o creștere semnificativă a incidenței de la 2,74% (2015) la 15,35% (2016) comparativ cu județul Vrancea unde s-a constatat o scădere semnificativă a incidenței de la 32% (2015) la 10,48% iar în județul Brăila, indicii de incidență (6,21%) a fost apropiat valoric de anul anterior (6,62%).

În anul 2017, examenele de laborator identifică în continuare, animale seropozitive la *Bluetongue* în regiunea de Sud-Est a României. Se remarcă o diminuare semnificativă a incidenței animalelor cu anticorpi anti-BTV în județul Galați, reducându-se de la 15,35% (2016) la 0,81% (2017). O scădere importantă a incidenței animalelor seropozitive s-a constatat și în județul Brăila, unde în anul 2017, ponderea a fost de 3,35% comparativ cu anul anterior (6,21%). În Vrancea, situația epidemiologică a fost diferită comparativ cu județele învecinate, întrucât, contrar așteptărilor, măsurile specifice de supraveghere și prevenire, nu au dus la diminuarea incidenței acestora, ci la creșterea ponderii până la 15,85%.

Dintre toate județele monitorizate, Vrancea a fost teritoriul cu cea mai ridicată incidență a animalelor seropozitive la *Bluetongue*. Având în vedere granița teritorială cu localitățile din județul Buzău, unde a evoluat boala, precum și relieful asemănător în cele două județe, putem suspecta implicarea animalelor sălbatice în transmiterea virusului *Bluetongue* în această regiune. La rumegătoarele sălbatice, boala poate evolua inaparent, însă virusul persistă în organism timp de luni sau ani de zile. Prin intermediul acestor animale, virusul poate ajunge din zonele infectate, așa cum a fost județul Buzău, în zonele indemne de boală, prin migrațiile sezoniere. Apariția și extinderea populațiilor de culicoide vectoriale în majoritatea regiunilor din țară, și în mod special în regiunea de Sud-Est a României, a crescut riscul contaminării acestora cu virusul *Bluetongue*, prin contactul cu animalele sălbatice, devenind sursă de infecție pentru animalele domestice.

Această variabilitate, în cadrul monitorizării serologice, arată caracterul oscilant și capacitatea de propagare a virusului în zonele evaluate.

Analiza de ansamblu a rezultatelor obținute în această regiune, ne-a arătat că perioada de patru ani de zile, derulată de la momentul semnalării *Bluetongue* în România, nu este suficientă pentru regresia totală a circulației virale.

Mai mult, la baza estompării incidenței animalelor seropozitive, au stat măsurile sanitar- veterinar și administrative impuse pe parcursul acestor ani consecutivi.

Probele de sânge provenite de la animalele care au prezentat seroconversie și de la animalele cu suspiciuni de boală seropozitive au fost reexamineate la Institutul de Sănătate animală (IDSA) pentru determinarea serotipului viral prin testul de virusneutralizare (VMT). Serotipul circulant în România a fost BTV4, serotip comun regiunii de SE a Europei, fiind prezent și în Albania, Bulgaria, Grecia, Serbia, Ungaria și Turcia.<http://www.oie.int/>. Conform rapoartelor ANSVSA (2014), cu aceste țări, unde *Bluetongue* a evoluat de-a lungul timpului, au existat relații de comerț intracomunitar și de import, fiind aduse pe teritoriul României, rumegătoare domestice și sălbatice. În anul 2014, *Bluetongue* a evoluat în Italia, Grecia și Ungaria și au fost considerate țări cu

focalitate naturală, întrucât erau îndeplinite cele trei condiții limitative, respectiv: virusul *Bluetongue*, prezența culicoidelor vectoriale și prezența speciilor de animale receptive. Din aceste țări s-au importat atât ovine, care au avut ca destinație, inclusiv județele din Sud Estul României, respectiv județul Galați, Tulcea (2013), Brăila cât și bovine care au ajuns în județele Brăila (2013, 2014), Galați (2013, 2014), Vrancea (2014). Serotipul 4 al virusului *Bluetongue* care a fost identificat și la animalele din România, a evoluat doar în Grecia și Ungaria, în Italia evoluând doar serotipul 1.

Prezența anticorpilor anti-*Bluetongue*, ne demonstrează că virusul este circulant în arealul zonal și este necesară continuarea supravegherii serologice a animalelor receptive și eliminarea animalelor bolnave sau purtătoare de virus *Bluetongue*, simultan cu identificarea și eliminarea culicoidelor vectoriali care sunt responsabili pentru apariția focarelor noi de boală.

4.5.3. Concluzii

În perioada 2014-2017, în regiunea de Sud-Est a României au fost testate serologic 12846 de animale receptive, iar incidența anticorpilor anti-BTV, a fost variabilă în funcție de perioadă și arealul geografic luat în studiu.

1. În anul 2014, județul Vrancea a avut cea mai ridicată incidență (58,5%) a animalelor seropozitive, urmat de Galați (3,21%), Brăila (2,24%) și Tulcea (0,58%).

2. În anul 2015, incidența animalelor seropozitive la *Bluetongue* s-a aflat într-o ușoară regresie, diminuându-se la 32% în Vrancea, la 2,74% în Galați, și la 0% în Tulcea, cu excepția județului Brăila, unde ponderea a crescut la 6,62%.

3. În anul 2016, s-a remarcat județul Galați, printr-o creștere semnificativă a incidenței de la 2,74% (2015) la 15,35% (2016), comparativ cu județul Vrancea, unde incidența a scăzut semnificativ de la 32% (2015) la 10,48%, iar în județul Brăila, indicele de incidență (6,21%) a fost apropiat valoric de anul anterior (6,62%).

4. În anul 2017, incidența animalelor seropozitive:

- a. a suferit o diminuare semnificativă de la 15,35% (2016) la 0,81% (2017) în județul Galați, iar în județul Brăila incidența s-a redus de la 6,21% (2016) la 3,35% (2017),
- b. a crescut de la 10,48% la 15,85% în județul Vrancea.
- c. În județul Tulcea, nu s-au identificat animale seropozitive la *Bluetongue*.

5. Variabilitate indicelui de incidență, în cadrul monitorizării serologice, arată caracterul oscilant și capacitatea de propagare a virusului în regiunea de Sud-Est a României.

6. Monitorizarea serologică efectuată în perioada 2014-2017, la rumegătoarele domestice, a evidențiat prezența continuă a anticorpilor specifici pentru virusul *Bluetongue*, în regiunea de Sud-Est a României.

CAPITOLUL V INVESTIGAȚII VIRUSOLOGICE ÎN *BLUETONGUE*

CHAPTER V VIROLOGICAL INVESTIGATION IN *BLUETONGUE*

Diagnosticul în *Bluetongue* întâmpină greutăți deosebite în zonele în care nu a evoluat boala și relativ ușor de precizat în regiunile endemice unde se bazează pe aspectele epidemiologice, clinice și anatomopatologic. Confirmarea bolii se face prin examene de laborator care să pună în evidență virusul *Bluetongue* atât la animalele receptive cât și la speciile vectoriale din același areal geografic, utilizând tehnici elaborate în acest sens.

Prezența virusului circulant poate fi semnalată prin examene serologice cum ar fi: ELISA, Fixarea complementului, imunodifuzia în gel de agar care evidențiază anticorpii specifici anti-BTV. Identificarea virusului *Bluetongue* poate fi efectuată prin tehnici virusologice clasice (inoculare pe ouă embrionate sau pe linii de culturi celulare diferențiate, imunofluorescența) sau *Real-time-RT-PCR*. Pentru identificarea serotipului se pot utiliza diferite teste, precum: testul peroxidazei-antiperoxidazei, tehnica de virus neutralizare și tehnica ELISA (Moga Mânzat, 2005, Baranguță, 2010).

Tehnica Real Time-RT-PCR este în acest moment atât de puternic implicată în domeniul biologiei moleculare încât este dificil de a gândi studiul fenomenelor vieții fără utilizarea acestuia.

Noțiunea de “acid nucleic insuficient” nu mai prezintă un factor limitativ în cercetarea și diagnosticul medical. Mai mult chiar, cercetătorii din întreaga lume au diversificat permanent aplicațiile testului RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays*), contribuind astfel la amplificarea utilității acestei tehnici.

Cercetările s-au efectuat în județele Galați, Vrancea, Brăila și Tulcea, în perioada 2014- 2017 pe probele de sânge prelevate de la animalele seropozitive din exploatațile santinelă și de la animalele cu suspiciuni de *Bluetongue*.

Scopul acestor investigații a fost de a identifica prezența genomului viral la rumegătoare domestice și de a stabili indicele de incidență în regiunea de Sud-Est a României.

5.1. Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, au fost diagnosticate 1024 animale seropozitive la *Bluetongue* și de la care s-au prelevat probe de sânge, în vederea efectuării examenului virusologic (tabel 5.1.).

Tabel 5.1./Table.5.1.

Distribuția numerică a animalelor seropozitive la BTV și testate prin examen virusologic
Numerical distribution of BTV seropositive animals and tested by virological examination

JUDEȚE			NR.PROBE POZITIVE ATC.ANTI-BTV/PERIOADA				
	SPECII	ACȚIUNI	2014	2015	2016	2017	TOTAL PROBE
VR	bovine	SP	-	291	112	26	429
		SB	161	1	-	-	162
	ovine	SP	-	-	-	-	-
		SB	204	1	-	-	205
	caprine	SP	-	-	-	-	-
		SB	-	3	-	-	3
TOTAL PROBE/AN			365	296	112	26	799
GL	bovine	SP	5	-	45	11	61
		SB	4	31	-	-	35
TOTAL PROBE/AN			9	31	45	11	96
BR	bovine	SP	3	61	30	20	114
		SB	3	8			11
TOTAL PROBE/AN			6	69	30	20	125
TL	bovine	SP	2	-	-	-	2
		SB	-	-	-	-	
	ovine	SP	2	-	-	-	2
		SB	-	-	-	-	-
TOTAL PROBE/AN			4	-	-	-	4
TOTAL PROBE PERIOADĂ			384	396	187	57	1024

Abrevieri: VR-Vrancea, GL-Galați, BR-Brăila, TL-Tulcea

Animale seropozitive au provenit atât din efectivele de rumegătoare santinelă, care au fost supuse periodic supravegherii serologice, cât și din grupul animalelor cu suspiciuni de boală.

În cadrul studiului efectuat, conduita diagnosticului virusologic a constatat în evidențierea genomului viral din probele de sânge prelevate de la animalele seropozitive identificate în urma investigațiilor serologice efectuate prin tehnica ELISA de competiție.

Examenul virusologic este obligatoriu și urmează examenului serologic, în vederea stabilirii cu certitudine, a diagnosticului de boala limbii albastre (*Bluetongue*), (fig.5.1.)

Prelevarea probelor de sânge, necesare examenului virusologic, s-a efectuat cu seringi sterile, vidate, de tip vacutainer și cu EDTA.

Probele recoltate de la animalele au fost prelucrate în Laboratoarele de Biologie moleculară județene. Toate probele pozitive la Real Time-RT-PCR(*Revers Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) pentru confirmare au fost reexaminare și în Laboratorul de Arboviroze din cadrul Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală (IDSA) București.

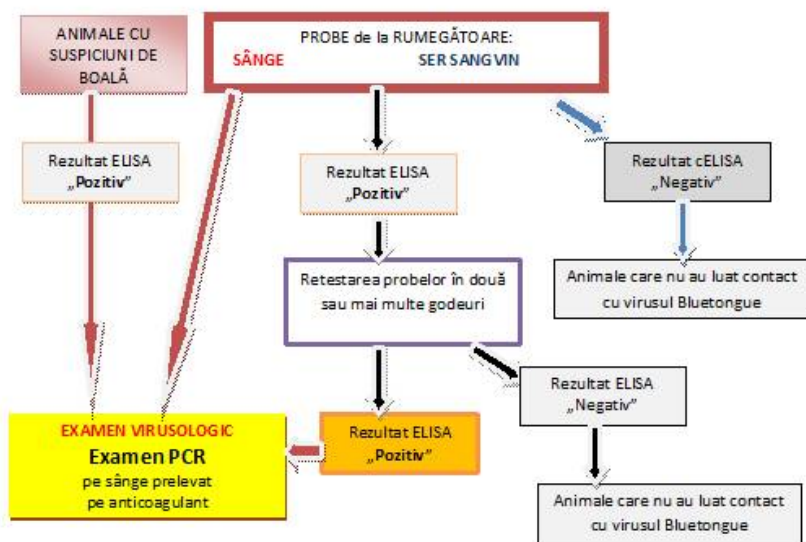


Fig.5.1. Diagrama flux pentru supravegherea bolii limbii albastre (adaptare după Manualul de diagnostic *Bluetongue*, 2010)

Fig.5.1. Flowchart for Bluetongue disease surveillance (adapted from *Bluetongue Diagnostic Manual*, 2010)

Această metodă real-time-RT-PCR este rapidă, specifică, sensibilă și reproductibilă permite detecția genomului specific virusului *Bluetongue* din probele biologice.

Întrucât virusul *Bluetongue* face parte din Grupa 2 de Risc (conform clasificării OMS) testările s-au efectuat în condiții specifice de biosecuritate.

Probele de sânge care au fost pozitive la testarea RT-PCR au fost reexaminare și la IDSA în vederea confirmarea serotipului viral circulant.

Identificarea genomului specific virusului bluetongue prin testul Real-Time RT-PCR(*Revers Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*)

Real time -RT-PCR este utilizat pe scară largă în domeniile științelor medicale și biologice, fiind o metodă de diagnostic cu înaltă precizie și poate identifica cantități foarte mici de ADN viral.

a. Principiul metodei

Tehnica *Real Time RT-PCR* se bazează pe măsurarea fluorescenței care crește exponențial și proporțional cu numărul de copii de acid nucleic generate la fiecare ciclu de reacție.

În comparație cu testul *RT-PCR* clasic, în acest tip de test *PCR* se folosesc și sonde marcate, a căror fluorescență emisă în timpul reacției se vizualizează *on-line*, în timp real, pe monitorul sistemului de amplificare.

b. Reactivi necesari pentru efectuarea *RT-PCR*

- ✓ QIAzol(Trizol)/ Soluție lizare ARN
- ✓ Cloroform
- ✓ Etanol absolute
- ✓ standard stoc – probe de sânge provenite de la animale infectate natural (se păstrează la congelator la -80°C)

c. Primeri si sonde:

BTNS probe - 6 FAM-

CGCTTTTGTGAGAAAATACAACATCAGTGGGGAT-TAMRA

BTNS-1-F – TGGCAACCACCAAACATGG

BTNS-1-R – CCAAAAAAGTCCTCGTGGCA;

d. Consumabile utilizate:

- ✓ Tipsuri –conuri, vârfuri de polipropilenă, de diferite mărimi pentru pipete automate
- ✓ Tuburi Eppendorf de 0.2 , 0.5 , 1.5 ml.
- ✓ Tavițe cu pereți dubli pentru gheață;
- ✓ Capilare pentru LightCycler ;
- ✓ Containere de Biohazard de 1000 ml pentru tipsuri.
- ✓ Containere de Biohazard pentru deșeuri.

e. Pregătirea probelor pentru extracție :

Probele de sânge prelevate pe anticoagulante (EDTA) de la rumegătoarele cu suspiciuni de *Bluetongue*, au fost repartizate în tuburi de vacutainer și centrifugate la 2500 rpm timp de 5 minute. După aspirarea plasmiei, 250 μl din depozitul eritrocitar a fost transferat într-un tub Eppendorf. S-a adăugat 750 μl de reactiv Trizol, s-a omogenizat prin inversie energetică, centrifugare de tip spin și s-a incubat 5 minute la temperatura camerei. După adăugarea a 200 μl de solvent organic (cloroform) s-a omogenizat amestecul prin vortexare timp de 20 de secunde, până la obținerea unei suspensii de culoare ciocolatie și s-a incubat la temperatura camerei timp de 2 minute. Separarea fazelor s-a realizat în urma centrifugării la 13000 rpm timp de 20 minute. Pentru extracția ADN-ului s-au recoltat 400 μl din supernatantul obținut.

f. Extracția acizilor nucleici

Pentru extracție s-au utilizat 4 tipuri de kituri diferite, fiecare dintre acestea având etape asemănătoare de lucru:

- KITUL "PURE LINK RNA MICRO KIT" (Invitrogen)
- RNA CLEAN & CONCENTRATOR™-5" (Zymo Research)
- KITUL "NucleoSpin® RNA XS"(Macherey Nagel)
- KITUL "Favor Prep After Tri-Reagent RNA Clean-Up Kit"(Favorgen)

g. Prepararea mixului de denaturale pentru Testul *RT-PCR*

Reagenții utilizați au fost vortexați și centrifugați tip spin la 10000 rot/min. Mixul s-a preparat pe gheață, conform protocolului.

Mixul obținut a fost omogenizat prin pipetare.

h. Cuplarea mixului de denaturare cu ARN viral

În camera de cuplare au fost transferate în tuburi de 2 ml, o cantitate de 6 μ l de mix de denaturare și 10 μ l de proba ADN. După omogenizarea prin pipetare, tuburile s-au incubat 3 minute la 95°C, apoi au fost centrifugate tip spin la rece, pentru colectarea amestecului.

i. Cuplarea mixului final cu mixul de denaturare

Mixului final a fost realizat utilizând kiturile de amplificare a acizilor nucleici, specifice kiturilor utilizate :1. „OneStep RT-PCR” (Qiagen), Bioscript™ One-Step RT-PCR kit” (Bioline); 2. „SuperScript™ III Platinum ®, OneStep Quantitative RT-PCR System (Invitrogen); 3. Realizarea mixului final utilizand kitul „PCRBIO One-Step RT-PCR kit” (PCR Biosystems); 4. AgPath-ID™ OneStep RT-PCR kit:

Mixul preparat se transmite pe gheață în „camera de cuplare”. În incinta de lucru PCR din „camera de cuplare”, în placi optice, se realizează cuplarea master-mixului cu proba de ADN adusă din laboratorul „Extracție acizi nucleici” (fig.5.2.). Cuplarea se realizează pe gheață. Se pipeteaza 11 μ l amestec de reacție și 9 μ l ADN.



Fig.5.2. Cuplarea mixului cu probele de ADN

Fig.5.2. Coupling the mix with DNA samples

j. Realizarea amplificării in LightCycler

Pentru realizarea amplificării a fost utilizat sistemul 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)(fig.5.3.).



Fig. 5.3. Sistemul 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Fig. 5.3. 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Programele utilizate au inclus o serie de etape în care au fost selectate și completate câmpurile cu tipul de program, numărul de cicluri, modul de analiză, temperatura și durata precum și poziția probele de analizat, martorii pozitivi și negativi de extracție și de cuplare. După finalizarea programului de amplificare, s-a selectat opțiunea de detecție cantitativă.

k. Exprimarea rezultatelor

Pentru testul *Real-Time RT-PCR*, rezultatele se interpretează în funcție de aspectul curbelor de amplificare și de momentul începerii amplificării.

Testul se validează dacă martorii pozitivi de extracție și de cuplare s-au amplificat iar controalele negative de extracție și de cuplare au fost negative (fig.5.4., fig.5.5.).

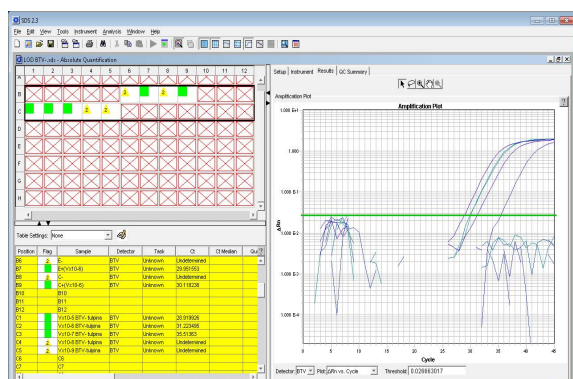


Fig.5.4. Real time-RT-PCR - Aspectul curbele de amplificare în timp real a materialului genetic (calibrarea programului)

Fig.5.4. Real time-RT-PCR - Appearance of real-time amplification curves of genetic material (program calibration)

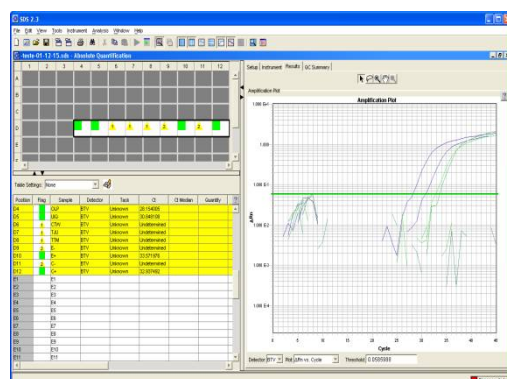


Fig.5.5. Real time-RT-PCR Aspectul curbelor de amplificare la testarea probelor biologice: probele pozitive au un Ct sub cel al martorilor E+ și C+.

Fig.5.5. Real time-RT-PCR Aspects of amplification curves when testing biological samples: positive samples have a CT below the E+ and C+ controls.

Pentru testul *Real-Time RT-PCR* rezultatele se interpretează astfel:

- Probele cu $Ct = 39-41$ - se repetă experimentul
- probele cu $Ct \leq 39$ – pozitive
- probele cu $Ct \geq 41$ – negative;

5.2. Rezultate și discuții

În județul Vrancea, examenul virusologic realizat prin tehnica *Real-Time- RT-PCR*, s-a efectuat pe 429 probe de sânge prelevate de la animalele cu seroconversie aflate în exploatarea santinelăși 370 de animale cu suspiciuni de boală, care au fost identificate cu anticorpi anti-BTV (fig.5.6.).

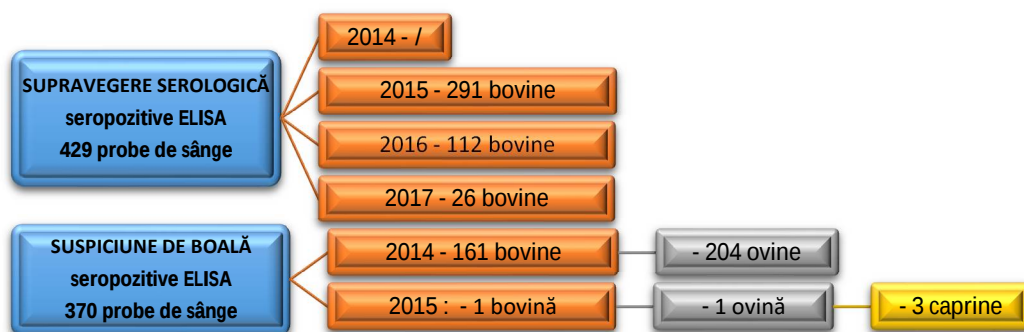


Fig.5.6. Distribuția numerică a probelor prelevate de la animalele seropozitive pentru BTV și testate prin *Real-Time RT-PCR*, în Vrancea, perioada 2014-2017

Fig.5.6. Numerical distribution of samples collected from BTV seropositive animals and tested by *Real-Time RT-PCR*, in Vrancea, 2014-2017

Prin *Real-Time RT-PCR*, au fost testate probele de sânge prelevate de la animalele cu suspiciune de boală și de la animalele seropozitive la testul ELISA (tabelul 5.2.).

Tabel 5.2./Table 5.2.

Rezultatele examenului virusologic efectuat prin *Real Time-RT-PCR*, județul Vrancea, 2014-2017

The results of the virological examination, carried out by *Real Time-RT-PCR*, Vrancea, 2014-2017

VRANCEA		SS	TESTATE <i>Real Time-RT-PCR</i>				SB	TESTATE <i>Real Time-RT-PCR</i>			
	Specii	(+) NR		(-) NR		%	(+) NR		(-) NR		%
		NR	%	NR	%		NR	%	NR	%	
2014	Bovine	0	-	-	-	-	161	77	47,83	84	52,17
	Ovine	0	-	-	-	-	204	102	50	102	50
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Total	0	-	-	-	-	365	179	49,00	186	51,00
2015	Bovine	291	-	-	291	100	1	-	-	1	100
	Ovine	0	-	-	-	-	1	-	-	1	100
	Caprine	0	-	-	-	-	3	-	-	3	100
	Total	291	-	-	291	100	5	-	-	5	100
2016	Bovine	112	-	-	112	100	0	-	-	-	-
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Total	112	-	-	112	100	0	-	-	-	-
2017	Bovine	26	-	-	26	100	0	-	-	-	-
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Total	26	-	-	26	100	370	-	-	-	-
TOTAL		429	-	-	429	100	370	179	49,00	186	51,00

Abrevieri : SS- *Supraveghere serologică*

SB- *Suspiciune de boală*

În anul 2014, au fost identificate 161 de bovine și 204 ovine cu suspiciuni de boală și seropozitive la testarea ELISA de competiție.

Probele de sânge prelevate de la cele 365 de animale seropozitive au fost testate prin *Real-Time RT-PCR*, pentru confirmarea etiologiei bolii.

În urma efectuării testelor de biologie moleculară, a fost pus în evidență genomul virusului *Bluetongue* la 47,83% (n=77/161) probe de sânge bovin și în 50% (n=102/204) probe de sânge ovin (fig.5.7.).

În anul 2015, au fost testate prin *Real-Time RT PCR*, 291 probe de la bovinele santinelă seropozitive și 5 probe de sânge provenite de la 1 bovină, 1 ovină și 3 caprine care au manifestat semne clinice de *Bluetongue* și au fost seropozitive la virusul *Bluetongue*. Analizele efectuate nu au evidențiat prezența genomului viral la probele testate.

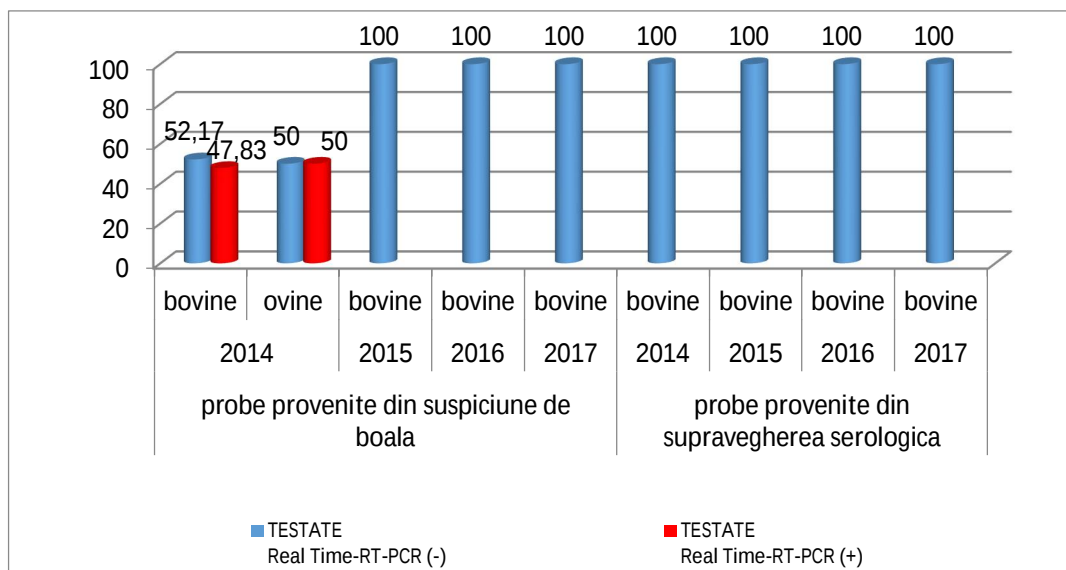


Fig.5.7. Incidența virusului *Bluetongue* identificat prin *Real Time-RT-PCR*, în județul Vrancea, 2014-2017

Fig.5.7. The incidence of *Bluetongue* virus identified by *Real-Time RT-PCR*, in Vrancea, 2014-2017

În 2016, au fost identificate 112 bovine seropozitive iar în anul 2017 au fost semnalate 26 bovine cu suspiciune de boală și seropozitive la BTv. În urma testării virusologice prin *Real-Time RT PCR*, nu a fost identificat virusul *Bluetongue*.

Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele și ovinele din județul Vrancea, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 179 focare de *Bluetongue* semnalate în 43 localități: Naruja, Anghelesti, Bahnele (Vintileasca), Burca, Catauți (Chiojdieni), Ciolanești (Fitionești), Cocoșari (Gura Calîței), Dealu lung (Gura Calîței), Dumitrești, Fagetu, Fitionești, Gugești, Homocea, Irești, Irești (Vidra), Lacu lui Baban (Gura Calîței), Magura, Maicanești, Maracini, Mărăști, Mesteacanu, Muncelu (Straoane), Neculele, Nistorești, Podu Narujei, Podu Șchiopului (Nistorești), Poduri (Valea Sării), Răcoasa, Rasca (Gura Calîței), Ruginești, Sarulesti, Serbănești, Tamboiești (Trestieni), Tănăsari, Tichiriș, Trestieni, Troțușanu, Verdea, Vidra, Vintileasca, Voloșcani.

În **județul Galați**, în perioada 2014-2017, seroconversia a fost semnalată la animalele santinelă pe parcursul monitorizării serologice realizată prin testul ELISA de competiție. De asemenea, testarea serologică a animalelor cu suspiciune de boală a dus la confirmarea bolii prin identificarea anticorpilor specifici pentru virusul *Bluetongue*.

Examenul virusologic efectuat prin tehnica *Real-Time- RT-PCR* s-a efectuat pe 61 probe de sânge recoltate de la animalele santinelă și 35 de animale cu suspiciuni de boală, la care s-au identificat anticorpi anti-BTV (fig.5.8.).



Fig.5.8. Distribuția numerică a probelor prelevate de la animalele seropozitive pentru BTV și testate prin *Real-Time RT-PCR*, în județul Galați, perioada 2014-2017

Fig.5.8. Numerical distribution of samples collected from BTV seropositive animals and tested by *Real-Time RT-PCR*, in Galați, 2014-2017

Seroconversia a fost prezentă la 5 bovine în 2014, la 45 bovine în 2016 și la 11 bovine în 2017. Testarea virusologică prin *Real Time-RT-PCR*, a probelor de sânge, prelevate de la animalele cu seroconversie (animale santinelă seropozitive la BTV), nu a pus în evidență genomul viral *Bluetongue* (tabelul 5.3.).

Tabel 5.3./Table 5.3.

Rezultatele examenului virusologic efectuat prin *Real Time-RT-PCR*, Galați, 2014-2017
Results of the virological examination carried out by *Real-time RT-PCR*, Galați, 2014-2017

Results of the Regional Examination carried out by Real Time-RT-PCR, during 2014-2017											
GALAȚI	Specii	SS	TESTATE Real Time-RT-PCR				SB	TESTATE Real Time-RT-PCR			
		(+) NR	(+) NR	(+) %	(-) NR	(-) %	(+) NR	(+) NR	(+) %	(-) NR	(-) %
2014	Bovine	5	-	-	5	100	4	2	50	2	50
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Total	5	-	-	5	100	4	2	50	2	50
2015	Bovine	0	-	-	-	-	31	-	-	31	100
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Total	0	-	-	-	-	31	-	-	31	100
2016	Bovine	45	-	-	45	100	0	-	-	-	-
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Total	45	-	-	45	100	0	-	-	-	-
2017	Bovine	11	-	-	11	100	0	-	-	-	-
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Total	11	-	-	11	100	0	-	-	-	-
TOTAL PERIOADA		61	-	-	61	100	35	4	11,42	35	88,57

Abrevieri : SS- *Supraveghere serologică*

SB- *Suspiciune de boală*

Examenul virusologic a fost efectuat și la animalele cu suspiciune de boală identificate cu anticorpi anti-BTV. În urma testării prin *Real Time-RT-PCR*, genomul viral a fost pus în evidență în anul 2014 la 50% (n=2) dintre bovinele seropozitive (n=4) (fig.5.9.).

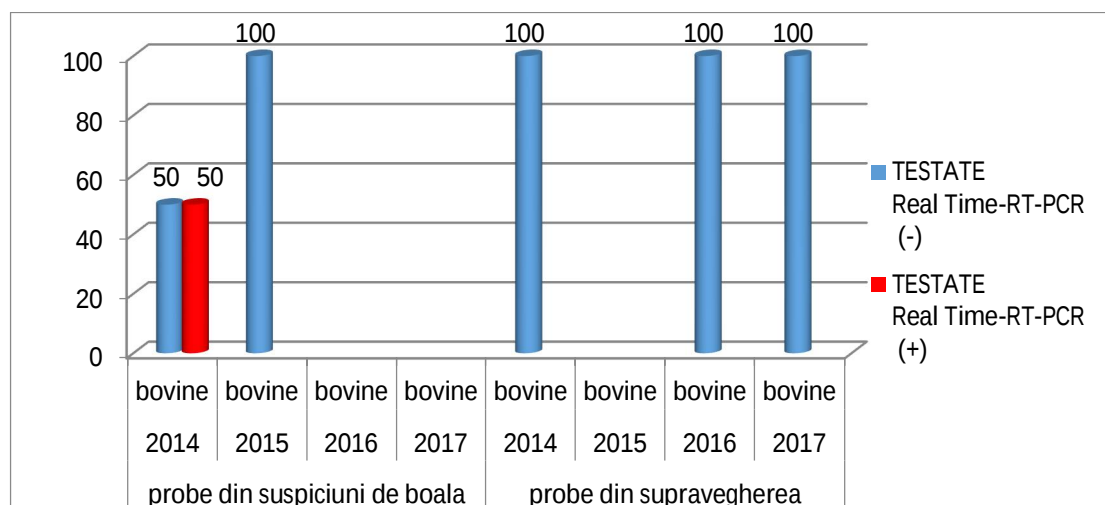


Fig.5.9. Incidența virusului *Bluetongue* identificat prin *Real Time-RT-PCR*, Galați, 2014-2017

Fig.5.9. The incidence of *Bluetongue* virus identified by *Real-time RT-PCR*, in Galați, 2014-2017

În anul 2015 au fost testate prin *Real Time-RT-PCR*, 31 de bovine cu suspiciune de boală și seropozitive. În urma examenului virusologic, nu a fost evidențiat genomul viral la niciuna din probele testate.

Ulterior, în anii 2016-2017, au lipsit suspiciunile de *Bluetongue* la animalele receptive din județul Galați, iar lipsa focarelor de boală confirmă statutul de zonă indemnă la *Bluetongue*, menținut până în prezent.

Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele din județul Galați corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 2 focare de *Bluetongue* semnalate în localitățile: Drăgănești, Munteni.

În județul Brăila, în perioada 2014-2017, au fost identificate animale seropozitive la *Bluetongue*, de la care s-au recoltat probe de sânge, în vederea efectuării examenului virusologic.

Examenul virusologic prin tehnica *Real-Time- RT-PCR* s-a efectuat pe 114 probe de sânge recoltate de la animalele santinelă cu seroconversie și 11 probe de sânge prelevate de la animale cu suspiciuni de boală, la care s-au identificat anticorpi anti-BTV (fig.5.10.).

Seroconversia a fost prezentă la 3 bovine în 2014, la 61 bovine în 2015, la 30 bovine în 2016 și la 20 de bovine în 2017. În urma testării virusologice prin tehnica *Real Time-RT-PCR*, a probelor provenite de la aceste animale seropozitive, a fost identificat genomul viral la 66,66% (n=2) dintre bovinele testate în anul 2014.



Fig. 5.10. Distribuția numerică a probelor prelevate de la animalele seropozitive pentru BTV și testate prin Real-Time RT-PCR, în județul Brăila, perioada 2014-2017

Fig.5.10. Numerical distribution of samples collected from BTV seropositive animals and tested by Real-Time RT-PCR, in Brăila, 2014-2017

Ulterior, în perioada 2015 -2017, virusul *Bluetongue* nu a mai fost identificat la animalele cu seroconversie (tabelul 5.4.).

Tabelul 5.4../Table 5.4.

Rezultatele examenului virusologic efectuat prin Real Time-RT-PCR, județul Brăila, 2014-2017

Results of the virological examination carried out by Real-time RT-PCR, Galați, 2014-2017

BRĂILA	Specii	SS						SB					
		TESTATE Real Time-RT-PCR						TESTATE Real Time-RT-PCR					
		(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
		NR	NR	%	NR	%	NR	NR	NR	%	NR	%	
2014	Bovine	3	2	66,66	1	33,33	3	3	100	-	-	-	
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	
	Total	3	2	66,66	1	33,33	3	3	100	-	-	-	
2015	Bovine	61	-	-	61	100	8	-	-	-	8	100	
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	
	Total	61	-	-	61	100	8	-	-	-	8	100	
2016	Bovine	30	-	-	30	100	0	-	-	-	-	-	
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	
	Total	30	-	-	30	100	0	-	-	-	-	-	
2017	Bovine	20	-	-	20	100	0	-	-	-	-	-	
	Ovine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	
	Caprine	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	
	Total	20	-	-	20	100	0	-	-	-	-	-	
TOTAL		114	2	1,75	112	98,24	11	3	27,27	8	72,72		

Abrevieri : SS- Supraveghere serologică

SB- Suspiciune de boală

În perioada luată în studiu, toate animalele din județul Brăila, cu suspiciuni de boală și identificate cu anticorpi specifici anti-*Bluetongue* au fost testate și prin tehnica *Real Time-RT-PCR*. Analizele virusologice au evidențiat genomul viral la 100% (n=3) probe prelevate în anul 2014 de la bovine (fig.5.11).

În anul 2015, deși au existat bovine (n=8) cu suspiciuni de boală și seropozitive, rezultatul examenului virusologic a fost negativ.

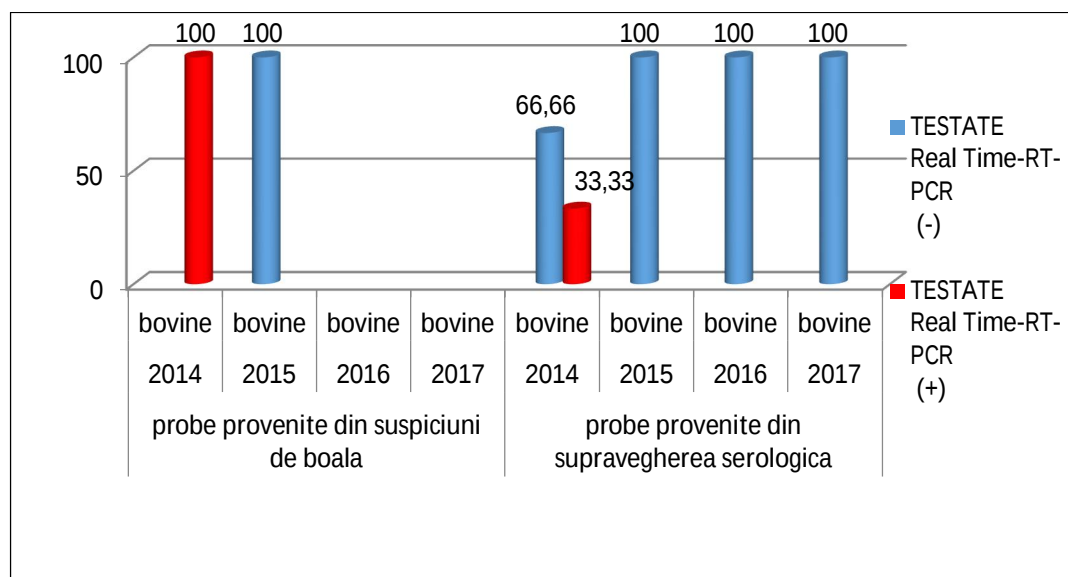


Fig.5.11. Incidența virusului *Bluetongue* identificat prin *Real Time-RT-PCR*, în județul Brăila, 2014-2017

Fig.5.11. The incidence of *Bluetongue* virus identified by *Real-time RT-PCR*, in Brăila, 2014-2017

Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele din județul Brăila corelată cu rezultatele supravegheerii entomologice din arealul acestui județ a dus la declararea a 4 focare de *Bluetongue* semnalate în localitățile: Ulmu, Râmnicelu, Movila Mireseiși Esna.

În **județul Tulcea**, examenul virusologic s-a efectuat prin aceeași tehnică *Real-Time- RT-PCR* . Investigațiile au fost efectuate pe 4 probe de sânge prelevate în anul 2014 de la 2 bovine și de la 2 ovine cu seroconversie (fig.5.12.).

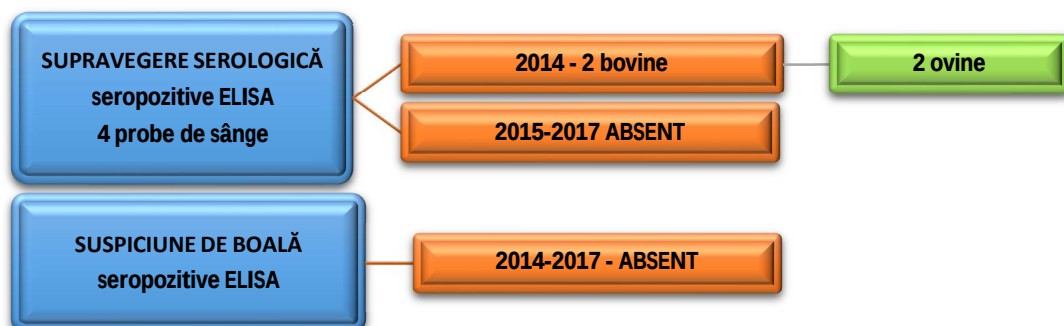


Fig.5.12. Distribuția numerică a probelor prelevate de la animalele seropozitive pentru BTV și testate prin *Real-Time RT-PCR*, în județul Tulcea, perioada 2014-2017

Fig.5.12. Numerical distribution of samples collected from BTV seropositive animals and tested by *Real-Time RT-PCR*, in Tulcea, 2014-2017

În urma testării, la 50% (n=1) bovine și 50% (n=1) ovine, a fost identificat genomul viral *Bluetongue* (tabelul 5.5., fig.5.13).

Tabelul 5.5./Table 5.5.

Rezultatele examenului virusologic efectuat prin *Real Time-RT-PCR*, județul Tulcea, 2014-2017

Results of the virological examination carried out by *Real-time RT-PCR*, in Tulcea, 2014-2017

TULCEA	Specii	SS	TESTATE Real Time-RT-PCR				SB	TESTATE Real Time-RT-PCR			
		(+)	(+)								

Abrevieri : SS- *Supraveghere serologică*

SB- *Suspiciune de boală*

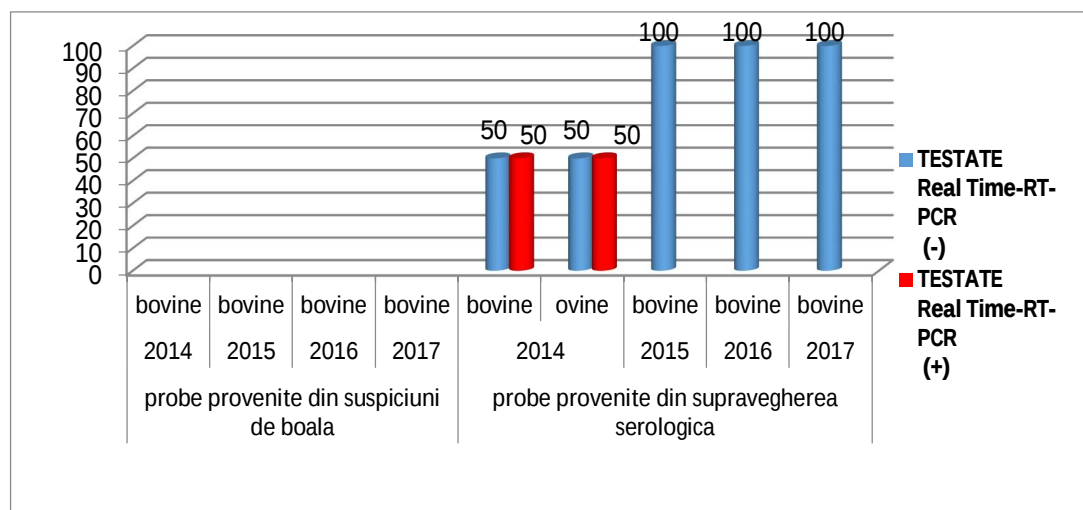


Fig.5.13. Incidența virusului *Bluetongue* identificat prin *Real Time-RT-PCR*, în județul Tulcea, 2014-2017

Fig.5.13. The incidence of *Bluetongue* virus identified by *Real-time RT-PCR*, in Tulcea, 2014-2017

Rezultatele examenului virusologic corelate cu prezența vectorilor culicoizi în același areal geografic a dus la declararea a două focare de *Bluetongue* în anul 2014, în localitățile Jijilași Turcoaia.

Infecția cu virusul limbii albastre nu este persistentă. Datorită caracterelor de patogenitate, infecția cu virusul *Bluetongue* poate să nu fie diagnosticată o anumită perioadă de timp, perioadă în care totuși boala există și evoluează, animalele infectate constituind surse de infecție pentru insectele culicoide.

Durata viremiei este parțial asociată cu durata de viață a eritrocitelor și, prin urmare, viremia este mai lungă la bovine decât la ovine. În condiții experimentale, viremia durează 14 până la 45 de zile la ovine și până la 31 zile la caprine (<https://www.oie.int>). Acesta poate fi unul din motivele pentru care genomul viral a fost pus în evidență mai ales la bovine, în toate județele luate în studiu (Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea) și mult mai rar la ovine, doar în județele Vrancea și Tulcea.

În epidemiologia *Bluetongue*, bovinele au un rol deosebit de important, datorat viremiei prelungită în absența semnelor clinice ale bolii. Cu toate acestea, nu există o explicație pentru rata foarte ridicată de morbiditate la bovinele din România.

5.3. Concluzii

Examenul virusologic prin tehnica *Real Time-RT PCR*, efectuat în perioada 2014-2017, pe probe de sânge provenite de la rumegătoarele domestice seropozitive, aflate în exploatațile profesionale și non-profesionale din județele Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea, a dus la desprinderea următoarelor concluzii :

1. În **județul Vrancea**, în perioada 2014-2017, examenul virusologic a fost efectuat pe 429 probe de sânge prelevate de la animalele cu seroconversie, aflate în exploatațile santinelă și 370 de animale cu suspiciuni de boală.

a. Diagnosticul virusologic a confirmat prezența genomului viral la 47,83% (n=77) din probele de sânge bovin (n=161) și 50% (n=102) din probe de sânge ovin (n=204), prelevate de la animalele seropozitive cu suspiciune de boală, identificate în anul 2014.

b. În perioada 2015-2017, nu a fost identificat genomul viral *Bluetongue* la animale seropozitive din județul Vrancea

c. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele și ovinele din județul Vrancea, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 179 focare de *Bluetongue* semnalate în 43 localități.

2. În **județul Galați**, examenul virusologic s-a efectuat pe 61 probe de sânge recoltate de la animalele santinelă cu seroconversie și 35 de animale cu suspiciuni de boală, la care s-au identificat anticorpi anti-BTV.

a. Diagnosticul virusologic a confirmat prezenta genomului viral la 50% (n=2) din probele de sânge bovin (n=4) prelevate de la animalele seropozitive cu suspiciune de boală, identificate în anul 2014.

b. În perioada 2015-2017, nu a fost identificat genomul viral *Bluetongue* la animale seropozitive din județul Galați.

- c. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele și ovinele din județul Galați, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 2 focare de *Bluetongue*, în anul 2014.
3. În **județul Brăila**, examenul virusologic prin tehnica *Real-Time- RT-PCR* s-a efectuat pe 114 probe de sânge recoltate de la animalele santinelă cu seroconversie și 11 probe de sânge prelevate de la animale cu suspiciuni de boală, la care s-au identificat anticorpi anti-BTV.
 - a. Diagnosticul virusologic a confirmat prezenta genomului viral la 66,66% (n=2) din probe de sânge bovin (n=161) prelevate de la bovinele cu seroconversie și 100% (n=3) din probe de sânge prelevate de la bovinele seropozitive cu suspiciune de boală, identificate în anul 2014.
 - b. În perioada 2015-2017, nu a fost identificat genomul viral *Bluetongue* la animale seropozitive din județul Brăila.
 - c. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele și ovinele din județul Brăila, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 4 focare de *Bluetongue* în anul 2014.
4. În **județul Tulcea**, examenul virusologic s-a efectuat pe 4 probe de sânge prelevate în anul 2014 de la 2 bovine și de la 2 ovine cu seroconversie.
 - a. Diagnosticul virusologic a confirmat prezenta genomului viral la 50% (n=1) dintre bovinele (n=2) și 50% (n=1) dintre ovinele (n=2) cu seroconversie, identificate în anul 2014.
 - b. În perioada 2015-2017, nu a fost identificat genomul viral *Bluetongue* la animale seropozitive din județul Tulcea.
 - c. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la bovinele și ovinele din județul Tulcea, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul acestui județ, a dus la declararea a 2 focare de *Bluetongue*, în anul 2014.

CAPITOLUL VI
INVESTIGAȚII PRIVIND ASPECTELE CLINICE ȘI
ANATOMOPATOLOGICE ÎN BOALA LIMBII ALBASTRE LA
RUMEGĂTOARELE DOMESTICE DIN REGIUNEA DE SUD-EST A
ROMÂNIEI

CAPHTER VI
INVESTIGATIONS ON THE CLINICAL AND
ANATOMOPATHOLOGICAL ASPECTS OF
THE BLUETONGUE DISEASE IN THE DOMESTIC RUMINANTS IN
THE SOUTH-EAST REGION OF ROMANIA

Bluetongue este o boală virală non-zoonotică, necontagioasă care afectează numeroase specii de rumegătoare domestice și sălbatice.

Agentul etiologic este un virus ARN dubu-catenar din genul *Orbivirus* cu 27 de serotipuri care determină manifestări clinice diferite în funcție de specie (Mellor ș.a. 1995). La majoritatea animalelor, infecția cu virus *Bluetongue* (BTV) evoluează inaparent, însă, uneori provocă avort și mortalitate la ovine, cerbi și la alte rumegătoare sălbatice.

Patogeneza acestei boli nu este pedepplin cunoscută dar se cunoaște faptul că agentul etiologic este transmis în mod sigur de femelele insectelor hematofage care se infectează cu virusul *Bluetongue* prin consumul sângelui animalelor infectate. În organismul culicoidelor, virusul se localizează la nivelul glandelor salivare, astfel încât, în timpul hrănirii, femelele culicoide transferă virusul în organismul animalelor gazdă. O dată ajuns în circulația sanguină, apare viremia, și în această etapă, genomul viral poate fi identificat în sânge. Bovinele au o perioadă prelungită de viremie iar majoritatea serotipurilor virale nu produc manifestări clinice, astfel încât, bovinele au un rol deosebit de important în epidemiologia bolii.

Virusul *Bluetongue* are tropism pentru epiteliu, localizându-se în stratul Malpighian și descuamativ al limbii, buzelor, esofagului, rumenului și pielii. Apare un fenomen de degenerare inflamatorie, uneori necrotică iar în urma desprinderii plachetelor tisulare, se formează eroziuni și ulcere. De asemenea, virusul traversează placenta și afectează fetusul acționând asupra procesului de organogeneză și în special asupra formării creierului și asupra celulelor precursor neuronale, determinând hidrocefalie și hipoplazie cerebrală (Perianu, 2012).

La bovine, boala evoluează frecvent fără aspecte clinice evidente, cu excepția serotipului 8 (BTV8) care determină febră, inflamație de tip cataral sau ulcero-necrotic la nivelul mucoasei nazale, bucale și a buretului coronarian (Moga Mânzat, 2005; Perianu, 2012). Acest serotip a fost raportat pentru prima dată în Europa și care, în 2006-2009, a provocat în Franța cel mai mare focar de *Bluetongue* (Courtejoie ș.a. 2019). În efectivele de bovine din acest focar s-a constatat o creștere a numărului de avorturi, iar în Belgia și Olanda, vițeii ca și miei avortați, prezentau hidrocefalie și hipoplazie cerebrală (Desmecht ș.a., 2008; Woundas.a. 2008; Van der Slujs ș.a. 2016) ceea ce a dus la ipoteza conform căreia serotipul BTV8 circulant are capacitatea de a traversa placenta (Courtejoie ș.a. 2019).

Obiectivul principal al acestui studiu, a fost de a identifica atât manifestările clinice, cât și cele lezionale prezente în boala limbii albastre (*Bluetongue*), la rumegătoarele domestice din regiunea de Sud-Est a României.

6. 1. Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, cercetările s-au efectuat la rumegătoarele cu suspiciuni de *Bluetongue* identificate în județele Galați, Vrancea, Brăila și Tulcea.

În această perioadă, au fost examinate 1437 de animale cu suspiciune de *Bluetongue*, după cum urmează (fig.6.1.):

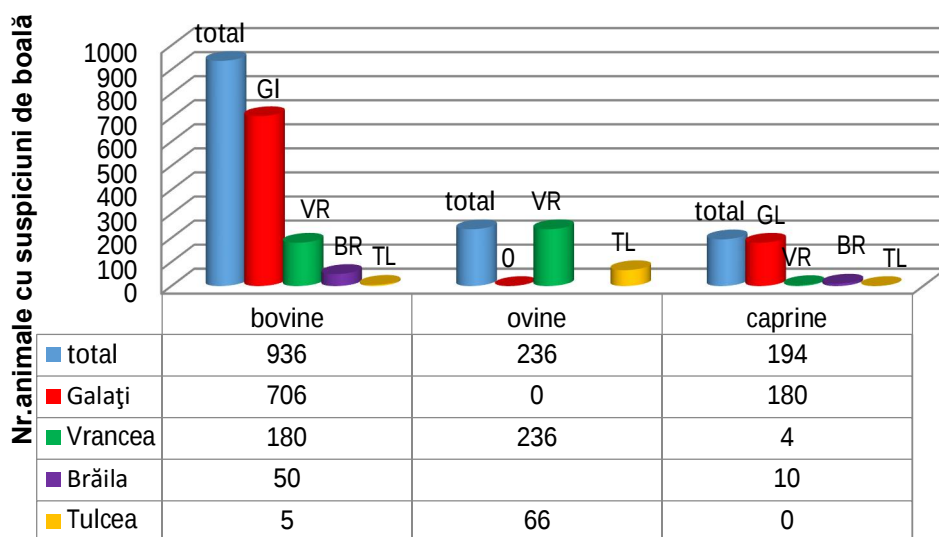


Fig.6.1. Repartiția animalelor cu suspiciune de *Bluetongue*

Fig 6.1. The numerical distribution of ruminant with suspicion of *Bluetongue*

Astfel, în județul Galați, au fost semnalate 886 de animale cu suspiciune de boală, dintre aceste 706 au fost bovine și 180 de caprine.

În județul Vrancea, au fost semnalate 420 de animale cu suspiciuni de boală, dintre acestea 180 au fost bovine, 236 ovine și 4 caprine.

În județul Brăila, au existat 60 de suspiciuni de boală, observate la 50 bovine și 10 caprine.

În județul Tulcea, au fost semnalate 71 suspiciuni de boală, dintre acestea 5 au fost bovine și 66 ovine.

Pentru fiecare caz semnalat, s-au realizat anchete epidemiologice în care au fost menționate: data și ora semnalării suspiciunii; numele proprietarului; numărul, specia și categoria de animale existente în exploatarea respectivă; numărul de animale moarte sau care au fost propuse pentru sacrificarea de necesitate.

a. **Examenul clinic** a fost efectuat numai la animalele cu suspiciuni de boală, iar semnele clinice și leziunile observate au fost menționate în fișele de observație ale animalelor. Termometria s-a efectuat atât la animalele cu suspiciuni de boală, cât și la celelalte animalele din exploatarea comună.

Declararea focarelor de *Bluetongue* a fost efectuată doar atunci când virusul s-a izolat de la animalele seropozitive și a fost demonstrată circulația virală între gazdele vertebrate și vectori în exploatarea sau unitatea epidemiologică respectivă. Atunci când virusul a fost identificat doar la animale, fără a pune în evidență circulația virală la vectorii din zonă, focarul a fost înfirmat.

b.Examenul necropsic

Examenul necropsic s-a realizat pe carcasele animalelor sacrificate de necesitate.

Tehnica de examinare necropsică a fost cea clasică și a urmărit identificarea leziunilor instalate la nivelul țesuturilor și organelor.

Având în vedere, condițiile de sacrificare în teren, examinarea s-a efectuat pe o suprafață betonată, netedă și protejată cu o folie de plastic, care a permis spălarea și dezinfectarea corespunzătoare, după utilizare. Modificările observate au fost trecute în fișa de examinare.

6.2. Rezultate și discuții

În perioada 2014-2017 au fost examinate 1437 de rumegătoare domestice cu suspiciune de boală.(tabelul 6.1.). Dintre acestea, 418 (29,08%) au prezentat aspecte clinice asemănătoare celor din boala limbii albastre(*Bluetongue*).

Din cele 418 rumegătoare care au prezentat semne clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, 209 (50%) au fost bovine, 206 (49,28%) au fost ovine și 3 (6,25%) au fost caprine (fig.6.2.)

Astfel, în anul 2014, după apariția în luna august a primelor focare de *Bluetongue* din Buzău, în toată regiunea de Sud Est a României au fost semnalate animale cu semne clinice suspecte pentru infecția cu virusul *Bluetongue*.

Distribuția numerică a animalelor cu semne clinice suspionate de infecție cu BTV
Numerical distribution of animals with clinical aspects suspected of BTV infection

Perioada	Specificare	Galati			Vrancea			Braila			Tulcea		
		NR.TOTAL ANIMALE CU SUSPICIUNI DE BLUETONGUE =1437											
		N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)	N=	(+)	(-)
2014	Bovine	5	4	1	179	161	18	5	3	2	5	1	4
	Ovine	0	0	0	235	204	31	0	0	0	66	1	65
	Caprine	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	0
2015	Bovine	65	31	34	1	1	0	45	8	37	0	0	0
	Ovine	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	4	3	1	0	0	0	0	0	0
2016	Bovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2017	Bovine	636	0	636	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ovine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Caprine	180	0	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL		886	35	851	420	370	50	60	11	49	71	2	69

Abrevieri: BTV- virusul Bluetongue, N- număr animale cu suspiciuni de boală, (+)- animale cu semne clinice specifice infecției cu virusul Bluetongue

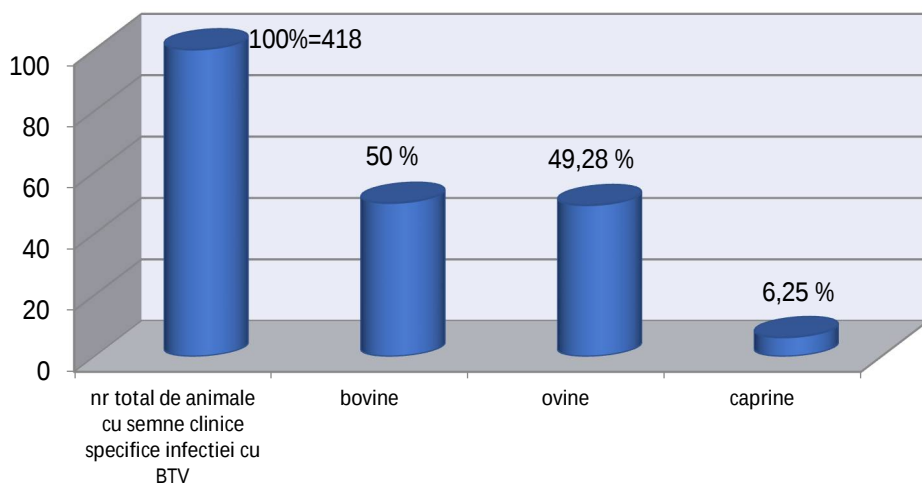
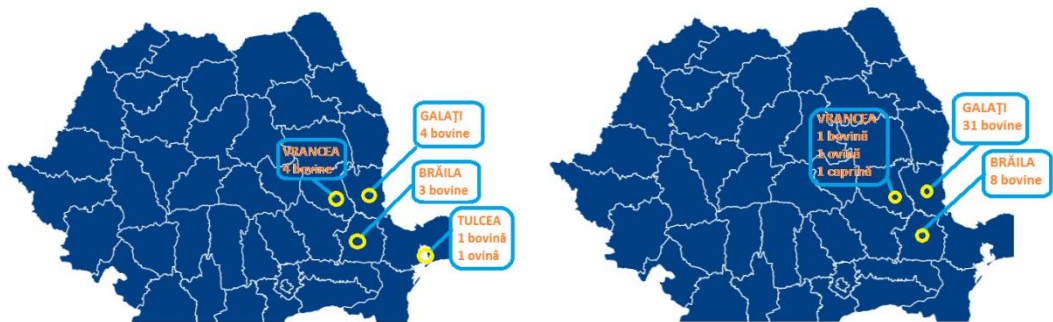


Fig.6.2.Incidența animalelor care au prezentat semne clinice specifice infecției cu BTV, în perioada 2014-2017

Fig.6.2 Incidence of animals with clinical signs specific to BTV infection, 2014-2017

Prin urmare, în anul 2014, au fost suspectate de infecție cu *Bluetongue* 4 bovine în județul Galați, 161 bovine și 204 ovine în județul Vrancea, 3 bovine în județul Brăila, o bovină și o ovină în județul Tulcea (fig.6.3.a.)

În acest an, în județul Tulcea nu au fost identificate animale cu suspiciuni de *Bluetongue* (fig.6.3.b.).

Fig. 6.3. Distribuția cazurilor cu aspecte clinice de *Bluetongue*: a. 2014; b. 2015Fig. 6.3. Distribution of clinical cases with *Bluetongue*: a. 2014; b. 2015

A.1. Evoluția clinică la bovine

În perioada studiului efectuat, cele 209 bovine suspiciate cu boala limbii albastre, au manifestat în majoritatea cazurilor simptomele specifice infecției cu virusul *Bluetongue*. În urma examinării clinice s-a observat prezența simultană a mai multor semne clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*. (tabelul 6.2., fig. 6.4.).

Tabel 6.2./Table 6.2.

Incidența semnelor clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, la bovine

The incidence of clinical signs specific to *Bluetongue* virus infection in cattle

SEMNE CLINICE SPECIFICE INFECȚIEI CU VIRUSUL BLUETONGUE	BOVINE		
	TOTAL	Nr	%
Hiperemia mucoasei conjunctivale	209	209	100
Epiforă		206	98,56
Sialoree		206	98,56
Edem nazal		200	95,70
Jetaj mucopurulent		186	88,99
Ulceratii ale mucoasei nazale		189	90,43
Edemul buzelor		150	71,77
Ulceratii gingivale		204	97,60
Tumefierea și cianoza limbii		200	95,70
Ulceratii și necroze la nivelul ugerului		168	80,38
Congestia zonei coronare		153	73,20
Exongulări		92	44,01
Diaree		101	48,32
Slăbire accentuată		159	76,07
Imobilitate		96	45,93
Fenomene nervoase		121	57,90
Avorturi		11	5,26
Ulcere în regiunea trenului posterior		29	13,88

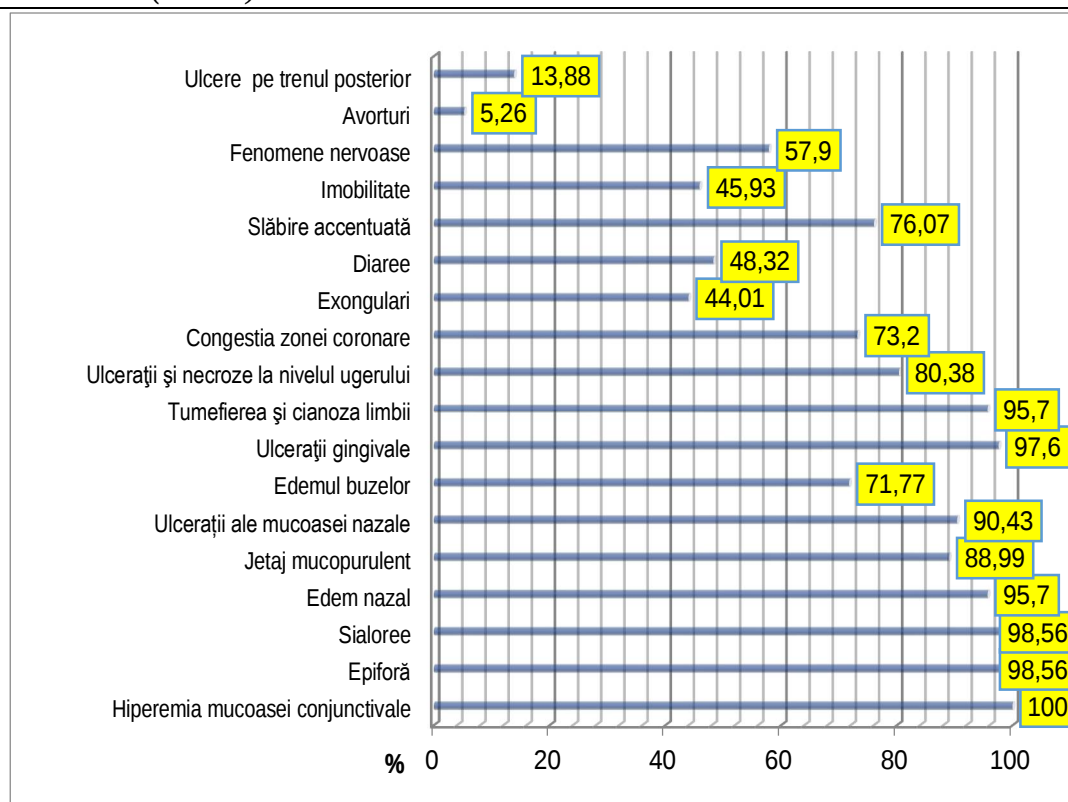


Fig. 6.4.Reprezentarea grafică a incidenței semnelor clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, la bovine

Fig.6.4. Graphical representation of the incidence of clinical signs specific to *Bluetongue* virus infection in cattle

Astfel, la bovine, incidența semnelor clinice a fost după cum urmează:100% cu hiperemia mucoasei conjunctivale, 98,56% cu epiforă(fig.6.5, fig.6.5.), 98,56% cu sialoree și 95,7% cu edem nazal (fig.6.7), 90,43% cu ulceratii ale mucoasei nazale (fig.6.8) și 97,6% cu ulceratii gingivale (fig.6.9), 95,7% cu tumefierea și cianoza limbii (fig.6.10.), 80,38% cu necroze circumscrie (fig.6.11) și ulceratii la nivelul ugerului (fig.6.12) și formarea unor cruste (fig.6.13).

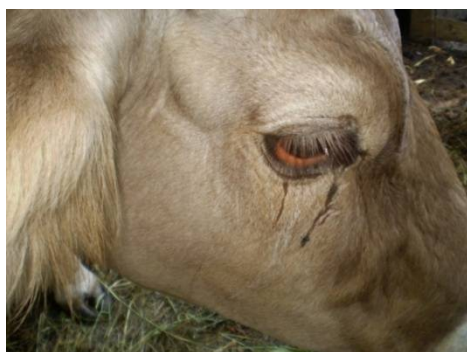


Fig.6.5. Hiperemia mucoasei conjunctivale și epiforă

Fig.6.5.Hyperemia of the conjunctival mucosa, and epiphora



Fig.6.6. Hiperemia conjunctivală
Fig.6.6.Hyperemia of the conjunctival mucosa



Fig.6.7. Sialoree și edem nazal la bovine
Fig.6.7. Sialoree and nasal edema in cattle



Fig. 6.8. Edem și ulcerații nazale
Fig. 6.8. Edema and nasal ulcers



Fig.6.9. Ulcerații gingivale la bovine
Fig.6.9. Gingival ulcers in cattle



Fig. 6.10. Tumefierea și cianoza limbii
Fig. 6.10. Swollen and cyanosis of the tongue



Fig. 6.11. Necroze localizate la nivelul ugerului
Fig.6.11. Necrosis located on the udder



Fig. 6.12. Necroze și ulcerații localizate la nivelul ugerului
Fig.6.12. Necrosis and ulcerations located on the udder



Fig. 6.13. Necroze și cruste localizate la nivelul ugerului

Fig.6.13.Necrosis and scabs located on the udder

Datorită durerilor musculare și afectării zonei coronare, animalele evitau mișcarea și staționeau pe patul preferând decubitul (fig.6.14).În urma examinării clinice, 45,93% dintre bovine, evitau deplasarea, iar 57,9% prezentau semne nervoase (torticolis).



Fig.6.14. Imposibilitatea deplasării datorită afectării zonei coronare

Fig.6.14. Inability of the movement due to damage to the coronary area

De asemenea, (48,32%) dintre bovinele cu semne clinice *Bluetongue* au prezentat diaree, uneori sanguinolentă. Datorită poziției decubitale prelungite, regiunea posterioară prezenta inflamații cu leziuni de necroză și ulcere hemoragice (fig.6.15, fig.6.16).



Fig. 6.15. Diaree și ulcere decubitale
Fig. 6.15. Diarrhea and decubital ulcers

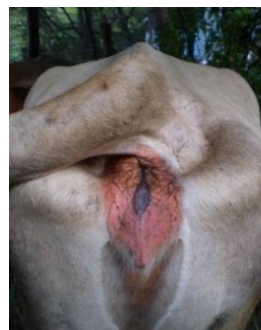


Fig.6.16. Inflamații vulvare
Fig.6.16. Vulvar inflammation

În *Bluetongue*, hiperemia cutanată se poate extinde pe întreg corpul, inclusiv în zonele axilare și inghinale, dar această simptomatologie nu a fost identificată la bovinele din studiul nostru.

A2. Aspecte lezionale la bovine

În perioada luată în studiu, din cele 209 bovine cu semne clinice de *Bluetongue*, 8 bovine au fost sacrificate de necesitate (tabelul 6.3., fig.6.17).

Tabel 6.3./Table 6.3.

Incidența leziunilor anatomopatologice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, la bovine
The incidence of anatomopathological lesions specific to infection with *Bluetongue* virus in cattle

ASPECTE LEZIONALE	BOVINE	
	TOTAL	Nr %
Peteșii în țesutul conjunctiv	8	8 100
Congestie și hemoragii la nivelul mușchiului pilier anterior al rumenului		6 75
Fascii infiltrate cu exudate gelationase și hemoragii		8 100
Hipertrofie splenică		8 100
Hemoragii splenice		7 87,5
Hemoragii la baza arterei pulmonare		8 100
Hemoragii în ganglionii limfatici		7 87,5
Congestie și edem la nivelul faringelui		7 87,5
Congestie și edem la nivelul laringelui		7 87,5
Edem pulmonar		6 75

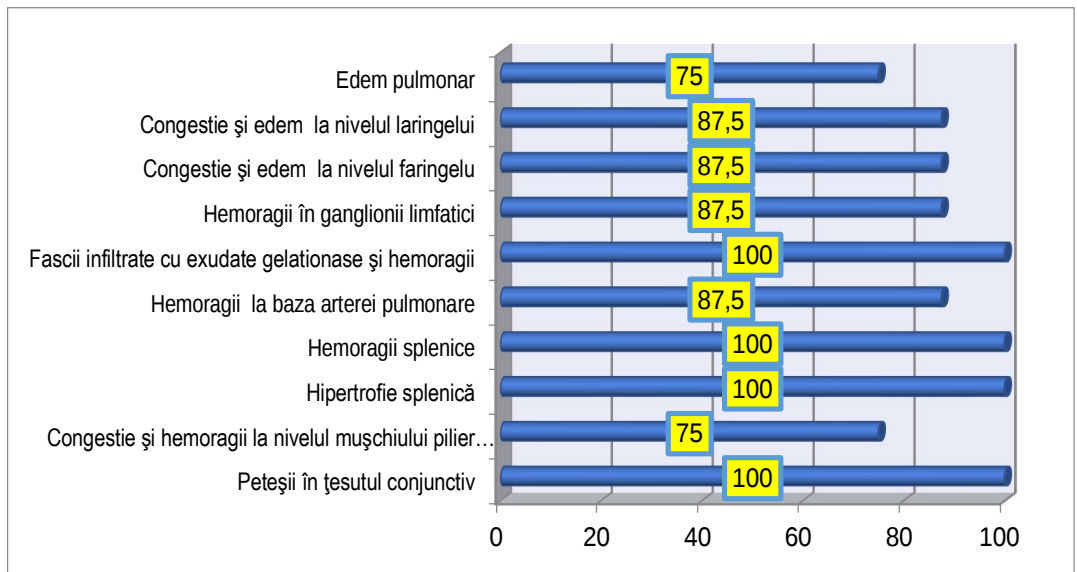


Fig. 6.17.Reprezentarea grafică a incidenței semnelor clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, la bovine

Fig.6.17. Graphical representation of the incidence of clinical signs specific to *Bluetongue* virus infection, in the cattle

În urma necropsiei, s-a constatat faptul că leziunile au fost diferite în funcție de evoluția clinică, iar incidența acestora a fost, după cum urmează: 100 % (n=8) cu peteșii extinse la nivelul țesutului conjunctiv subcutanat (fig.6.18), 75% (n=6) congestii și hemoragii la nivelul pilierului anterior al rumenului, 100% (n=8) hipertrofie splenică, 87,5% (n=7) cu hemoragii multifocale splenice (fig.6.19), și 100% (n=8) hemoragii la baza arterei pulmonare (leziune aproape patognomonică).



Fig.6.18. Hemoragii în țesutul subcutanat

Fig.6.18. Hemorrhage in subcutaneous tissue



Fig.6.19. Hipertrofie splenică cu hemoragii multifocale

Fig.6.19. Splenic hypertrophy with multifocal hemorrhages

La examenul aparatului respirator, s-a constatat leziuni similare cu cele identificate la nivelul rumenului, fiind observate la 87,5% (n=7) congestia, edemul și cianoza laringelui și faringelui. La 75% (n=6) dintre bovinele sacrificate, pulmonii prezentau edem alveolar și spumozități traheo-bronșice.

B. Evoluția clinică la ovine

Aspectele clinice la ovine au fost asemănătoare cu cele de la bovine (tabelul 6.4., fig.6.20).

Tabel 6.4./Table 6.4.

Incidența semnelor clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, la ovine
The incidence of clinical signs specific to *Bluetongue* virus infection in sheep

SEMNE CLINICE SPECIFICE INFECȚIEI CU VIRUSUL BLUETONGUE	OVINE		
	TOTAL	Nr	%
Stare de prostație	206	195	94,66
Hiperemia mucoasei conjunctivale		195	94,66
Epiforă		110	53,40
Sialoree		205	99,50
Edem nazal		206	100
Jetaj mucopurulent		206	100
Ulceratii ale mucoasei nazale		206	100
Edemul buzelor		205	99,50
Ulceratii gingivale		206	100
Tumefierea și cianoza limbii		205	99,50
Cianoza mucoasei bucale		200	97,10
Ulceratii și necroze la nivelul ugerului		200	97,10
Congestia zonei coronare și șchiopături		179	86,9
Exongulari		0	0
Slăbire accentuată		132	64,10
Imobilitate		199	96,60

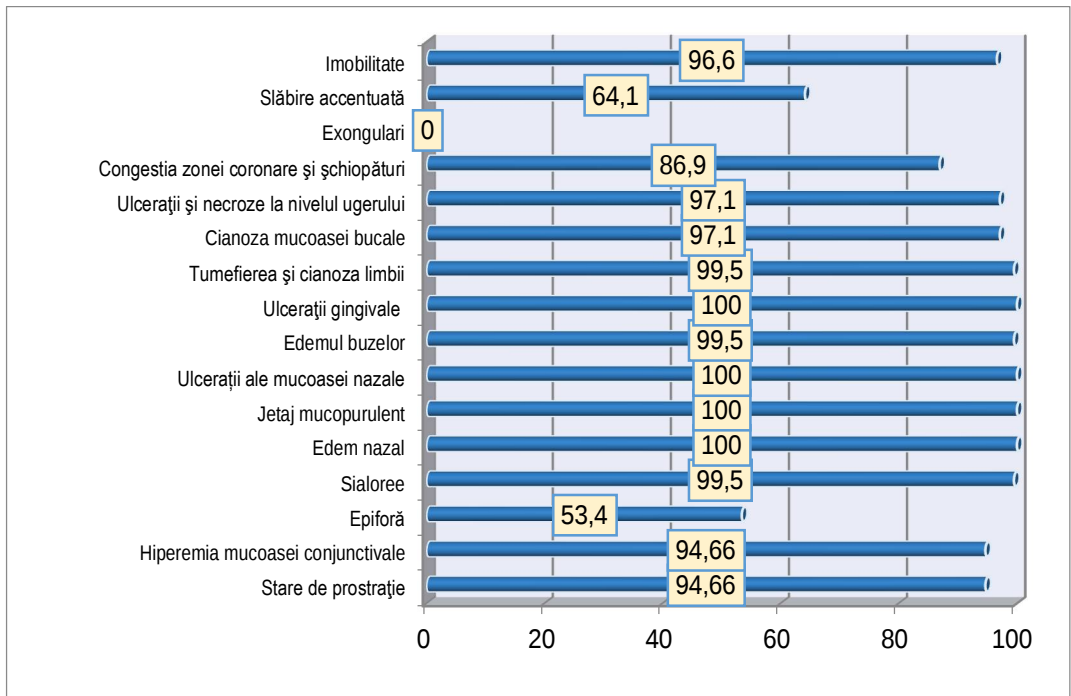


Fig. 6.20.Reprezentarea grafică a incidenței semnelor clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, la ovine

Fig.6.20. Graphical representation of the incidence of clinical signs specific to *Bluetongue* virus infection in sheep

În perioada luată în studiu, din cele 206 ovine cu semne clinice produse de infecția cu virusul *Bluetongue*, 94,66 % (n=195) au manifestat stare de prostrație (fig.6.20), 100% (n=206) cu secreții nazale muco-purulente (fig.6.21), 100 (n=206) edeme și ulcerații nazale (fig. 6.22), 97,10% (n=200) cu cianoza mucoasei bucale și 100% (n=206) cu ulcerații ale buzelor (fig.6.23, fig.6.24), 100% (n=206) cu ulcerații și necroze circumscrie la nivelul mucoasei bucale, 99,5% (n=205) cu sialoree filantă (fig.6.25), 53,4% cu epiforă, 99,5% (n=205) cu tumefierea și cianoza limbii, (fig. 6.26), 96,6% (n=199) au fost în incapacitatea de a se deplasa și 64,10% (n=132) prezentau slăbire accentuată.



Fig. 6.21. Stare de prostrație și torticollis la ovine cu *Bluetongue*
Fig.6.21.Deviation and torticollis in sheep with *Bluetongue*

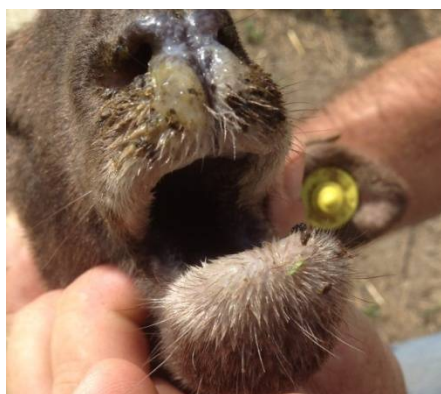


Fig.6.22. Jetaj mucopurulent
Fig.6.22. Mucopurulent secretions



Fig.6.23. Edem și ulceratii nazale
Fig.6.23. Edema and nasal ulcers

Datorită congestiilor și edemelor localizate la nivelul buzelor și limbii, animalele prezentau cavitatea bucală întredeschisă, din care se prelingea salivă abundentă și cu spumozități. Pe fondul inflamator al mucoasei bucale, s-au observat ulcere cu diametrul de 2-4 mm, ușor sângerânde motiv pentru care, uneori, saliva avea caracter sanguinolent și cu miros fetid. Limba și țesutul conjunctiv din regiunea capului și, în special, de la nivelul buzelor, prezentau tumefacții, leziuni care anulau capacitatea de a se hrăni corespunzător.



Fig.6.24. Cianoza mucoasei bucale și ulceratii ale buzelor
Fig.6.24. Oral mucosal cyanosis and lip ulceration

Ovinele examinate, au fost surprinse executând mișcări ritmice ale limbii, iar după 24-48 de ore, limba devenea puternic tumefiată, de culoare violacee, leziune care a stat la baza denumirii de **boala limbii albastre (Bluetongue)** (fig.6.26.).



Fig. 6.25. Sialoree la ovine
Fig.6.25. Excess salivation in sheep



Fig. 6.26. Tumefierea și cianoza limbii (limba albastră)
Fig. 6.26. Swelling and cyanosis of the tongue (blue tongue)

Datorită localizărilor musculare, animalele aveau membrele rigide, refuzând să se deplaseze sau încercau să se deplaseze în genunchi. La nivelul benzii coronare au fost observate edeme locale, dar care nu s-au finalizat cu exongulare.

Nu au fost cazuri de avorturi la ovinele gestante, dar literatura de specialitate menționează că, atunci când ovinele gestante se infectează cu virusul *Bluetongue*, feteșii pot fi subdezvoltați, ataxici, orbi sau cu alte malformații. În această formă clinică, rata mortalității poate varia între 20-60% (Perianu ș.a., 2012).

C.Evoluția clinică la caprine

Simptomatologia infecției cu virusul *Bluetongue* a fost mult mai atenuată decât la ovine, fiind observată doar 3 la caprine, din județul Vrancea.

În general, boala a evoluat inaparent sau cu simptomatologie nespecifică, motiv pentru care nu a fost pus în evidență un tablou clinic reprezentativ pentru infecțiile cu virusul *Bluetongue*.

Semnele clinice observate la caprine au fost: 100% (n=3) cu stare de prostrație, 100% (n=3) cu jetaj muco-purulent, 100 (n=3) cu edeme și ulcerații nazale, 66,6% (n=3) cu cianoza mucoasei bucale și 100% (n=3) cu șchiopături (tabelul 6.5., fig.6.26)

Tabel 6.5./Table 6.5.

Incidența semnelor clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, la caprine
The incidence of anatomopathological lesions specific to infection with *Bluetongue* virus in the goats

SEMNE CLINICE SPECIFICE INFECȚIEI CU VIRUSUL <i>BLUETONGUE</i>	CAPRINE	
	TOTAL	Nr %
Stare de prostrație	3	3 100
Jetaj mucopurulent		3 100
Edeme nazale		3 100
Ulcerații nazale		2 66,6
Cianoza mucoasei bucale		2 66,6
Șchiopături		3 100

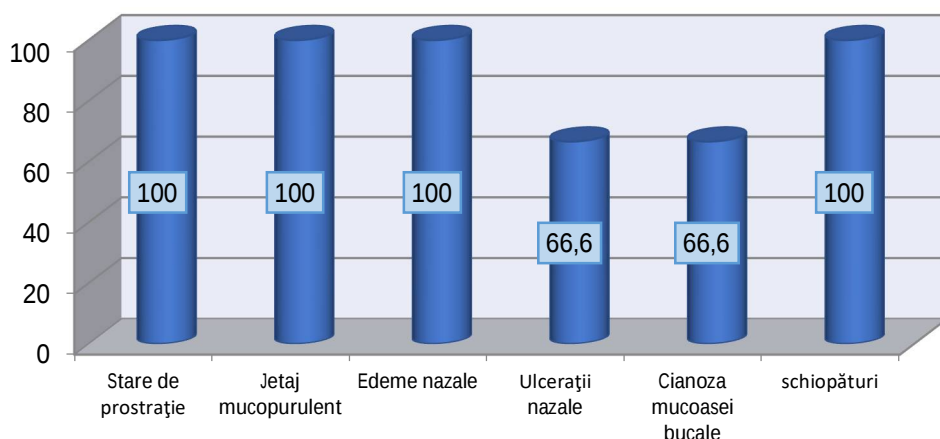


Fig. 6.26.Reprezentarea grafică a incidenței semnelor clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, la caprine

Fig.6.26. Graphical representation of the incidence of clinical signs specific to *Bluetongue* virus infection in the goats

Rezultatele obținute la supravegherea serologică corelate cu aspectele clinice și lezionale care au fost observate la speciile de rumegătoare din județele Vrancea, Brăila, Galați și Tulcea, demonstrează fără echivoc prezența virusului *Bluetongue*, circulant în această regiune și a scos în evidență capacitatea de propagare continuă în arealul studiat.

Toate manifestările clinice descrise anterior, au evoluat doar în anul 2014. De atunci și până în 2018 nu au mai fost confirmate animale bolnave în județele luate în studiu dar au apărut cazuri noi în regiunea de Nord-Est a României (Vaslui, Suceava, Iași) (Rîmbu ș.a., 2018).

De remarcat că, din 2014 nu au mai fost semnalate animale cu manifestări clinice suspecte de *Bluetongue*, fapt datorat cel mai probabil, măsurilor profilactice specifice.

Conform Organizației mondiale pentru sănătate animală (OIE,2018), din 2015 până în 2018, în regiunea de Sud Est a României nu au evoluat focare noi de boală *Bluetongue*, acest fapt datorându-se cel mai probabil, măsurilor profilactice specifice, derulate sub supravegherea Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor (ANSVSA).

6.3. Concluzii

În regiunea de Sud-Est a României, în perioada 2014-2017, au fost identificate animale cu semne clinice și leziuni anatomopatologice specifice infecției cu virusul *Bluetongue* ceea ce a permis desprinderea următoarelor concluzii:

1. Au fost examinate clinic 1437 de rumegătoare domestice, dintre acestea 418 (29,08%) au prezentat aspecte clinice asemănătoare celor din boala limbii albastre(*Bluetongue*).

2. Din cele 418 rumegătoare care au prezentat semne clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*, 209 (50%) au fost bovine, 206 (49,28%) au fost ovine și 3 (6,25%) au fost caprine, din care:
 - a. în anul 2014, au fost suspectate de infecție cu virusul *Bluetongue* 4 bovine în județul Galați, 161 bovine și 204 ovine în județul Vrancea, 3 bovine în județul Brăila, o bovină și o ovină în județul Tulcea.
 - b. în anul 2015, au fost suspectate de infecție cu virusul *Bluetongue* 31 de bovine din județul Galați, la o bovină, la o ovină și la 3 caprine din județul Vrancea și la 8 bovine din județul Brăila.
 - c. În perioada 2016-2017, nu au fost identificate animale cu semne clinice specifice infecției cu virusul *Bluetongue*.
3. **La bovine**, incidența semnelor clinice a fost după cum urmează: 100% (n=209) cu hiperemia mucoasei conjunctivale, 98,56% (n=206) cu epiforă, 98,56% (n=206) cu sialoree, 97,6% (n=204) ulcerații gingivale, 95,7% (n=200) cu tumefierea și cianoza limbii, 95,7% (n=200) cu edem nazal, 90,43% (n=189) cu ulcerații ale mucoasei nazale, 88,90% (n=186) cu jetaj muco-purulent, 80,38% (n=168) necroze circumscrise, ulcerații la nivelul ugerului, 76,07% cu slăbire accentuată; 73,2% (n=153) congestia zonei coronare, 57,9% (n=121) cu fenomene nervoase (torticolis), 48,32% (n=101) cu diaree, 45,93% (n=96) cu imobilitate, 44,01% (n=92) cu exongulări, 13,88% (n=29) cu ulcere pe trenul posterior și 5,26% (n=11) cu avorturi.
4. Incidența leziunilor anatomopatologice la bovine, a fost după cum urmează: 100 % (n=8) cu peteșii extinse la nivelul țesutului conjunctiv subcutanat, 75% (n=6) congestii și hemoragii la nivelul pilierului anterior al rumenului, 100% (n=8) cu hipertrofie splenică, 87,5% (n=7) cu hemoragii multifocale splenice și 100% hemoragii la baza arterei pulmonare, 87,5% (n=7) congestia, edemul și cianoza laringelui și faringelui, 75% (n=6) prezentau edem pulmonar și spumozități traheo-bronșice.
5. **La ovine**, incidența semnelor clinice a fost după cum urmează: 94,66 % (n=195) au manifestat stare de prostrație, 100% (n=206) cu secreții nazale muco-purulente, 100% (n=206) cu edeme și ulcerații nazale, 97,10% (n=200) cu cianoza mucoasei bucale, 100% (n=206) cu ulcerații ale buzelor, 100% (n=206) cu ulcerații și necroze circumscrise la nivelul mucoasei bucale, 99,5% (n=205) cu sialoree filantă, 53,4% (n=110) cu epiforă, 99,5% (n=205) tumefierea și cianoza limbii, 96,6% (n=199) au fost în incapacitatea de a se deplasa și 64,10% (n=132) prezentau slăbire accentuată.
6. **La caprine**, incidența semnelor clinice a fost după cum urmează: 100% (n=3) cu stare de prostrație, 100% (n=3) cu jetaj muco-purulent, 100% (n=3) cu edeme și ulcerații nazale, 66,6% (n=3) cu cianoza mucoasei bucale și 100% (n=3) cu șchiopături.

CAPITOLUL VII
INVESTIGAȚII PRIVIND SUPRAVEGHEREA ENTOMOLOGICĂ
A VECTORILOR TRANSMIȚĂTORI AI VIRUSULUI
BLUETONGUE

CHAPTER VII
INVESTIGATIONS REGARDING THE ENTOMOLOGICAL
SURVEILLANCE OF THE BLUETONGUE VIRUS
TRANSMITTING VECTORS

Distribuția geografică a arbovirusurilor a primit o atenție considerabilă după mai multe episoade de manifestare în întreaga lume. În ultimii 20 de ani, epidemiologia arbovirusurilor transmise de *Culicoides* au suferit modificări la nivel global, influențată, cel mai probabil, de schimbările climatice, globalizarea comerțului și sistemele intensive aplicate în zootehnie (Purse ș.a. 2015). Deoarece aceste arbovirusuri sunt entități multi-gazdă, multi-vectoriale, predicțiile pentru îmbunătățirea direcționării măsurilor de combatere a bolilor, necesită evaluări permanente care să cuantifice rolul și impactul factorilor abiotici și biotici multipli în modelarea bolii (Chanda ș.a., 2019). Conform Organizației Mondiale a Sănătății Animalelor (OIE), virusul *Bluetongue* (BTV) este clasificat ca agent etiologic al bolilor din categoria „A”, care se transmite la rumegătoare prin înțepăturile insectelor din genul *Culicoides*. Fără vectori, boala nu se poate răspândi de la un animal la altul (OIE, 2019).

Insectele *Culicoides* sunt vectori hematofagi implicați în transmiterea de virusuri (peste 50 de arbovirusuri printre care și virusul febrei catarale ovine-BTV, virusul bolii hemoragice epizootice-EHDV, etc), protozoare (hemosporidioza la păsări, etc), paraziți (filarioza, etc), (Borkent, 2004; Carpenter ș.a., 2013; Svobodova ș.a., 2017; Collins ș.a., 2018; Vasić ș.a., 2019).

Există mai mult de 1000 de specii *Culicoides*, dar mai puțin de 20 sunt considerate vectori specifici ai virusului *Bluetongue*. Distribuția geografică a speciilor vectoriale limitează, în general, răspândirea bolii (Mullen, 2002).

Răspândirea geografică a BTV a fost mult timp limitată la un teritoriu cuprins între 40°N și 35°S (Purse ș.a., 2005). Cu toate acestea, mai multe tulpini BTV au început să se răspândească în întreaga lume (Purse ș.a., 2005; Ruder ș.a., 2015; McVey ș.a., 2015), inclusiv în mai multe părți din nordul Europei, în 1998 (Wilson ș.a., 2009, Carpenter ș.a., 2009; Balenghien ș.a., 2014).

Evoluția bolii și sensibilitatea unor noi specii vectoriale față de BTV, a creat o situație îngrijorătoare care a presupus o extindere mult mai largă a BTV (Wilson ș.a., 2009, Sreenivasulu ș.a., 2004; Brugger ș.a., 2013; Legisaș.a., 2014; Vasić ș.a., 2019).

Virusul *Bluetongue* poate să reziste și să circule pe termen lung în rândul populațiilor de animale receptive dacă sunt îndeplinite condițiile de climă, gazdă și vectori (Samy, 2016,).

În România, anterior anului 2014, au existat toate condițiile predictibile apariției *Bluetongue*, cu toate acestea boala nu a fost semnalată (fig.7.1.), (OIE, 2017).

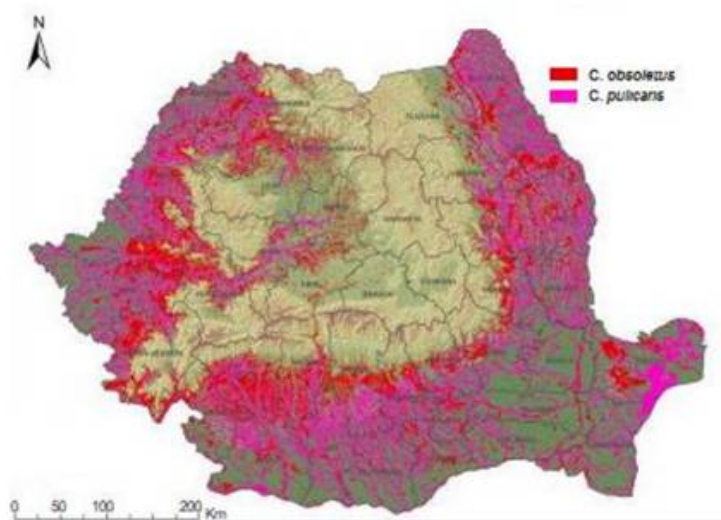


Fig.7.1. Harta distribuției arealului climatic specific pentru supraviețuirea vectorilor culicoizi în România, anterior anului 2014 (OIE, 2017).

Fig.7.1. Map of the distribution of the specific climatic area for the survival of culicoid vectors in Romania, prior to 2014 (OIE, 2017).

În anul 2014, în România și în imediata vecinătate a României (Albania, Bulgaria, Grecia, Macedonia, Serbia, Ungaria și Turcia) au fost declarate, conform datelor OMSA, 3.689 focare *Bluetongue*. Acest aspect a fost foarte important pentru zona de focalitate naturală a bolii, având consecințe asupra exportului și a comerțului intracomunitar (Analiza de risc *Bluetongue*, 2014).

Rolul insectelor hematofage în transmiterea BTV cât și procentul prevalenței sunt generate de diverși factori de mediu cum ar fi umiditatea ridicată, aglomerațiile de animale, temperaturile ridicate, aspecte care imprimă bolii un caracter sezonier. În regiunile temperate, unde există mari fluctuații climatice, transmiterea virusului BT poate avea loc pe tot parcursul anului, în special în perioadele ploioase dar mai ales la temperaturile optime de 28°C-29°C (Brand, 2017).

Bovinele infectate joacă un rol important în menținerea virusului într-o regiune. Ele poate servi drept sursă de virus timp de câteva săptămâni, fără a exista semne clinice de boală și sunt adesea gazda preferată a vectorilor culicoizi (OIE, 2019). Această

caracteristică explică importanța epidemiologică a supravegherii vectorilor care pot transmite boala și care se sustrag oarecum, controlului sanitar veterinar oficial.

Supravegherea entomologică efectuată în județele Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea, a avut următoarele obiective:

- Stabilirea prezenței și evaluarea incidenței insectelor *Culicoides* în arealul studiat.
- Identificarea speciilor de culicoide vectoriale prezente în arealul studiat.
- Determinarea perioadei de activitate a insectelor culicoide vectoriale în arealul studiat.

7.1. Supravegherea entomologică în județul Vrancea

Formele de relief, clima și regimul termic al județului Vrancea oferă condiții prielnice pentru extinderea, adaptarea și supraviețuirea insectelor vectoriale *Culicoides*. Relieful este divers și variază de la zonă de munte, deal, la zone de câmpie înaltă și joasă, străbătute de râuri care creează depresiuni cu exces de umiditate. Poziția sa la o altitudine nordică de 46°C determină o temperatură continentală de tranziție. Datorită dispunerii reliefului în trepte, regimul climateric este influențat de climatul est-continental dar și de cel nordic și sudic ceea ce oferă vulnerabilitate zonei în fața noilor schimbări climatice. Regimul de temperatură este influențat de relief. În județul Vrancea, temperaturile cele mai ridicate sunt în luna iulie, media fiind de 22°C, dar valorile extremelor termice înregistrează diferențe tot mai mari. Zona permite creșterea tuturor speciilor de animale receptive la virusul *Bluetongue*. Toate aceste caracteristici au constituit cadrul ambiental potrivit apariției bolii *Bluetongue* în 2014.

7.1.1 Materiale și metode de lucru

Supravegherea entomologică într-un anumit areal geografic, este o componentă esențială în monitorizarea virusului *Bluetongue*.

Protocolul de monitorizare a fost inițiat prin divizarea regiunilor în carouri cu latura de 50/50 km pentru colectare de insecte în perioada noiembrie-aprilie și carouri cu latura de 25/25 km pentru colectarea probelor în perioada mai-octombrie.

Pentru semnalarea și evaluarea incidenței culicoidelor au fost folosite capcane luminoase fixe și mobile.

Kitul de capturare a culicoizilor este diferit în funcție de scopul utilizării lor. Capcana fixă sau mobilă, cu lumină UV, alimentată la 220V sau baterie 12V însoțite obligatoriu de 2 pahare colectare (500 ml), soluție slabă de detergent, un fragment de țesătură nylon 20/20 cm cu orificii fine, recipiente din plastic cu capac filetant (150-200 ml) pentru conservarea culicoizilor în alcool 70%, sită cu ochiuri fine, termometru de exterior, soluție PBS cu sau fără antibiotic pentru prelevarea insectelor în vederea izolării de virus și registre specifice pentru notarea datelor.

Fiecare capturare de insecte a fost menționată într-o fișă entomologică în care au fost specificate datele privind: localitatea, locația (altitudine, latitudine, longitudine), tipul de exploatare, tipul de capcană, speciile de animale existente la locul de amplasare a

capcanei, data capturării, temperaturile atmosferice (minimă și maximă), numărul de insecte capturate, numărul de culicoizi identificați și raportul numeric și procentual al speciilor de culicoide.

a. Amplasarea capcanelor

Capcanele fixe utilizate pentru capturarea vectorilor au fost amplasate în localitățile în care au fost selectate animalele santinelă pentru supravegherea serologică: Milcovu și Răcoasa (Vrancea)

Capcanele mobile au fost amplasate în diferite locații din județul Vrancea: Vintileasca, Fitionești, Nistorești, Dumitrești, etc.

Toate punctele de colectare au fost individualizate cu mijloace GPS, utilizând coordonatele de latitudine, longitudine și altitudine (tabelul 7.1. și fig. 7.2.).

Tabel 7.1./Table 7.1.

Coordonatele GPS ale localităților cu capcane permanente
GPS coordinates of localities with permanent traps

JUDEȚUL VRANCEA	Localitățile țină	Latitudine	Longitudine	Altitudine metri
Capcane fixe	Milcovul	45.6457089N	27.2597813E	33
	Răcoasa	45.9922131N	26.8793905E	318
Capcane mobile	Vintileasca	45643067	26732576	786
	Nistorești	45813784	26658159	414
	Fitionești	45989238	27055454	251
	Dumitrești			425



Fig. 7.2. Harta cu locațiile capcanelor permanente
Fig. 7.2. Map with locations of permanent traps

Amplasarea capcanelor s-a efectuat în zonele cu factori predispozanți înmulțirii insectelor hematofage, în adăposturile animalelor receptive (bovine, ovine, cabaline) sau în imediata proximitate a animalelor utilizate pentru supravegherea serologică. Amplasarea capcanelor în astfel de locații a oferit avantajul obținerii unor date

epidemiologice relevante, pe baza cărora s-au configurat perioadele de activitate vectorială și perioadele libere de vectori.

Capcanele luminoase mobile au fost amplasate lunar în localități diferite și au funcționat o noapte pe săptămână timp de cel puțin 4 săptămâni, în fiecare punct de colectare, conform unui grafic prestabilit, astfel încât la fiecare punct să se efectueze minimum 4 recoltări. Capcanele fixe au fost amplasate în interiorul adăposturilor, în perioada liberă de vectori (fig.7.3.).



Fig.7.3. Capcane fixe, amplasate în interiorul adăposturilor de animale
Fig.7.3. Fixed traps, located inside the animal shelters

Culicoizii nu au specificitate de gazdă dar preferă anumite specii de animale, activitatea lor fiind semnalată mai ales în locurile cu aglomerații de vite și locuințele aflate în apropierea apelor. Capcanele luminoase au fost puse în funcțiune o dată pe săptămână pentru a se recolta insectele care supraviețuiesc în zonele selectate pentru monitorizare.

Datele obținute la capturarea insectelor hematofage, au fost menționate într-o fișă de supraveghere entomologică.

b.Tehnica capturării și colectării probelor de culicoizi

După verificarea integrității capcanelor, acestea s-au amplasat la o distanță de maxim 2 m de la sol. În paharul colector s-a adăugat o soluție slabă de detergent. În apropierea capcanelor s-a fixat termometrul pentru înregistrarea temperaturii exterioare. Paharul colector a fost etichetat și identificat cu date privind data colectării, localitatea și speciile de animale aflate în arealul de studiu. Capcanele au funcționat de la apus până la răsăritul soarelui, data și ora fiind menționate în fișele de lucru. Paharele de colectare au fost menținute la întuneric și au fost examinate în laborator, însoțite de fișa entomologică.

c.Tehnica de prelucrare și identificare a culicoizilor

Probele colectate au fost analizate în Laboratorul de Parazitologie din cadrul LSVSA Vrancea, acreditat pentru identificare vectorială.

Pentru prelucrare, insectele au fost spălate de 2-3 ori prin soluții PBS simplu (soluție tamponată cu fosfat) și conservate în același timp de soluție, în vederea conservării și identificării acestora.

Pentru examinarea microscopică a speciilor de *Culicoides*, insectele au fost distribuite într-o placă Petri și examinate la stereomicroscop (fig.7.4. a și b).

Identificarea speciilor de *Culicoides* (îndeosebi *C. pulicaris*, *C. obsoletus/C. scoticus*, *C. nubeculosus*, *C. dewulfi*) s-a efectuat după dimensiunea corpului, transparența aripilor, numărul segmentelor anterioare, etc. și în mod special după morfologia aripii folosind cheia de identificare după Meiswinkel-2005 (fig.7.5.). *C. obsoletus/C. scoticus* sunt specii endofile (supraviețuiesc în adăposturile animalelor) și a căror femele au o morfologiei asemănătoare, motiv pentru sunt dificil de identificat, necesitând uneori tehnici de biologie moleculară (Augot ș.a., 2010).

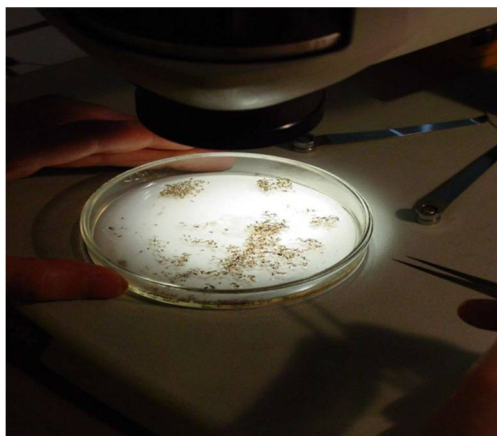


Fig. 7.4. Examinarea culicoizilor capturați (a și b)
Fig. 7.4. Examination of captured culicoids (a and b)

Toate exemplarele de *Culicoides* au fost separate în plăci Petri în funcție de specie după care au fost cuantificate numeric și procentual. Pentru păstrarea probelor, exemplarele au fost transferate în flacoane cu soluție de PBS și antibiotice și s-au etichetat cu mențiunile specifice de identificare: data, localitatea și județul (fig.7.6.).

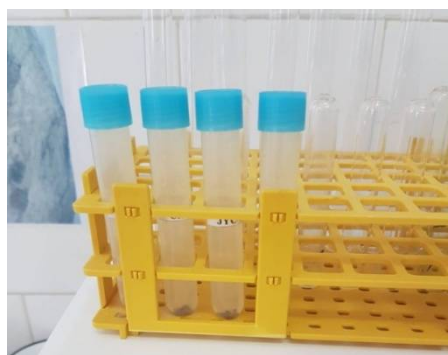


Fig.7.5.. Identificarea și sortarea speciilor de *Culicoides* pe baza morfologiei
Fig.7.5 . Identification and sorting of *Culicoides* species based on morphology

Fig. 7.6. Probe de culicoizi suspendate în TFS cu antibiotic
Fig. 7.6. Samples of colicoids suspended in TFS with antibiotic

7.1.2. Rezultate și discuții

Vrancea este o bioregiune geografică complexă: treimea vestică aparține domeniului montan, care se suprapune bioregiunii alpine, zona mediană corespunde bioregiunii continentale, iar extremitatea răsăriteană, care este suprapusă Câmpiei Siretului Inferior, aparține bioregiunii stepice (<http://www.anpm.ro/>). Toate aceste aspecte fac ca această bioregiune să fie un mediu propice pentru dezvoltarea speciilor *Culicoides*.

Pe parcursul celor 4 ani, datele înregistrate au variat foarte mult în funcție de arealul geografic luat în studiu, anotimp și implicit a valorilor termice existente la momentul amplasării capcanelor.

În **județul Vrancea**, numărul capcanelor amplasate în localitățile țintă (Milcovu, Răcoasa) și numărul insectelor capturate a variat de la un an la altul (tabelul 7.2).

Tabel 7.2./Table 7.2.

Situația supravegherii vectorilor în județul Vrancea
The situation of vector surveillance in Vrancea county

VRANCEA			Insecte		Alte specii de <i>Culicoides</i>					
Perioada	Nr capcane	Nr. insecte capturate	<i>Culicoides</i>		<i>C. obsoletus</i>		<i>C. pulicaris</i>		Alte specii	
			nr	%	nr	%	nr	%	nr	%
2014	34	453	8	1,76	3	37,50	5	62,50	-	-
2015	56	5651	765	13,54	604	78,95	92	12,02	69	9,02
2016	39	7685	1182	15,38	727	61,50	455	38,50		
2017	18	1419	8	0,56	4	50,00	4	50,00		

În decursul **anului 2014**, din septembrie și până în decembrie, au fost montate 34 de capcane luminoase fixe și mobile cu care s-au realizat 12 capturi de insecte și dintre acesta doar 3 capturi au inclus insectele culicoide. În urma analizării capturilor au fost identificate 453 insecte zburătoare. Dintre acestea, 8 (1,76%) au fost insecte vectoriale *Culicoides*, 3 (37,50%) specimene aparținând complexului *C. obsoletus* și 5 (62,50%) specimene din complexul *C. pulicaris* (fig.7.7.).

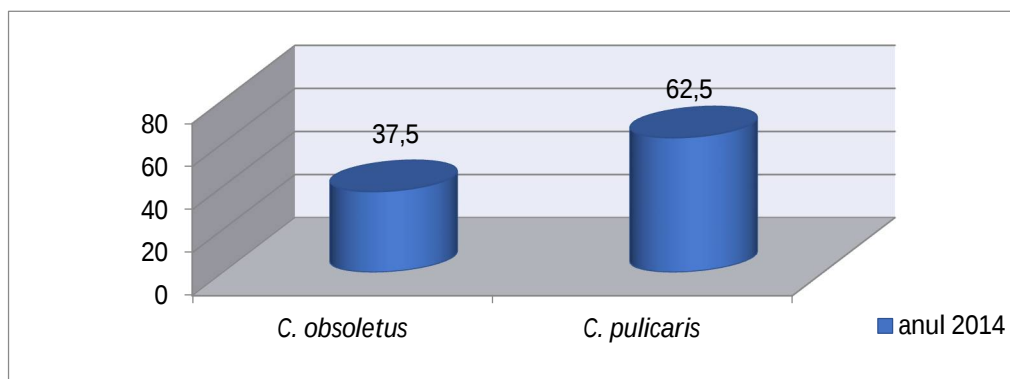


Fig.7.7.Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2014, în județul Vrancea

Fig.7.7 Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2014, in Vrancea county

Rolul culicoizilor în răspândirea *Bluetongue* este incontestabil iar prevalența bolii este influențată în mod direct de supraviețuirea acestor insecte care au nevoie de factori favorizanți pentru înmulțire, cum ar fi temperatura, umiditatea sau tipul de areal geografic.

Prezența culicoidelor a fost observată în lunile septembrie și octombrie și a lipsit în luna decembrie.

Conform mențiunilor termice semnalate în perioada capturării, activitatea culicoidelor s-a desfășurat la valori termice cuprinse între 6°C și 12°C pentru *C. pulicaris* și 7°C- 12°C pentru *C. obsoletus* (fig. 7.8.)

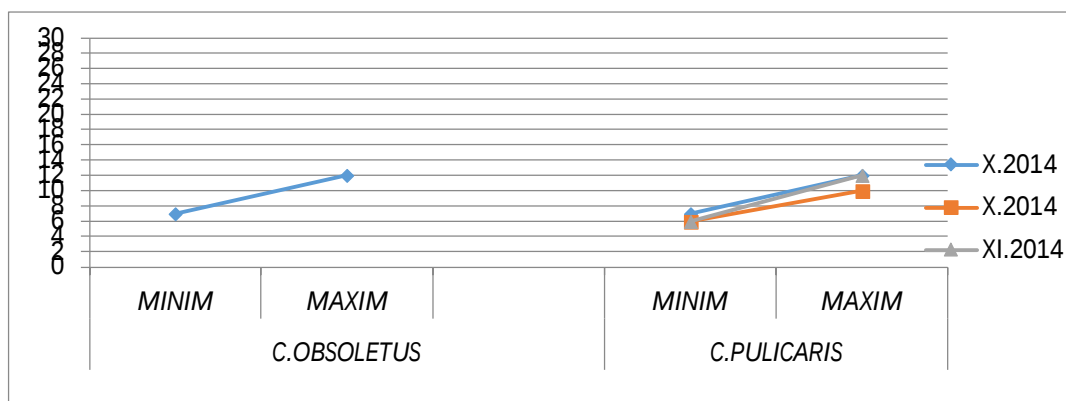


Fig.7.8. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2014, județul Vrancea

Fig.7.8 Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values from 2014, Vrancea

În perioada ianuarie-decembrie a **anului 2015**, au fost amplasate și supravegheate 57 de capcane, înregistrându-se 45 de capturi, la 35 dintre acestea semnalându-se și prezența insectelor culicoide. Din cele 5651 de insecte zburătoare capturate, 765 (13,54%) au fost *Culicoides*. Analiza morfologică a acestora a pus în evidență 604 (79,95%) specimene din complexul *C. obsoletus*, 92 (12,02%) specimene de *C. pulicaris* și 69 (9,02%) specimene aparținând altor specii de culicoide (fig.7.9).

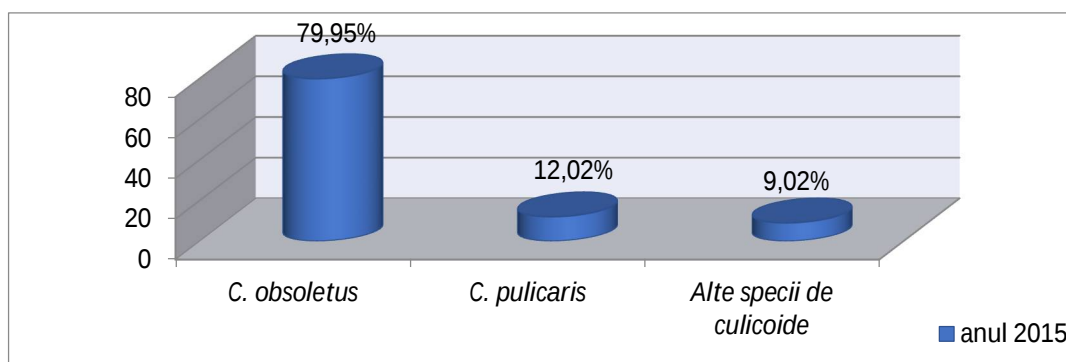


Fig.7.9. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2015, în județul Vrancea

Fig.7.9 Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2015, in Vrancea

În această perioadă, prezența culicoizilor a fost semnalată din aprilie până în a doua decadă a lunii septembrie. În luna aprilie, când valorile termice au fost cuprinse între 9⁰C și 19⁰C, nu au fost capturate insectele culicoide vectoriale. *C.obsoletus* și-a făcut simțită prezența începând cu luna mai și până în prima decadă a lunii septembrie, când temperaturile ambientale au oscilat între 15⁰C și 33⁰C. *Culicoides pulicaris* a activat simultan cu *C. obsoletus*, din luna mai și până în prima decadă a lunii august când, cel mai probabil datorită densității reduse nu a mai fost capturat până în a doua decadă a lunii septembrie când valorile termice au fost mai moderate și stabilizate între 12⁰C și 23⁰C (fig.7.10.)

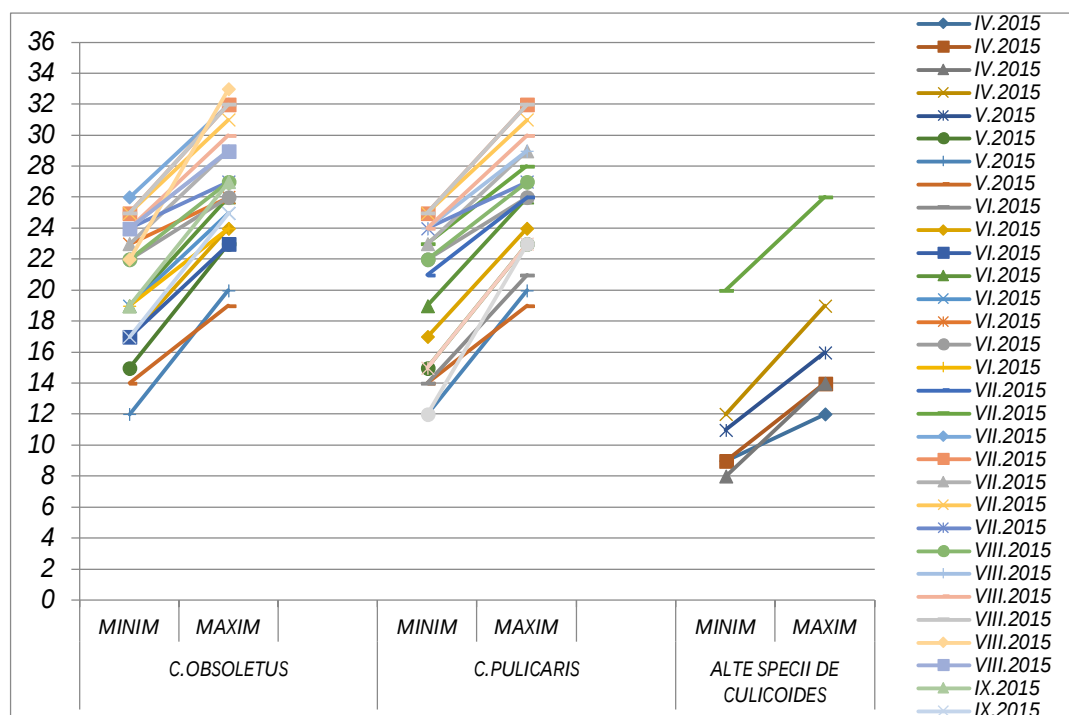


Fig.7.10. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2015, județul Vrancea

Fig.7.10. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2015, Vrancea

În anul 2016, au fost montate și supravegheate 97 de capcane luminoase fixe și mobile cu care s-au efectuat 50 de capturi iar la 26 dintre acestea au fost identificate și insecte culicoide. Din cele 7495 de insecte, 1182 (15,38%) specimene au fost insecte *Culicoides*, din care 727 (61,50%) au aparținut speciei *C. obsoletus* și 455 (38,50%) au aparținut speciei *C. pulicaris* (fig.7.11.).

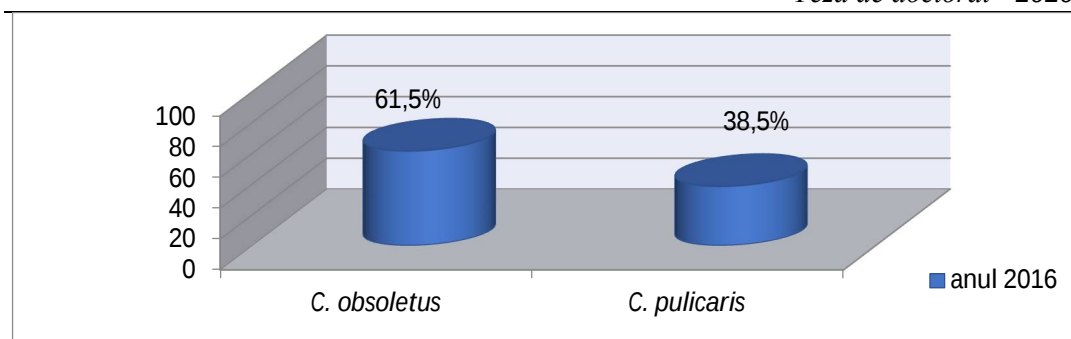


Fig.7.11. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2016, în județul Vrancea

Fig.7.11. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2016, in Vrancea

În **anul 2016**, activitatea insectelor culicoide a fost semnalată începând cu aprilie când limitele termice lunare au fost cuprinse între 12°C și 20°C și până în septembrie când valorile termice în zilele în care s-au verificat capcanele, au fost între 7°C și 10°C. Limitele termice anuale între care vectorii culicoizi și-au manifestat activitatea, au fost cuprinse între 7°C și 36°C pentru *C. obsoletus* și între 7°C și 32°C pentru *C. pulicaris* (fig. 5.12.)

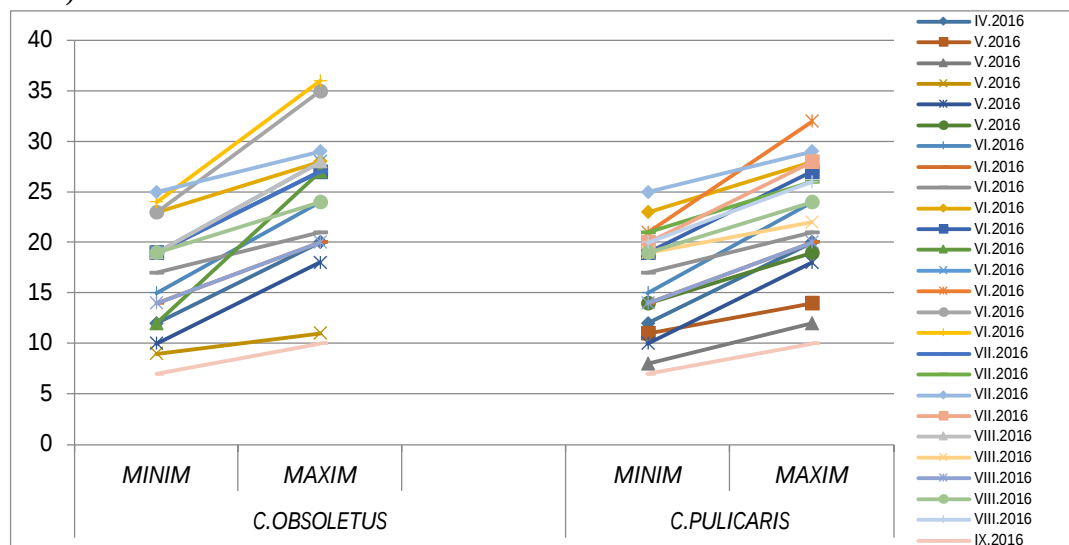


Fig.7.12. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2016, județul Vrancea

Fig.7.12. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2016, Vrancea

În **anul 2017**, având în vedere absența focarelor de *Buletongue* în anii 2015-2016 precum și eficientizarea prelevării pentru micșorarea costurilor, a fost redus numărul de capcane amplasate. Prin urmare, din februarie și până în decembrie, au fost montate și supravegheate doar 18 capcane cu ajutorul cărora s-au efectuat 16 capturi de insecte nocturne, la 3 dintre acestea fiind identificate și insecte *Culicoides*. Din cele 1419 insecte

capturate, 8 (0,56%) specimene au fost *Culicoides*, dintre care 4 (50%) specimene au aparținut complexului *C. obsoletus* și 4 (50%) specimene au fost *C. pulicaris* (fig.7.13).

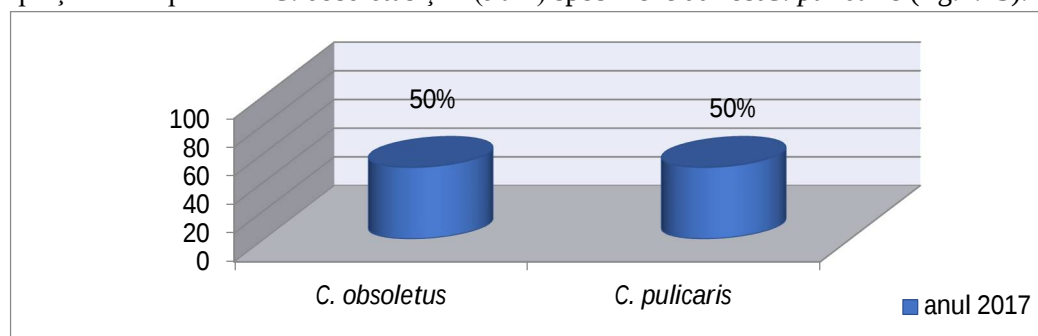


Fig.7.13. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2016, în județul Vrancea

Fig.7.13. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2016, in Vrancea

Activitatea vectorială a speciilor vectoriale *C. obsoletus* și *C. pulicaris*. a fost semnalată la toate capturile obținute în lunile iulie, august și septembrie când limitele valorilor termice s-au situat între 19°C și 34°C (fig.7.14).

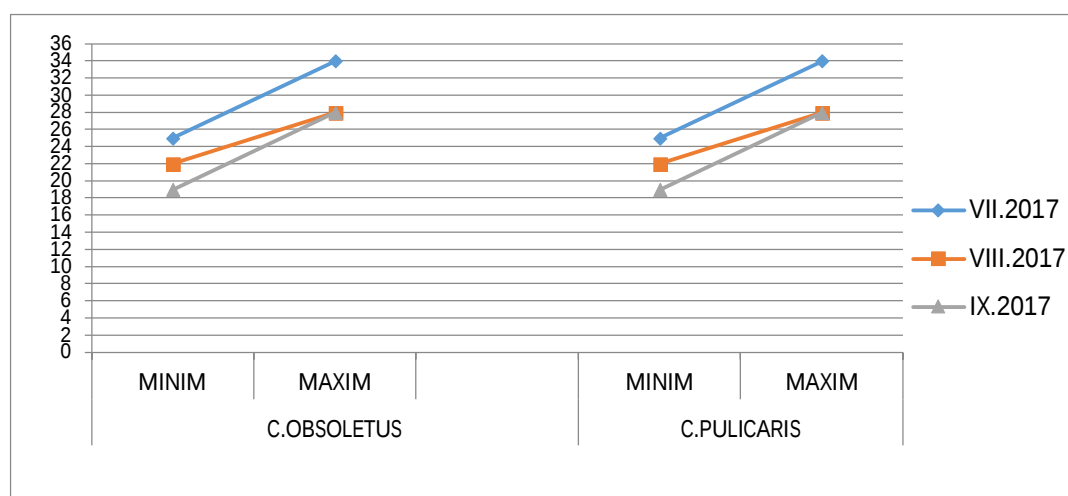


Fig.7.14. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2017, județul Vrancea

Fig.7.14. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2017, Vrancea county

Deși în România au fost identificate și alte specii de culicoide vectoriale pentru virusul *Bluetongue* (Mot ș.a., 2018), totuși în urma monitorizării entomologice în județul Vrancea, au fost semnalate doar speciile vectoriale *C. obsoletus* și *C. pulicaris*.

Analiza de ansamblu a rezultatelor entomologice obținute în județul Vrancea a arătat faptul că, la sfârșitul perioadei de monitorizare a studiului efectuat, ponderea culicoizilor capturați a fost diminuată de la 1,76% (2014), la 13,54% (2015) și la 15,38% (2016) la 0,56% (2017), (fig.7.15).

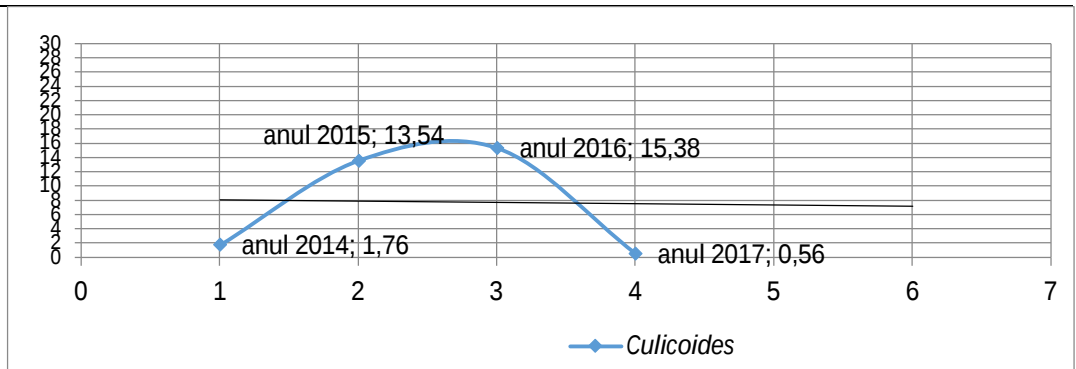


Fig. 7.15. Tendința de descreștere lineară a densității speciilor de *Culicoides* în județul Vrancea

Fig. 7.15. The trend of linear decrease of the density of *Culicoides* species in Vrancea

În perioada luată în studiu, complexul *C. obsoletus* a fost dominant în capturile efectuate în 2015 (78,95%) și 2016 (61,5%), cu excepția anului 2014 când *C. pulicaris* a avut o incidență de 62,5% (fig.7.16).

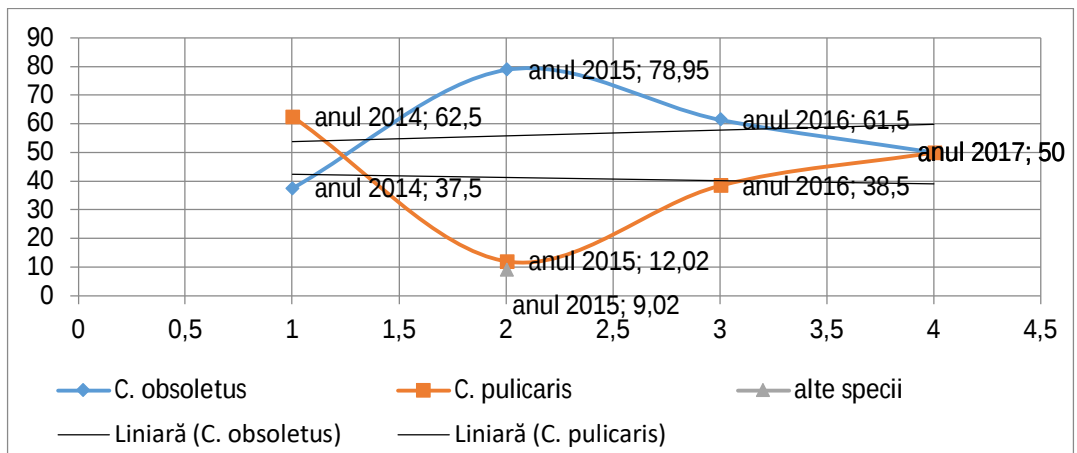


Fig. 7.16. Incidența și tendința de evoluție a speciilor de *Culicoides* în perioada 2014-2017, în județul Vrancea

Fig. 7.16. Incidence and evolution trend of *Culicoides* species in 2014-2017, in Vrancea

Faptul că în anul 2017, cele două specii vectoriale se regăsesc încă în arealul județului Vrancea, se poate conchide că zona deține toți factorii favorizanți pentru supraviețuirea ambelor specii și permite desfășurarea simultană a activității vectoriale. Cu toate acestea, linia de tendință grafică ilustrează o ușoară creștere a ponderii pentru *C. obsoletus* și o ușoară tendință de scădere pentru *C. pulicaris*.

7.1.3. Concluzii

Investigațiile privind monitorizarea vectorilor transmițători ai virusului *Bluetongue*, au dus la următoarele concluzii:

1. În județul **Vrancea** au fost identificate insecte hematofage din complexul *C. obsoletus* și complexul *C. pulicaris*, considerate vectori pentru transmiterea bolii limbii albastre.
2. În **anul 2014**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **1,76 %** (n=8), dintre acestea 37,50% (n=3) au fost *C. obsoletus* și 62,50% (n=8) au fost *C. pulicaris*., iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în septembrie-octombrie la valori termice cuprinse între 6°C și 12°C pentru *C. pulicaris* și 7°C- 12°C pentru *C. obsoletus*.
3. În **anul 2015**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **13,54%** (n=765) iar dintre acestea 79,95% (n=604) au fost *C. obsoletus*, 12,02% (n=161) au fost *C. pulicaris*.și 9,02% (n=69)au fost culicoide non-vectoriale, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada mai- septembrie, la valori termice cuprinse între 15°C și 33°C pentru *C. obsoletus* și 12°C și 23°C pentru *C. pulicaris*.
4. În **anul 2016**, incidența insectelor culicoide a fost de **15,38%** (n=1182), iar dintre acestea: 61,50%(n=727) au fost *C. obsoletus* și 38,50% (n=455) au fost *C. pulicaris*, iaractivitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada aprilie- septembrie, la valori termice cuprinse între 7°C și 36°C pentru *C. obsoletus* și 7°C și 32°C pentru *C. pulicaris*.
5. În **anul 2017**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **0,56%** (n=8) iar dintre acestea 50% (n=4) au fost *C.obsoletus* și 50% (n=4) au fost *C.pulicaris*., iar activitatea vectorială a culicoidelor *C. obsoletus* și *C. pulicaris*. a fost semnalată în perioada iulie- septembrie, la valori termice cuprinse între 19°C și 34°C.

7.2. Supravegherea entomologică în județul Brăila

Teritoriul județului Brăila, ca de altfel întregul spațiu al sectorului estic al Câmpiei Române, se caracterizează printr-un climat temperat continental. Prezintă nuanțe continentale ceva mai aride decât în restul Câmpiei Române, reflectate în amplitudinile termice cele mai ridicate dințară, cantități reduse de precipitații cu distribuție neuniformă în timpul anului, frecvente ploi torențiale cu căderi de grindină, geruri și viscole, deficit de umiditate foarte mare suprapus perioadei de vegetație a culturilor agricole, secete.

7.2.1. Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, supravegherea entomologică s-a efectuat prin amplasarea de capcane luminoase mobile și fixe în localitățile țintă: Galbenu, Gropeni, Rîmnicelu și

capcane mobile în localitățile: Jirlău, Movila Miresei, Ulmu, Bărăganu, Făurei, Racoviță, Zăvoaia, Unirea, Bertești.

Folosind GPS-ul, s-au identificat coordonatele geografice: altitudine, latitudine, longitudine ale amplasamentelor (tabelul 7.3., fig. 7.17).

Capcanele fixe au fost montate începând cu luna ianuarie și până în luna noiembrie, în interiorul adăposturilor animalelor receptive la *Bluetongue*. De asemenea, în fiecare lună, s-a ales câte o nouă localitate în care s-au efectuat capturi în perioada de activitate vectorială, utilizând capcane mobile. În perioada liberă de vectori, capcanele fixe au fost amplasate în interiorul adăposturilor.

Tabel 7.3./Table 7.3.

Coordonatele GPS ale localităților cu capcane permanente, în județul Brăila
GPS coordinates of localities with permanent traps, in Brăila

JUDETUL BRĂILA	Localitățile țină	Latitudine	Longitudine	Altitudine metri
	Galbenu	45.213521N	27.16018840053367	49
	Gropeni	45.0744895N	27.8830185E	8
	Râmnicelu	45.2833311	27.5158234	21
	Jirlău	45.1818625	27.083819	28
	Movila Miresei	45.2174562	27.583733	43
	Ulmu	44.9551407	27.3004231	59
	Bărăganu	44.8137216	27.486219	8
	Făurei	45.083746	27.2358256	23
	Racoviță	45.2983696	27.4617057	38
	Unirea	45.109712	27.765423	26
	Bertești	44.8351376	27.7479163	21



Fig. 7.17. Harta cu locațiile capcanelor permanente în județul Brăila
Fig. 7.17. Map of the locations of permanent traps in Brăila County

Modul de amplasare, kitul de colectare precum și tehnicile de prelevare, conservare și examinare sunt descrise la cap.7.1.1.

Analizele de morfologie externă a insectelor culicoide au fost desfășurate în Laboratorul de Parazitologie din cadrul DSVSA Galați.

5.2.2. Rezultate și discuții

Numărul de capcane montate precum și numărul de capturi de insecte a fost variabil de la un an la altul (tabelul 7.4.).

Tabel 7.4./Table 7.4.

Situația supravegherii vectorilor în județul Brăila
The situation of vector surveillance in Braila county

BRĂILA		Nr. insecte capturate	Insecte		Specii de <i>Culicoides</i>							
Perioada	Nr capcane		<i>Culicoides</i>		<i>C.obsoletus</i>		<i>C.pulicaris</i>		<i>C.nubeculosus</i>		<i>Alte specii</i>	
			nr:	%	nr:	%	nr:	%	nr:	%	nr:	%
2014	31	4209	175	4,16	80	45,71	36	20,57	15	8,57	44	25,14
2015	49	39767	641	1,61	172	26,83	464	72,38	-	-	5	0,78
2016	36	12694	527	4,15	112	21,25	407	77,22	-	-	8	1,51
2017	27	4644	62	1,33	25	40,32	37	59,68	-	-	-	-

În anul 2014, capcanele fixe au fost amplasate începând cu luna ianuarie în adăposturile pentru ecvine și bovine în vederea identificării culicoizilor vectoriali, dar și a perioadei optime de activitate vectorială. Pe parcursul anului, au fost montate 31 de capcane cu ajutorul cărora s-au efectuat 21 de capturi, la 14 dintre acestea identificându-se și insecte culicoide. Din cele 4209 de insecte zburătoare capturate, 175 (4,16%) specimene au fost *Culicoides*, iar dintre acestea, 80 (45,71%) au aparținut complexului *C. obsoletus*, 36 (20,57%) complexului *C. pulicaris*, 15 (8,57%) au aparținut speciei non-vectoriale *C. nubeculosus* și 44 (25,14%) au aparținut altor specii culicoide non -vectoriale (fig.7.18).

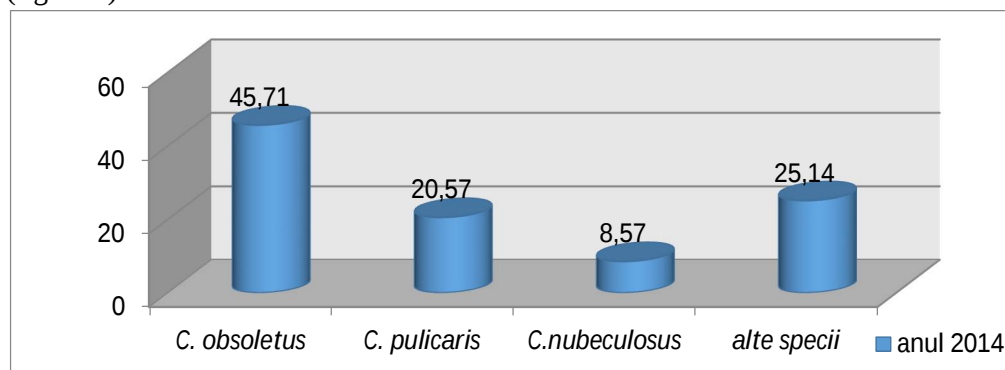


Fig.7.18. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2014, în județul Brăila

Fig.7.18. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2014, in Braila

Pe parcursul anului, s-a constatat că activitatea culicoidelor vectoriale și non vectoriale adulte a fost prezentă la diferite intervale de temperatură a mediului ambiant (fig.7.19). Astfel, speciile de *C.obsoletus* au fost capturate începând cu luna august și până în noiembrie, la temperaturi cuprinse între 3°C și 31°C. *Culicoides pulicaris* a fost

semnalat începând cu luna aprilie până în luna septembrie, la valori termice mult mai restrânse, cuprinse între 11°C și 30°C.

Specia non-vectorială *C. nubeculosus*, a fost semnalată doar în lunile septembrie, octombrie și noiembrie, când limitele minime și maxime ale temperaturii mediului înconjurător au fost cuprinse între 3°C și 30°C. Alte specii de culicoide au fost semnalate în lunile august și septembrie când limitele termice au fost cuprinse între 12°C și 29°C.

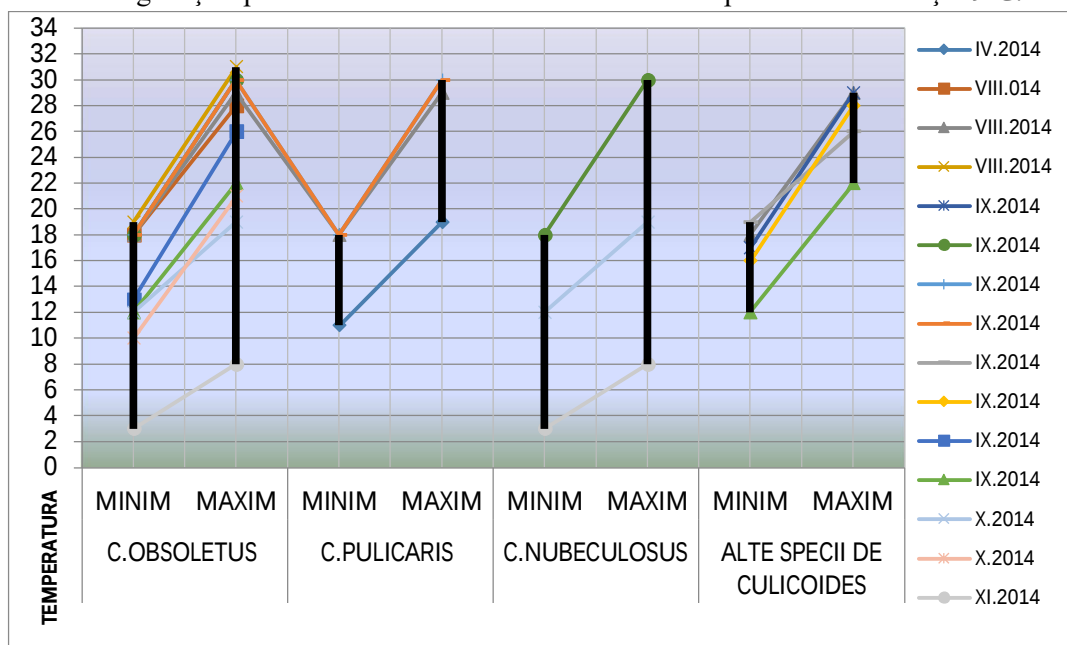


Fig.7.19. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2014, județul Brăila

Fig.7.19. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values from 2014, Brăila

În anul 2015, au fost amplasate 49 de capcane cu care s-au efectuat 41 de capturi, la 29 dintre acestea fiind identificate și insectele culicoide. Din cele 39767 de insecte zburătoare capturate, 641 (1,61%) au fost insecte hematofage din genul *Culicoides*. În urma diferențierii morfologice, 172 (26,83%) au fost încadrat în complexul *C. obsoletus*, 464 (72,38%) au fost *C. pulicaris*, iar 5 (0,78%) au fost alte specii culicoide non-vectoriale (fig.7.20.)

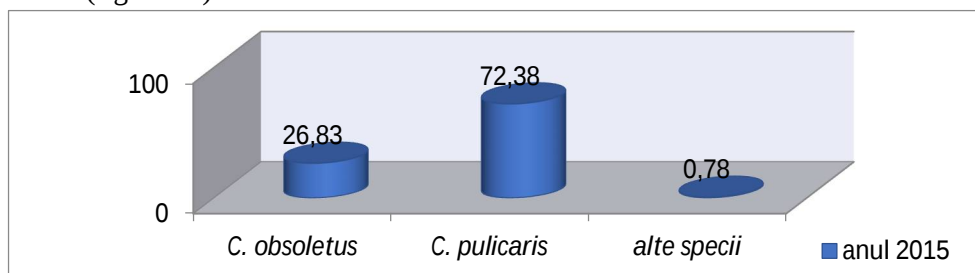


Fig.7.20. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2015, în județul Brăila

Fig.7.20. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2015, in Braila

În anul 2015, activitatea culicoidelor a început cu luna aprilie când limitele termice au fost situate între 8°C-14°C. *C.obsoletus* a fost semnalat din aprilie și până în luna septembrie, activitatea sa fiind prezentă la temperaturi cuprinse între 8°C și 34°C. *C. pulicaris* a fost capturat într-o perioadă mai lungă de timp cuprinsă între lunile aprilie și noiembrie, când temperaturile au variat de la 5°C la 34°C (fig.7.21.)

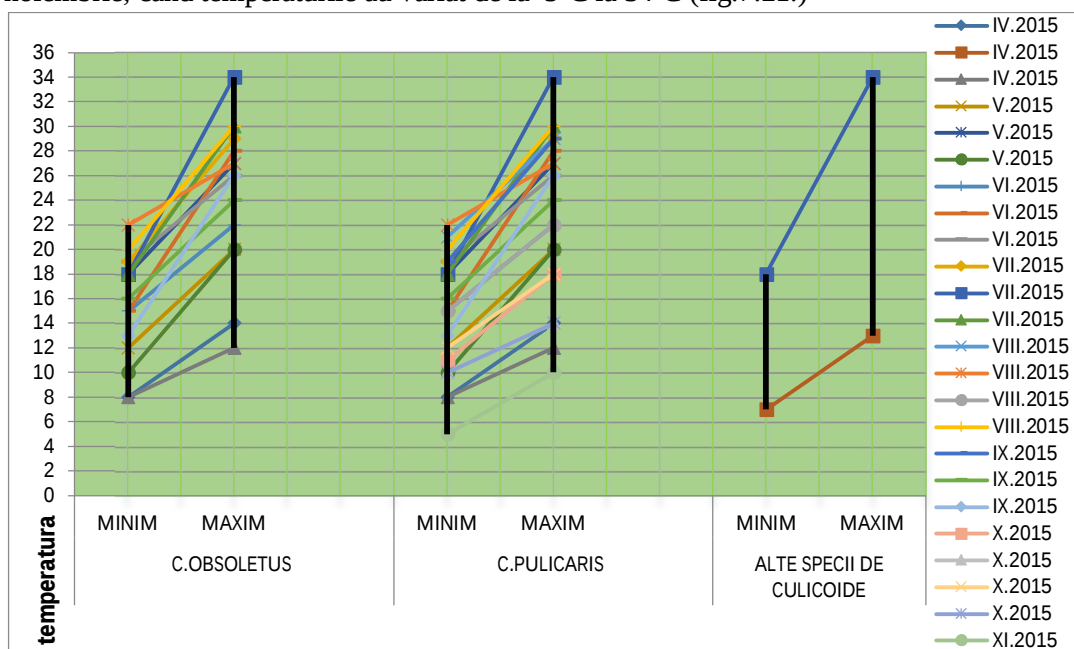


Fig.7.21.Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2015, județul Brăila

Fig.7.21. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to thermal values of 2015, Brăila

În anul 2016, s-au montat 36 de capcane cu care s-au efectuat 28 de capturi, la 21 dintre acestea fiind identificate și insecte culicoide. Din cele 12694 de insecte, 527 (4,15%) au fost insecte culicoide, iar la analiza morfologică externă, 112 (21,25%) speciimenele au fost încadrate în complexul *C. obsoletus*, 407 (77,22%) speciimene au fost *C. pulicaris*, iar 8 (1,51%) speciimene au aparținut altor specii de culicoizi non-vectoriali (fig.7.22).

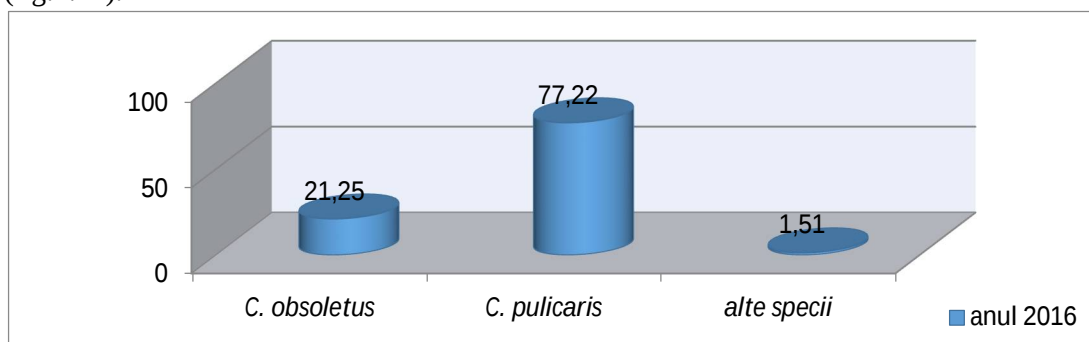


Fig.7.22. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2016, în județul Brăila

Fig.7.22. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2016, in Brăila

În anul 2016, ca și în anii anteriori, capcanele au fost amplasate încă din luna ianuarie. Primele capturi de culicoizi vectoriali au fost semnalate în luna mai când a fost identificată specia *C.pulicaris* și care și-a păstrat activitatea până în luna septembrie, în limitele termice cuprinse între 7°C și 34°C. Specia *C.obsoletus* a fost identificată mult mai rar în capturile lunare din iunie, iulie și septembrie dar a avut o activitate mai intensă, fiind semnalată în toate colectele din luna august. Prezența sa a fost semnalată la valori termice cuprinse între 7°C și 34°C (fig.7.23). Alte specii culicoide au fost capturate în luna iunie și iulie, în perioada în care valorile termice erau cuprinse între 13°C și 33°C.

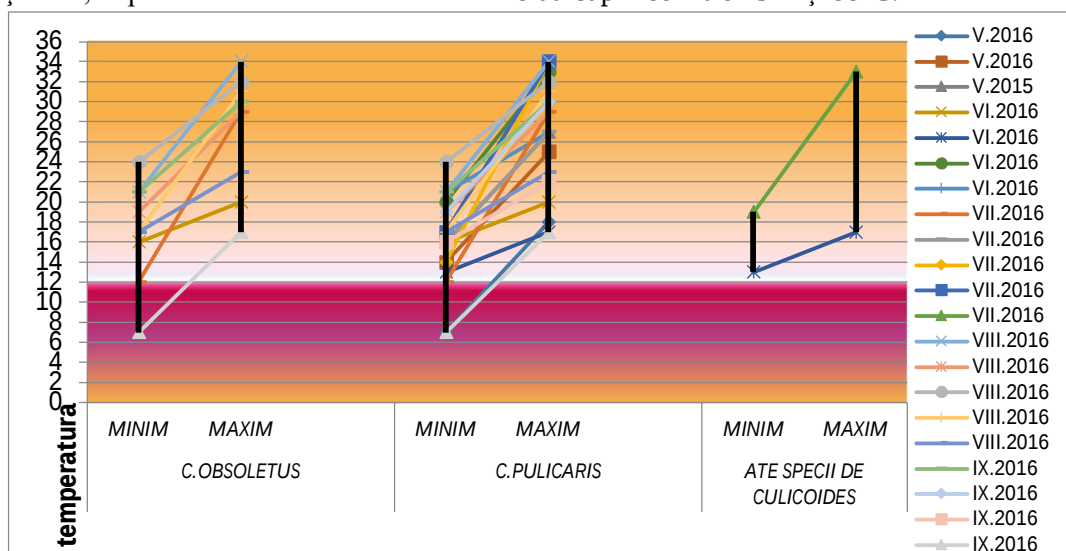


Fig.7.23. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2016, județul Brăila

Fig.7.23. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2016, Brăila county

În anul 2017, datorită situației epidemiologice a bolii și în absența focarelor de boală încă de la finalul anului 2016, a fost redus numărul de capcane fixe și mobile. Pe parcursul anului, au fost capturate 4644 insecte zburătoare, dintre acestea 62 (1,33%) au fost insecte *Culicoides* care au aparținut celor două specii vectoriale principale: *C. obsoletus*– 25 (40,32%) specimene și *C. pulicaris*– 37 (59,68%) specimene (fig.7.24)

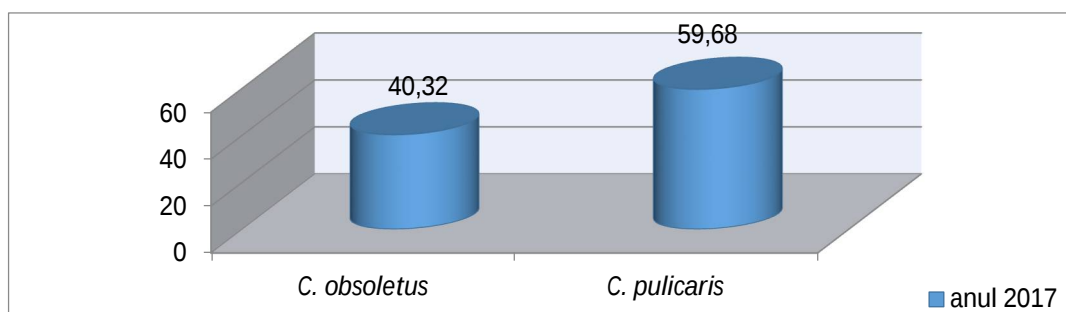


Fig.7.24. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2017, în județul Brăila

Fig.7.24. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2017, in Braila

În 2017, au fost amplasate 27 de capcane, începând cu luna ianuarie când s-au efectuat 18 capturi, la 6 dintre ele evidențiindu-se și insectele culicoide. Primele insecte vectoriale s-au identificat începând cu luna mai și până în luna octombrie, perioadă în care, limitele termice de activitate a insectelor adulte au fost cuprinse între 11°C și 36°C (fig.7.25).

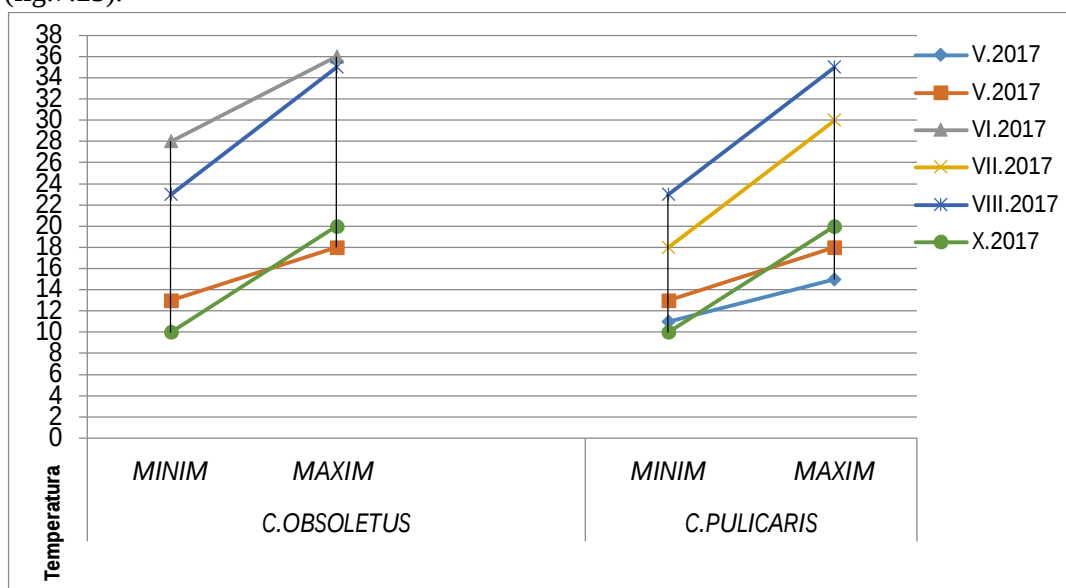


Fig.7.25. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2017, județul Brăila

Fig.7.25. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2017, Brăila

Analiza de ansamblu a rezultatelor entomologice obținute în județul Brăila a arătat că, până la sfârșitul perioadei de monitorizare a studiului efectuat, ponderea culicoizilor capturați, s-a diminuat de la 4,16% (2014), la 1,61% (2015) și la 4,15% (2016) și la 1,33% (2017), (fig.7.26).

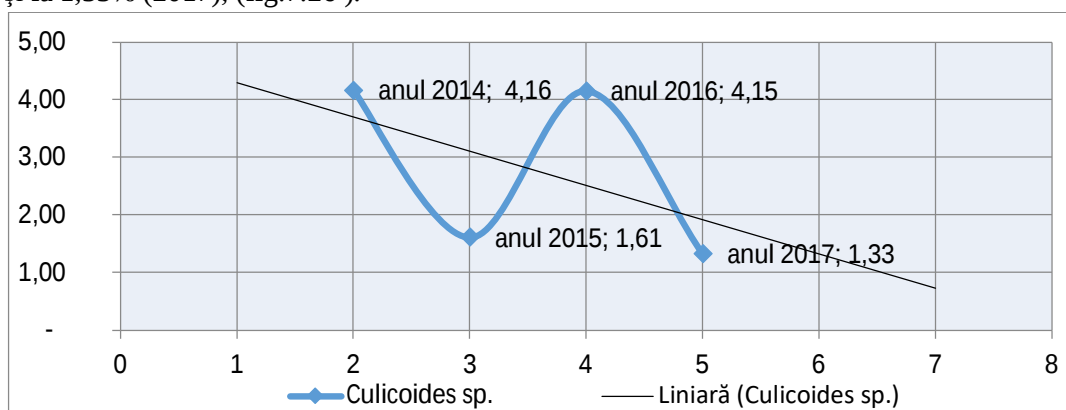


Fig. 7.26. Tendința de descreștere lineară a densității speciilor de *Culicoides* în județul Brăila

Fig. 7.26. Trend of linear decrease of *Culicoides* species density in Brăila

Anul 2014 este singura perioadă în care raportul procentual al speciilor culicoide a fost în favoarea *C.obsoletus* (45,71%), raport care, ulterior s-a modificat în favoarea *C.pulicaris*: 72,38% (2015), 77,22% în 2016, la 59,68% în 2017. De asemenea, doar în anul 2014 au fost capturați culicoizi din specia *C. nubeculosus* (8,57%) și s-a evidențiat cel mai ridicat procent la alte specii culicoide (25,14%) care s-a diminuat până la 0,78% în 2015, 1,15% în 2016 și au lipsit în anul 2017 (fig.7.27).

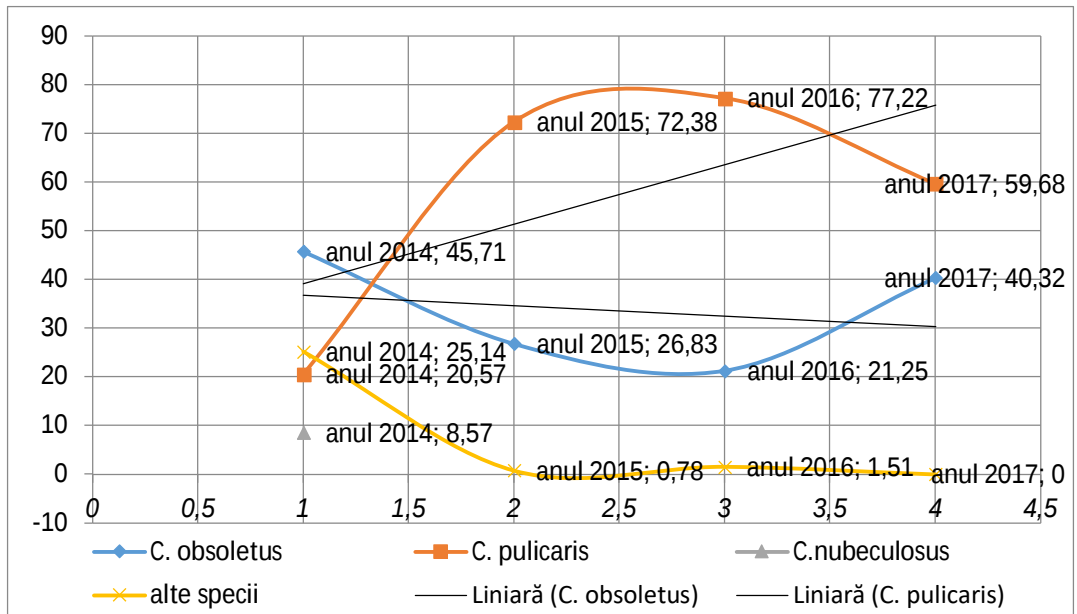


Fig. 7.27. Incidența și tendința de evoluție a speciilor de *Culicoides* în perioada 2014-2017, în județul Brăila

Fig. 7.27. Incidence and evolution trend of *Culicoides* species in the period 2014-2017, in Brăila

Din analiza datelor prezentate în fig.7.27. reiese capacitatea de adaptare și supraviețuire și tendința de creștere a densității culicoidelor din specia *C. pulicaris*. Chiar dacă incidența culicoidelor *C.obsoletus* a crescut în 2017 la 40,32%, totuși linia de tendință previzionează o ușoară descreștere a ponderei vectoriale. Cele două specii vectoriale evoluează simultan în același areal, având o bună capacitate de adaptare la condițiile pedoclimaterice, comparativ cu alte specii de *Culicoides*.

7.2.3. Concluzii

Investigațiile privind monitorizarea vectorilor transmițători ai virusului *Bluetongue*, au dus la următoarele concluzii:

1. În județul **Brăila**, au fost identificate insecte hematofage din complexul *C. obsoletus*, complexul *C.pulicaris*, și *C.nubeculosus*, considerate vectori pentru transmiterea bolii limbii albastre, cu o incidență diferită în funcție de ani.
2. În **anul 2014**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **4.16 %** (n=175), dintre acestea 45,71% (n=80) au fost *C. obsoletus*, 20,57% (n=36) au fost

- C.pulicaris*, 8,57% (n=15) au fost *C.nubeculosus* și 22,14% (n=44) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în august-noiembrie la valori termice cuprinse între 3⁰C și 31⁰C pentru *C. obsoletus*, în aprilie-septembrie la valori termice cuprinse între 11⁰C- 30⁰C pentru *C. pulicaris*, în septembrie-noiembrie la valori termice cuprinse între 3⁰C și 30⁰C.
3. În **anul 2015**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **1,61%** (n=641) iar dintre acestea 26,83% (n=172) au fost *C. obsoletus*, 72,38% (n=464) au fost *C.pulicaris*, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada aprilie- septembrie, la valori termice cuprinse între 8⁰C și 34⁰C pentru *C. obsoletus* și în perioada aprilie-noiembrie la valori termice cuprinse între 5⁰C și 34⁰C pentru *C. pulicaris*.
 4. În **anul 2016**, incidența insectelor culicoide a fost de **4,15%** (n=1182), iar dintre acestea: 21,25%(n=112) au fost *C. obsoletus*, 77,22% (n=407) au fost *C.pulicaris*, și 1,51% (n=8) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale” iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada mai-septembrie, la valori termice cuprinse între 7⁰C și 34⁰C pentru *C. pulicaris*, în perioada iunie-septembrie când valorile termice au fost cuprinse între 7⁰C și 34⁰C pentru *C. obsoletus* și în lunile iunie-iulie la valori termice cuprinse între 13⁰C și 33⁰C *Culicoides* „non-vectoriale”
 5. În **anul 2017**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **1,33%** (n=62) iar dintre acestea 40,32% (n=25) au fost *C.obsoletus* și 59,68% (n=37) au fost *C.pulicaris*, iar activitatea vectorială a culicoidelor *C. obsoletus* și *C. pulicaris*. a fost semnalată în perioada mai- octombrie, la valori termice cuprinse între 11⁰C și 36⁰C.

7.3. Supravegherea entomologică în județul Galați

Teritoriul județului Galați, prin poziția sa geografică, condițiile naturale și climaterice dar și prin preocuparea populației rurale pentru zootehnie, oferă condiții avantajoase supraviețuirii și înmulțirii insectelor vectoriale din genul *Culicoides*. Județul se află la confluența unor importate ape curgătoare: Siret, Prut și Dunăre ceea ce oferă regiunii un topoclimat umed și răcoros vara iar iarna, umed și mai puțin rece. Prin poziția sa geografică și prezența curenților atmosferici, în special cei dinspre Sud-Vest și Sud care aduc aer tropical maritim dar și în condițiile încălzirii globale, județul Galați precum și județele învecinate Brăila și Tulcea, oferă condiții prielnice pentru adaptarea unor noi specii de nevertebrate, inclusiv insecte vectoriale din genul *Culicoides*.

7.3.1. Materiale și metode de lucru

În perioada 2014-2017, supravegherea entomologică s-a efectuat prin amplasarea de capcane luminoase fixe și mobile în diferite localități. Capcanele fixe au fost montate

în fermele de bovine selectate pentru supravegherea serologică, aflate în localitățile Smârdan și Drăgușeni. Capcanele mobile au fost amplasate, după un plan prestabilit, atât în fermele de bovine din localitățile Smârdan și Drăgușeni, cât și în fermele și exploatațile non-profesionale din Barcea, Munteni, Drăgănești, Slobozia și Liești.

Folosind GPS-ul, toate amplasamentele au fost identificate cu coordonatele geografice: altitudine, latitudine și longitudine (tabelul 7.5, fig. 7.28).

Modul de amplasare, kitul de colectare precum și tehnicile de prelevare, conservare și examinare au fost descrise la cap.7.1.1.

Tabel 7.5./Table 7.5.

Coordonatele GPS ale localităților cu capcane fixe și mobile din județul Galați
GPS coordinates of localities with fixed and mobile traps in Galați County

JUDEȚUL GALAȚI	Localitățile înă	latitudine	longitudine	Altitudine/ metri
Capcane fixe și mobile	Drăgușeni	46.013453 N	27.765120E	200
	Smârdan	45.486649N	27.935741E	13
	Barcea	45.7535012	27.4368948	29
	Munteni	45.924699	27.4006205	41
	Drăgănești	45.7877833	27.4418305	32
	Slobozia	45.5798072	27.6303422	66
	Liești	45.8067209	27.4741475	27



Fig. 7.28. Harta cu locațiile capcanelor fixe și mobile, în județul Galați
Fig. 7.28. Map with the locations of fixed and mobile traps, in Galați County

Analizele de morfologie externă a insectelor culicoide au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Parazitologie, din cadrul DSVSA Galați.

7.3.2. Rezultate și discuții

În perioada 2014-2017, numărul de capcane amplasate, precum și numărul de capturi de insecte, au prezentat deosebiri de la un an la altul (tabelul 7.6.).

Datele obținute în urma analizei entomologice, în perioada luată în studiu, sunt redactate sintetic în tabelul 7.4.

Tabel 7.6./Table 7.6.

Situația supravegherii entomologice, în județul Galați
The situation of entomological supervision in Galați

GALAȚI		Insecte										
Perioada	Nr. capcane	Nr. insecte capturate	<i>Culicoides</i>		<i>C. obsoletus</i>		<i>C. pulicaris</i>		<i>C. nubeculosus</i>		Alte specii <i>Culicoides</i>	
			nr	%	nr	%	nr	%	nr	%	nr	%
2014	29	3220	249	7,73	210	84,33	27	10,84	7	2,83	5	2,0
2015	38	17587	165	0,93	1	0,6	164	99,40	0	0	0	0
2016	38	12119	732	6,04	441	60,24	287	39,3	4	0,55	0	0
2017	22	7087	1050	14,81	1041	99,14	36	0,85	0	0	0	0

În anul **2014**, au fost utilizate 29 de capcane, amplasate în 23 de ferme de bovine și 6 exploatații *non-* profesionale. Pe parcursul anului, s-au obținut 18 capturi, la 10 dintre acestea fiind identificate și insecte culicoide.

Din cele 3220 de insecte capturate, 249 (7,73%) au fost insecte culicoide. În urma analizelor de morfologie externă, au fost identificate 210 (84,33%) insecte aparținând complexului *Culicoides obsoletus*, 27(10,84%) au fost *Culicoides pulicaris*, 7 (2,83%) insecte au fost *Culicoides nubeculosus* și 5(2,0%) insecte au fost alte specii de culicoide non-vectoriale (fig.7.29).

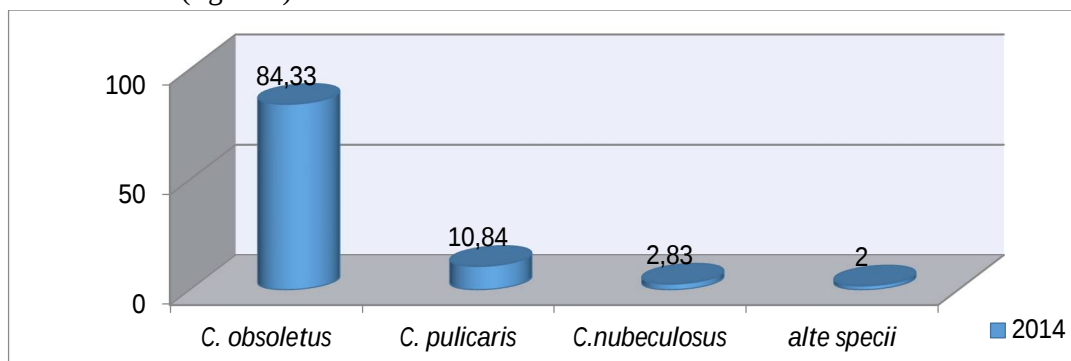


Fig.7.29 Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2014, în județul Galați

Fig.7.29 Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2014, in Galați county

Cele 29 de capcane au fost amplasate începând cu luna ianuarie și până în luna noiembrie. Primii vectorii culicoizi capturați, au aparținut speciei *C.pulicaris* și au fost semnalati doar în luna aprilie când limitele valorilor termice au fost cuprinse între 11°C și 20°C.

Simultan cu apariția speciei vectoriale *C.pulicaris*, a fost semnalată specia *C. nubeculosus*, a cărei activitate s-a stopat în luna august când limitele termice au fost cuprinse între 6°C și 31°C și a reapărut în luna noiembrie, când limitele valorilor termice au fost cuprinse între 6°C și 14°C.

Speciile din complexul *C. obsoletus* au fost identificate doar în capturile din luna septembrie când valorile termice au fost cuprinse între 17°C și 29°C (fig.7.30).

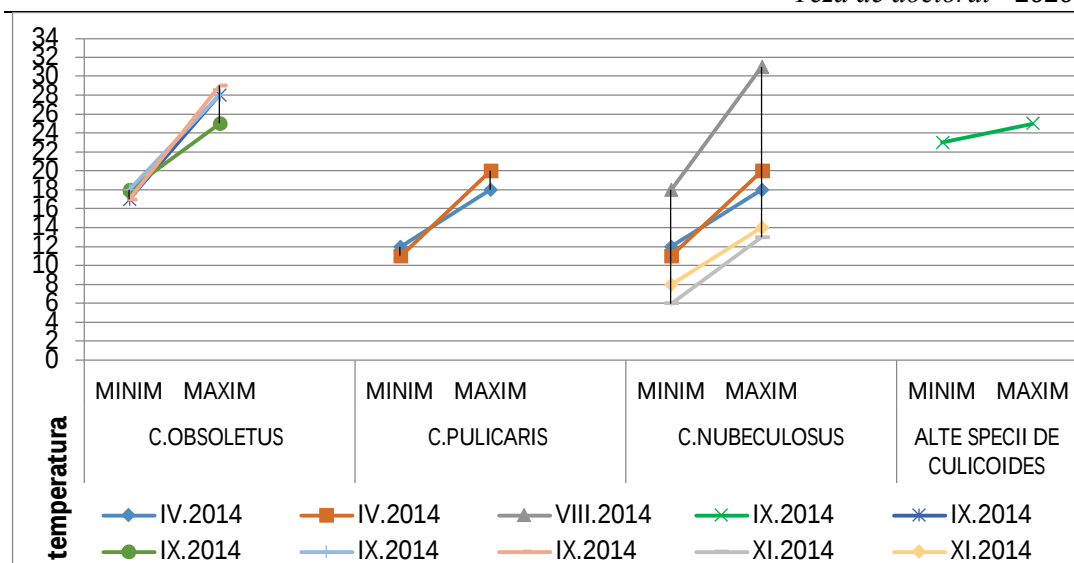


Fig.7.30. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2014, județul Galați

Fig.7.30. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values from 2014, Galați

În anul 2015, au fost montate 38 de capcane fixe și mobile doar la fermele de bovine cu ajutorul cărora s-au efectuat 32 de capturi, la 21 dintre acestea fiind identificate și insecte culicoide. Din cele 17587 de insecte capturate, 165(0,93%) au fost insecte *Culicoides*. Pe baza analizei morfologice externe, au fost identificate 164(99,40%) specimene de *Culicoides pulicaris* și 1(0,6%) specimene din complexul *Culicoides obsoletus*. Nu au fost identificate alte specii de culicoide (fig.7.31).

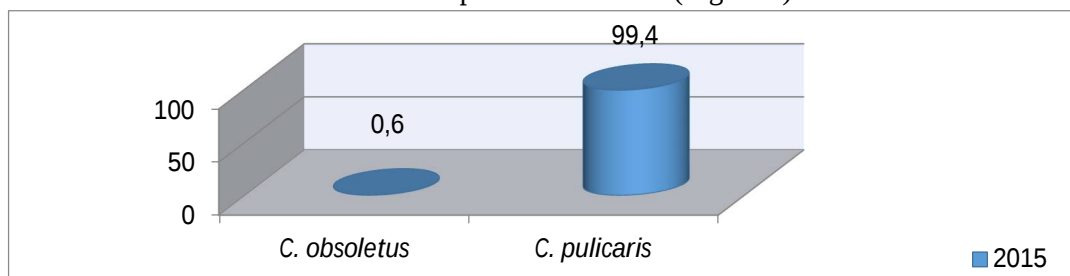


Fig.7.31. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2015, în județul Galați

Fig.7.31. Distribution of the *Culicoides* species identified in 2015, in Galați County

În ce privește distribuția culicoizilor, în colectele obținute au fost identificate preponderent specimene de *C. pulicaris* începând cu luna aprilie și până în luna octombrie activitatea lor fiind cuprinsă între 5°C și 33°C (fig.7.32).

C. obsoletus a fost semnalată la o singură captură efectuată în luna aprilie, când valorile termice au fost cuprinse între 5 și 18°C.

Pe parcursul anului 2015, nu au fost semnalate alte specii de culicoizi vectoriali sau non-vectoriali.

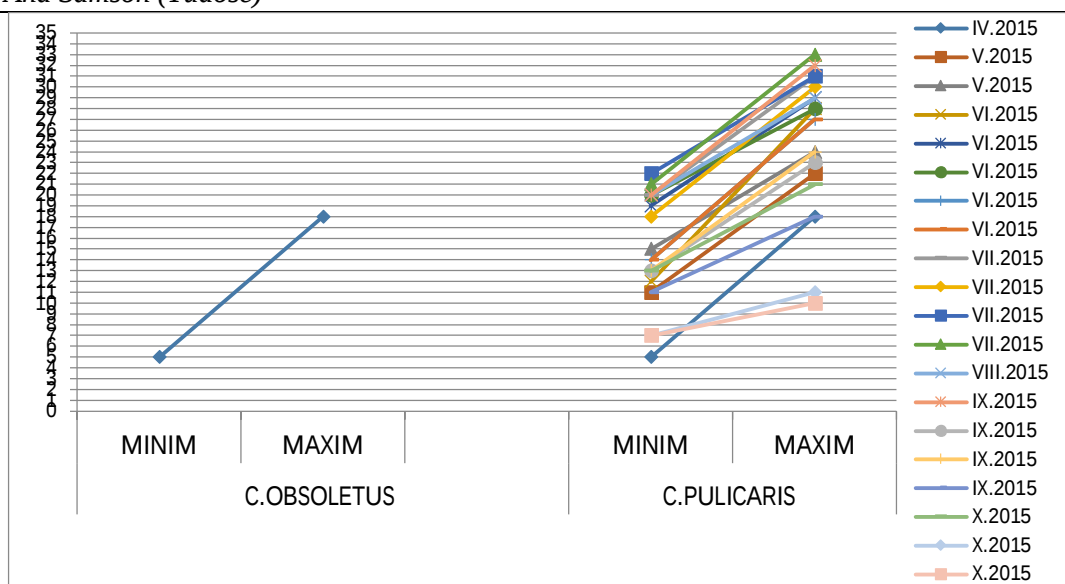


Fig.7.32. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2015, județul Galați

Fig.7.32. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2015, Galați County

În anul 2016, au fost montate 38 de capcane cu care s-au obținut 29 de capturi de insecte, la 19 dintre ele fiind identificate și insectele culicoide. Capcanele fixe și mobile au fost amplasate în 3 ferme de bovine și 35 de exploatații non-profesionale în localitățile țintă. Din cele 12.119 insecte zburătoare capturate, 732 (6,04%) specimene au fost vectori culicoizi. Analizând morfologia externă a acestora, 441 (60,24%) au aparținut complexului *C. obsoletus*, 287 (39,30%) au fost *C. pulicaris* și 4 (0,55%) specimene au fost *C. nubeculosus* (fig.7.33.).

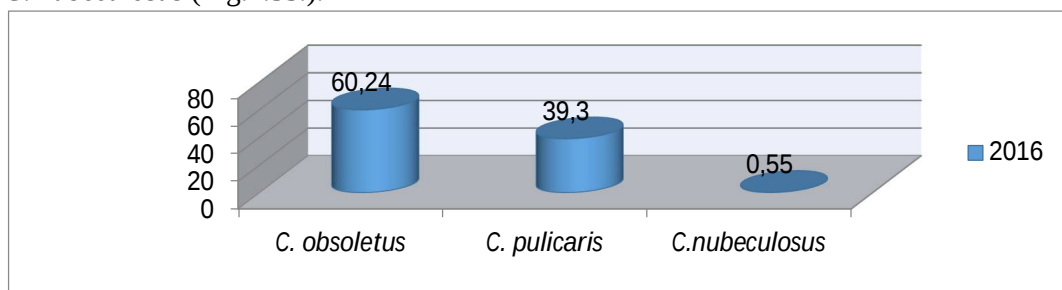


Fig.7.33. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2016, în județul Galați

Fig.7.33. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2016, in Galați

În această perioadă, cea mai activă specie de culicoide a fost *C. pulicaris*, a cărei activitate a fost semnalată din aprilie și până în noiembrie când valorile termice au fost cuprinse între 10°C și 28°C. Adulții de *C. obsoletus* au fost capturați începând cu luna iunie și până în luna august, activitatea lor desfășurându-se la valori termice cuprinse între

14 °C și 28°C. Vectorii *C.nubeculosus* au fost capturați doar în luna iulie, în perioada în care valorile termice au fost cuprinse între 21°C și 28°C (fig.7.34).

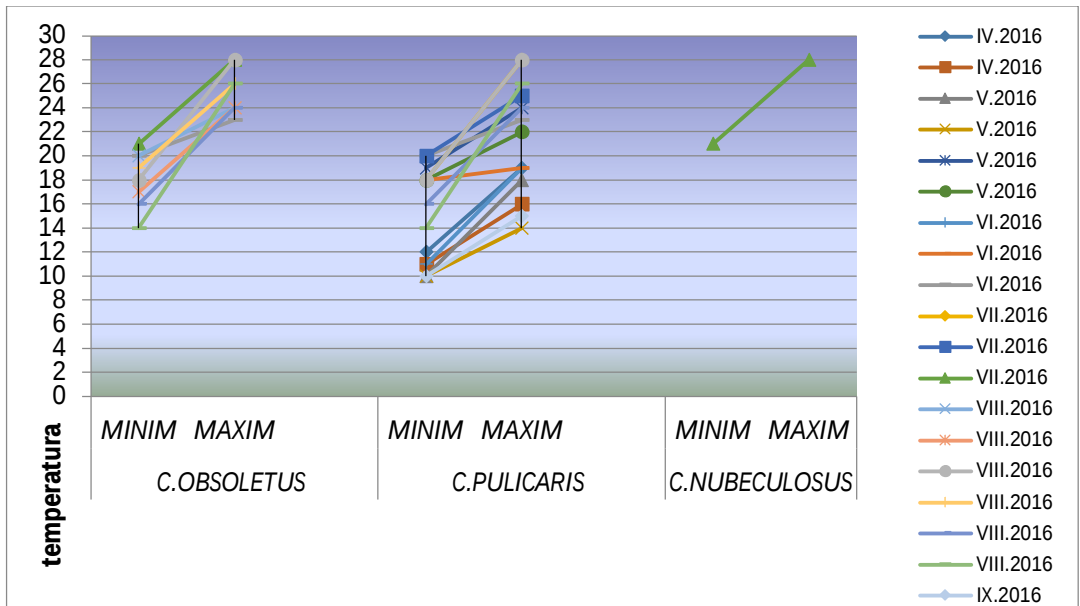


Fig.7.34. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2016, județul Galați

Fig.7.34. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to thermal values in 2016, Galați County

În **anul 2017**, au fost amplasate doar 22 capcane și s-au efectuat 13 capturi, la 6 dintre acestea fiind identificate și insecte culicoide. Toate capcanele au fost amplasate doar în exploatarea non-profesionale din localitățile țintă. Pe parcursul anului au fost capturate 7087 de insecte zburătoare, din care 1050 (14,81%) au fost insecte *Culicoides*. Analiza morfologică a acestor culicoizi a pus în evidență aceleași specii vectoriale întâlnite mai frecvent în această regiune: *C. obsoletus*– 1041 (99,14%) și *C. pulicaris*– 36 (0,85%) (fig. 7.35).

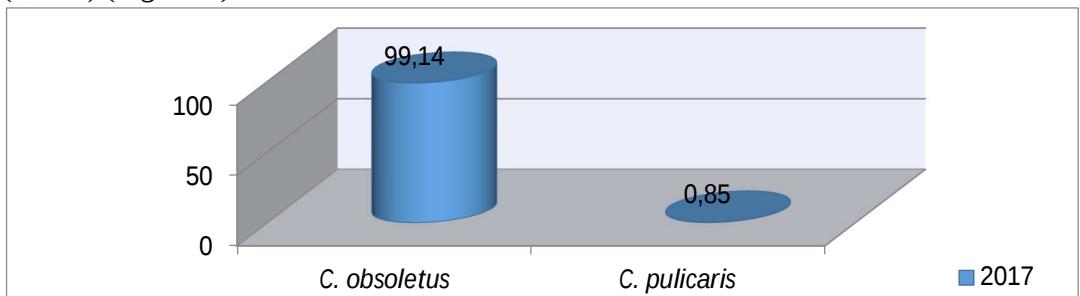


Fig.7.35. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2017, în județul Galați

Fig.7.35. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2017, in Galați county

În anul 2017, culicoidele vectoriale din specia *C.pulicaris* au fost semnalate sporadic în luna mai când valorile termice au fost cuprinse între 13°C și 19°C și după o perioadă de liniște vectorială, au reapărut în perioada august-octombrie când valorile termice au fost cuprinse între 6°C și 28°C.

C.obsoletus a fost semnalat o perioadă mult mai restrânsă de timp desfășurată în lunile iulie -august când valorile termice au fost cuprinse între 11 și 28 °C (fig.7.36).

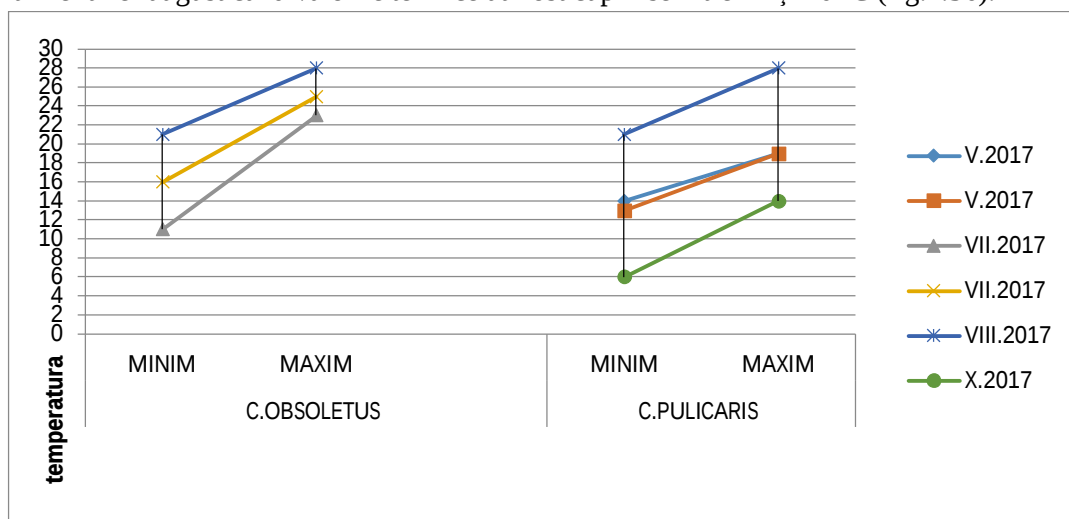


Fig.7.36. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2017, județul Galați

Fig.7.36. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2017, Galați

Comparând rezultatele obținute la supravegherea entomologică anuală, în perioada luată în studiu, s-a constatat creșterea procentuală a densității insectelor culicoide capturate, de la 7,73% (2014) la 14,81% (2017), iar linia de tendință este crescătoare (fig. 7.37).

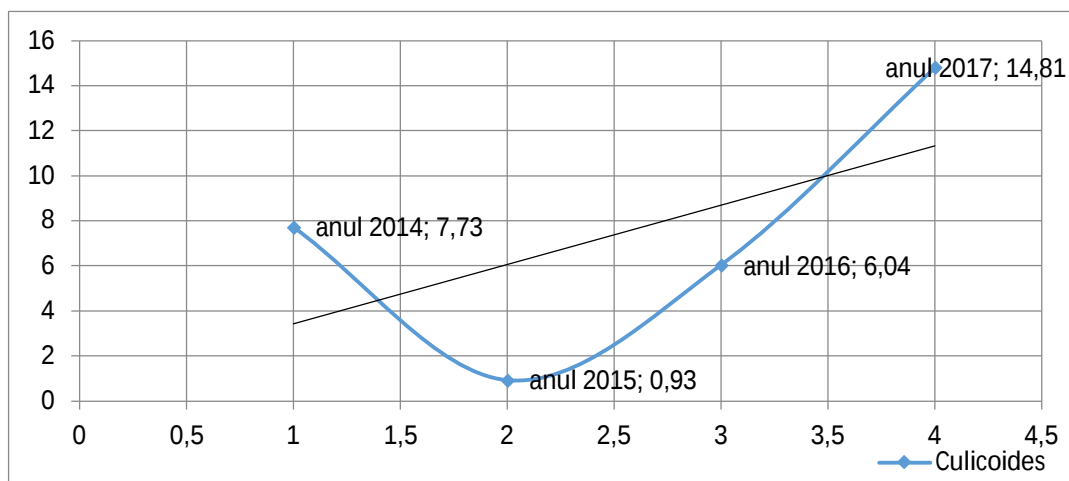


Fig. 7.37. Tendința de creștere lineară a densității speciilor de *Culicoides* în județul Galați

Fig. 7.37. Trend of linear increase of *Culicoides* species density in Galați County

Analiza grafică a incidenței speciilor culicoide vectoriale arată faptul că *C. obsoletus* și *C. pulicaris* sunt constant într-o relație de cohabitare. Cu toate acestea se observă tendința de creștere a incidenței unei specii în defavoarea celeilalte, cu excepția anului 2015, când *C.obsoletus* (60,24%) și *C.pulicaris* (39,2%) au un raport procentual mai apropiat (fig. 7.38).

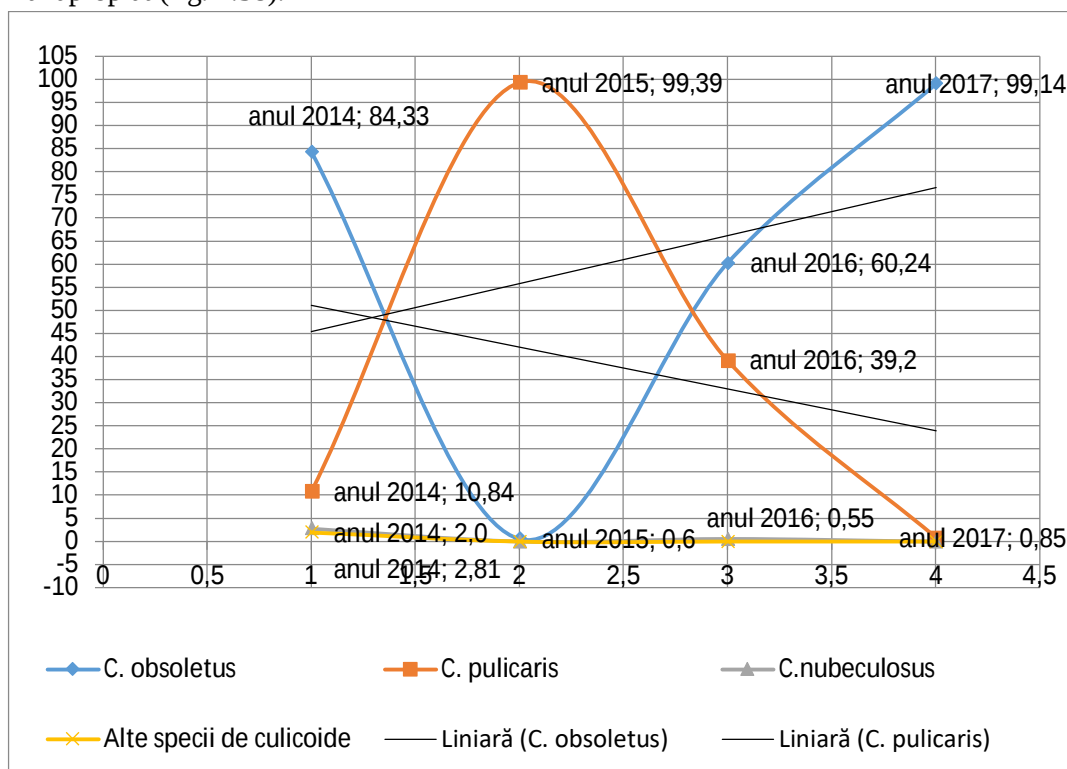


Fig.7.38 Incidența și tendința de evoluție a speciilor de *Culicoides* în perioada 2014-2017, în județul Galați

Fig.7.38 Incidence and evolution trend of *Culicoides* species in 2014-2017, in Galați County

Linia de tendință a incidenței culicoidelor în arealul monitorizat a prezentat fluctuații anuale, repetitive, astfel încât, la sfârșitul perioadei de monitorizare, se previzionează o incidență crescătoare a speciei *C. obsoletus* și descrescătoare pentru *C. pulicaris*.

7.3.3. Concluzii

Investigațiile privind monitorizarea vectorilor transmițători ai virusului *Bluetongue*, au dus la următoarele concluzii:

1. În județul **Galați**, au fost identificate insecte hematofage din complexul *C. obsoletus*, complexul *C.pulicaris*, și *C.nubeculosus*, cu o incidență diferită în funcție de perioadă.

2. În **anul 2014**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **7,73 %** (n=249), dintre acestea 84,33% (n=210) au fost *C. obsoletus*, 10,84% (n=27) au fost *C. pulicaris*, 2,83%(n=7) au fost *C. nubeculosus* și 2,0% (n=5) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată: în luna aprilie, la valori termice cuprinse între 11⁰C și 20⁰C pentru *C. pulicaris* , în luna septembrie la valori termice cuprinse între 17⁰C- 29⁰C pentru *C. obsoletus*, în lunile aprilie și noiembrie la valori termice cuprinse între 3⁰C și 30⁰C pentru *C. nubeculosus*.
3. În **anul 2015**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **0,93** (n=165), iar dintre acestea 99,40% (n=164) au fost *C. pulicaris*, 0,6% (n=1) au fost *C. obsoletus*, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată doar în luna aprilie, la valori termice cuprinse între 5⁰C și 18⁰C pentru *C. obsoletus* și în perioada aprilie-octombrie la valori termice cuprinse între 5⁰C și 33⁰C pentru *C. pulicaris*.
4. În **anul 2016**, incidența insectelor culicoide a fost de **6,04%** (n=732), iar dintre acestea: 60,24%(n=441) au fost *C. obsoletus*, 39,30%(n=287) au fost *C. pulicaris*. și 0,55% (n=4) au fost *C. nubeculosus*, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada aprilie-noiembrie la valori termice cuprinse între 10⁰C și 28⁰C pentru *C. pulicaris*, în perioada iunie-august când valorile termice au fost cuprinse între 14⁰C și 28⁰C pentru *C. obsoletus* și în luna iulie la valori termice cuprinse între 21⁰C și 28⁰C pentru *C. nubeculosus*.
5. În **anul 2017**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **14,81%** (n=1050) iar dintre acestea 99,14% (n=1041) au fost *C. obsoletus* și 0,85% (n=36) au fost *C. pulicaris* iar activitatea vectorială a culicoidelor *C. pulicaris* a fost semnalată în luna mai, când valori termice au fost cuprinse între 13⁰C și 19⁰C. și în perioada august-octombrie când valori termice au fost cuprinse între 6⁰C și 28⁰C, iar *C. obsoletus* și-a desfășurat activitatea vectorială în iulie-august când valorile termice au fost cuprinse între 11 și 28 ⁰C.
6. Analiza statistică arată tendința de creștere a densității culicoidelor în teritoriul județului Galați.
7. *C. obsoletus* și *C. pulicaris* sunt constant într-o relație de cohabitare fiind principalele specii vectoriale prezente constant în județul Galați.

7.4. Supravegherea entomologică în județul Tulcea

Prin poziția sa geografică, înconjurată din trei părți de ape și prin prezența Deltei Dunării, un muzeu viu al biodiversității, cu o climă continental excesivă și precipitații reduse dar cu umiditate atmosferică ridicată în zona Deltei, județul Tulcea este un teritoriu deosebit, care oferă condiții favorabile supraviețuirii și înmulțirii insectelor zburătoare inclusiv pentru speciile de țânțari din complexul *Culicoides*.

7.4.1. Materiale și metode de lucru

Prelevarea probelor a constat în amplasarea de capcane fixe și mobile, în vederea capturării și identificării insectelor culicoide urmate de conservarea acestora.

Capcanele fixe, utilizate pentru capturarea insectelor, au fost amplasate în localitățile cu animale santinelă selectate pentru supravegherea serologică: Măcin, Baia, Nufaru și Sulina, iar capcanele mobile au fost montate în funcție de predicțiile de risc vectorial.

Folosind GPS-ul, toate amplasamentele au fost identificate cu coordonatele geografice: altitudine, latitudine și longitudine (tabelul 7.7, fig. 7.39).

Tabel 7.7./Table 7.7

Coordonatele GPS ale localităților cu capcane fixe și mobile din județul Tulcea
GPS coordinates of localities with fixed and mobile traps in Tulcea County

JUDEȚUL Tulcea	Localitățile țină	Latitudine	Longitudine	Altitudine/ metri
Capcane fixe și mobile	Măcin	45.246853	28.1232296	36
	Baia	44.7275247	28.6593816	10
	Nufăru	45.1466932	28.9036987	7
	Sulina	45.1789296	29.2183294	4
	Jijila	45.2981	28.1527	35
	Turcoaia	45.1735	28.1969	37



Fig. 7.39. Harta cu locațiile capcanelor fixe și mobile, în județul Tulcea
Fig. 7.39. Map with the locations of fixed and mobile traps, in Tulcea county

Modul de amplasare, kitul de colectare precum și tehnicile de prelevare, conservare și examinare au fost descrise la cap.7.1.1.

Analizele de morfologie externă a insectelor culicoide au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Parazitologie din Tulcea.

7.4.2. Rezultate și discuții

În perioada 2014-2017, au fost semnalate și identificate insecte *Culicoides* și implicit speciile vectoriale *C. obsoletus* și *C. pulicaris*.

Atât incidența insectelor culicoide cât și incidența speciilor vectoriale din genul *Culicoides*, a fost diferită de la un an la altul (tabelul 7.8., fig.7.40).

Tabel7.8./Table 7.8.

Situația supravegherii entomologice, în județul Tulcea
The situation of entomological surveillance, in Tulcea county

Tulcea			Specii de <i>Culicoides</i>							
Perioada	Nr capcane	Nr. insecte capturate	Insecte <i>Culicoides</i>		<i>C. obsoletus</i>		<i>C. pulicaris</i>		Alte specii <i>Culicoides</i>	
			nr	%	nr	%	nr	%	nr	%
2014	54	8834	1197	13,54	774	64,66	303	25,30	120	10,02
2015	86	9671	2056	21,25	1466	71,30	270	13,13	320	15,56
2016	82	15203	1865	12,26	1159	62,14	509	27,30	197	10,56
2017	72	11202	1105	9,86	672	60,82	235	21,26	198	17,92

În **anul 2014**, au fost montate 34 de capcane mobile și fixe cu ajutorul cărora s-au efectuat 31 capturi, la 10 dintre acestea fiind identificate și insectele *Culicoides*. Din cele 8834 de insecte zburătoare capturate, 1197 (13,54%) au fost insecte *Culicoides*. Analizând însușirile morfologice ale acestora s-au identificat 774 (64,66%) specimene aparținând complexul *C. obsoletus*, 303 (25,30%) insecte din specia *C. pulicaris* și 120 (10,02%) au aparținut altor specii de culicoide *non-vectoriale*.

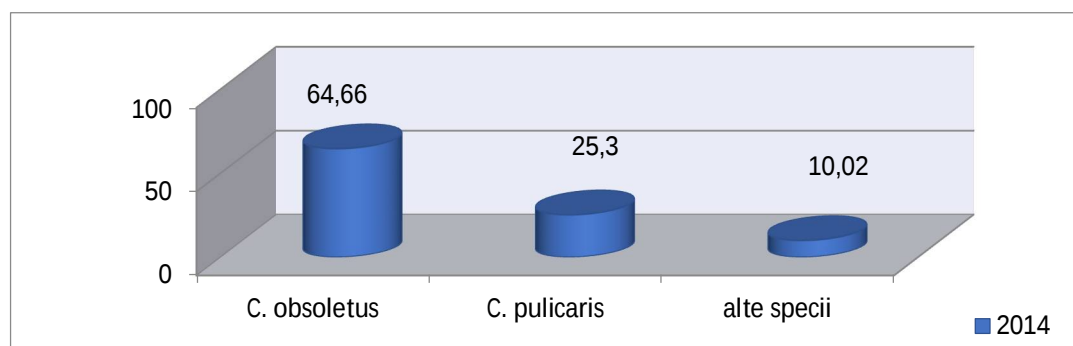


Fig. 7.40. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2014, în județul Tulcea

Fig. 7.40. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2014, in Tulcea County

Ca și în celelalte județe din regiunea de Sud Est și în județul Tulcea, insectele culicoide și-au început activitatea în luna aprilie când limitele termice au fost cuprinse între 10°C și 13°C.

Adulele de *C. obsoletus* au fost identificate în majoritatea colectelor lunare obținute până în luna octombrie, fiind active la un panel termic a căror valori au fost cuprinse între 8°C și 34°C (fig. 7.41).

În majoritatea capturilor s-a constatat prezența exemplarelor de *C. obsoletus* simultan cu *C. pulicaris*.

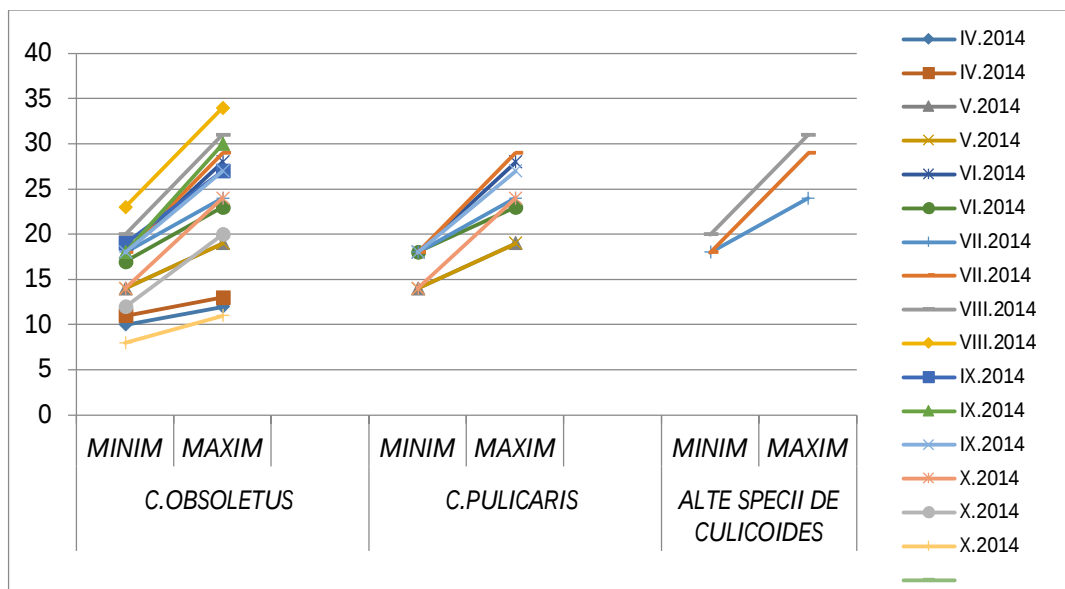


Fig.7.41 Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2014, județul Tulcea

Fig.7.41 Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values from 2014, Tulcea county

C. pulicaris a evoluat în două perioade ale anului. O primă perioadă de activitate a fost cuprinsă între mai și iulie când valorile termice erau cuprinse între 14°C și 29°C, iar a doua perioadă de activitate a fost semnalată în lunile septembrie- octombrie, când valorile termice s-au situat între 18°C și 27°C.

Alte specii *Culicoides* non-vectoriale au fost identificate în capturile din iulie și august, perioadă în care valorile termice au fost cuprinse între 18°C și 31°C.

În anul 2015, au fost montate 86 de capcane mobile și fixe cu ajutorul cărora s-au efectuat 67 capturi, și au fost capturate 9671 de insecte. Dintre acestea, 2056 (21,25%) au fost insecte culicoide, iar pe baza morfologiei externe 1466 (71,30%) specimene au aparținut complexului *C. obsoletus*, 270 (13,13%) au aparținut complexului *C. pulicaris* și 320 (15,56%) au fost alte specii de culicoide (fig.7.42).

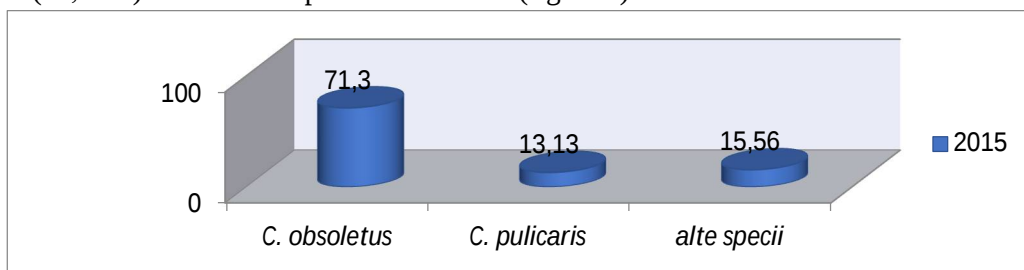


Fig.7.42. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2015, în județul Tulcea

Fig.7.42. Distribution of the *Culicoides* species identified in 2015, in Tulcea county

Pe parcursul anului 2015, activitatea insectelor culicoide a fost semnalată din luna aprilie până în luna noiembrie. Specia vectorială *C. obsoletus* a fost identificată în majoritatea capturilor obținute din luna aprilie și până în luna noiembrie la valori termice cuprinse între 7°C și 34°C (fig.7.43).

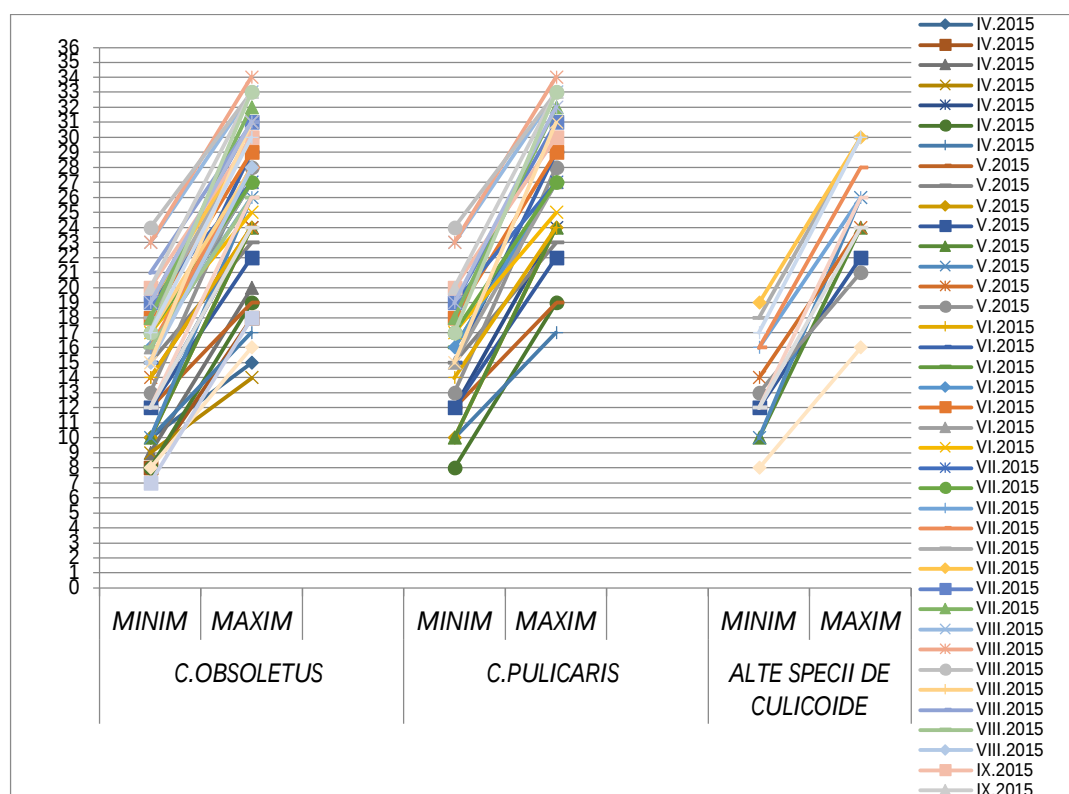


Fig.7.43 Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2015, județul Tulcea

Fig.7.43 Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values from 2015, Tulcea county

Specia *C. pulicaris*, a evoluat alături de *C. obsoletus*, din aprilie și până în septembrie, fiind semnalată în perioadele în care valorile termice de la apus și răsărit au fost cuprinse între 8°C și 34°C.

În această perioadă s-au suprapus și alte specii de *Culicoides* non-vectoriale a căror prezență a fost semnalată la temperaturi termice cuprinse între 8°C și 30°C.

În anul 2016, au fost utilizate 82 de capcane cu care s-au efectuat 61 capturi, la 19 dintre ele fiind identificate și insecte *Culicoides*. Din cele 15203 insecte capturate, 1865 (12,26%) au fost insecte *Culicoides*. Pe baza morfologiei externe, 1159 (62,14%) specimene au fost încadrate în complexul *C. obsoletus*, 509 (27,30%) specimene au aparținut speciei *C. pulicaris* și 197 (10,56%) au fost alte specii de culicoide non vectoriale (fig.7.44).

Analizând profilul termic la care s-au capturat culicoizii, s-a constatat că în anul 2016, *C. obsoletus* și-a început activitatea în luna mai când valorile termice au fost cuprinse între 8°C și 25°C. Femelele hematofage au fost capturate în fiecare lună până în octombrie, arătând că s-au adaptat foarte bine la diferite plaje termice cuprinse între 8°C și 34°C.

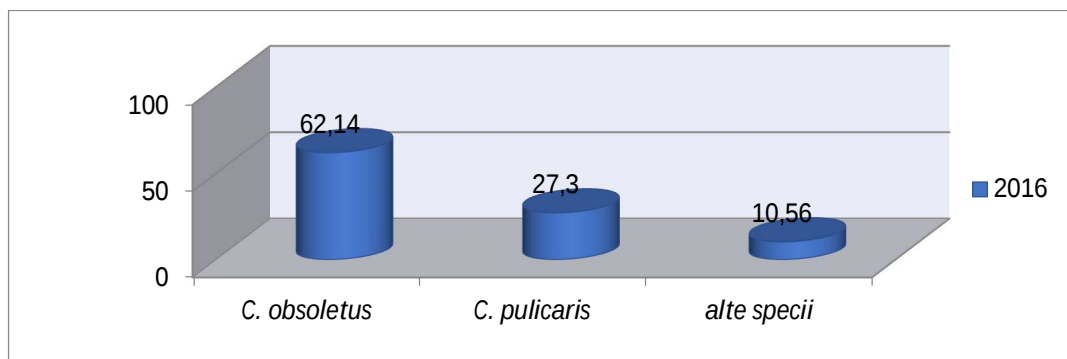


Fig.7.44. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2016, în județul Tulcea

Fig.7.44. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2016, in Tulcea county

Specimenele *C. pulicaris* au fost semnalate începând cu sfârșitul lunii mai și până în septembrie, supraviețuind la valori termice cuprinse între 12°C și 34°C. În aceeași perioadă de timp, începând cu luna iunie și până în luna august, au fost semnalate și alte specii de culicoide non-vectoriale (fig.7.45).

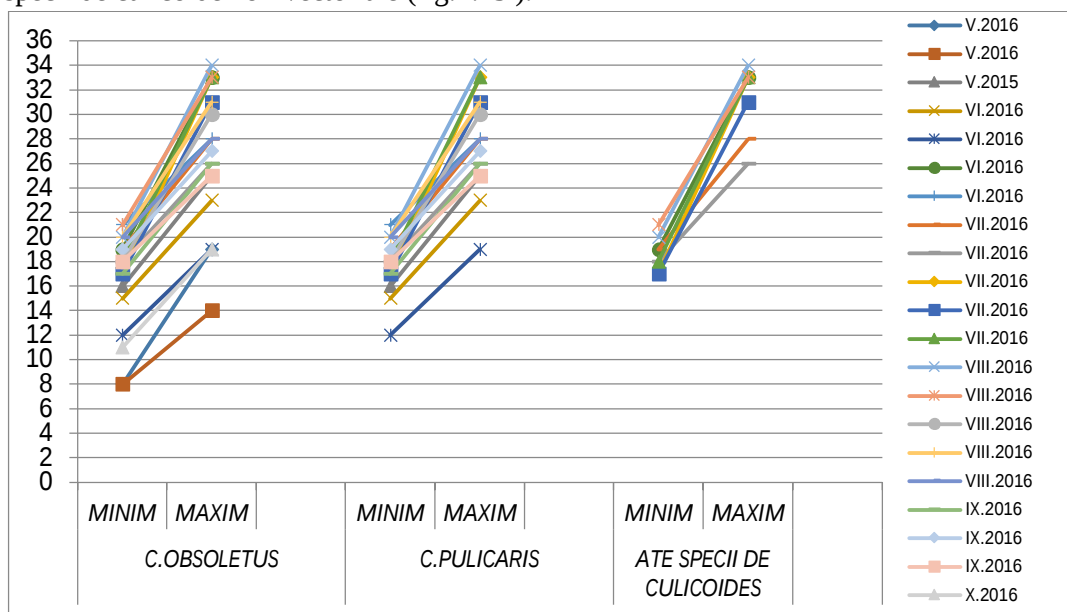


Fig.7.45. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2016, județul Tulcea

Fig.7.45. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2016, Tulcea County

În anul 2017, s-au utilizat 72 de capcane și s-au efectuat 63 capturi, la 22 dintre ele fiind identificate și insecte *Culicoides*. Din cele 11202 insecte zburătoare capturate, 1105 (9,86%) au fost insecte *Culicoides*. Analiza morfologiei externe, a dus la identificarea a 672 (60,82%) specimene din complexul *C. obsoletus*, 235(21,26%) *C. pulicaris* și 198(17,92%) de alte specii culicoide non-vectoriale (fig.7.46).

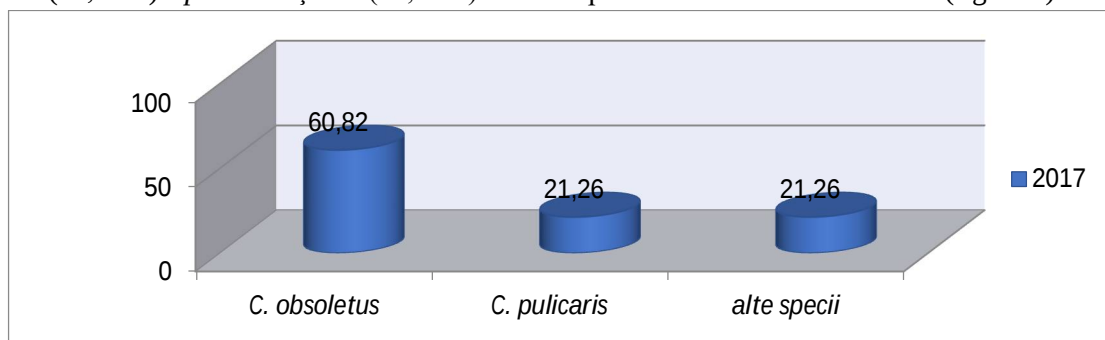


Fig.7.46. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* identificate în anul 2017, în județul Tulcea

Fig.7.46. Graphical distribution of *Culicoides* species identified in 2017, in Tulcea county

În anul 2017, incidența culicoizilor a fost mult mai redusă (9,86%) comparativ cu anii anteriori (tabelul 7.7.), iar activitatea nocturnă a acestor insecte a fost semnalată începând cu luna mai până în luna octombrie, când valorile termice au fost cuprinse între 10°C și 35°C pentru *C. obsoletus* și între 12°C și 35°C pentru *C. pulicaris*. Simultan, în perioada mai-iulie când valorile termice au fost cuprinse între 12°C și 29°C s-au semnalat și celelalte specii de culicoizi non-vectoriali (fig. 7.47).

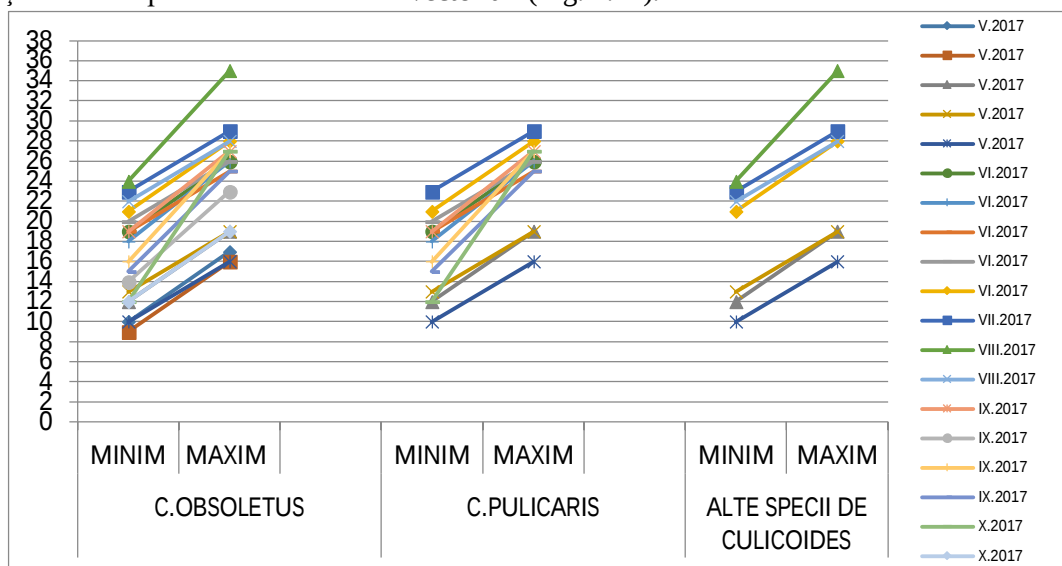


Fig.7.47. Distribuția grafică a speciilor de *Culicoides* în raport cu valorile termice din anul 2017, județul Tulcea

Fig.7.47. Graphical distribution of *Culicoides* species in relation to the thermal values of 2017, Tulcea county

Comparând rezultatele obținute în județul Tulcea, la supravegherea entomologică anuală, s-a constatat o descreștere a ponderei densității insectelor culicoide capturate, de la 13,54% (2014), la 21,25% (2015), până la 12,26% (2016) și la 9,86% în 2017, (fig. 7.37).

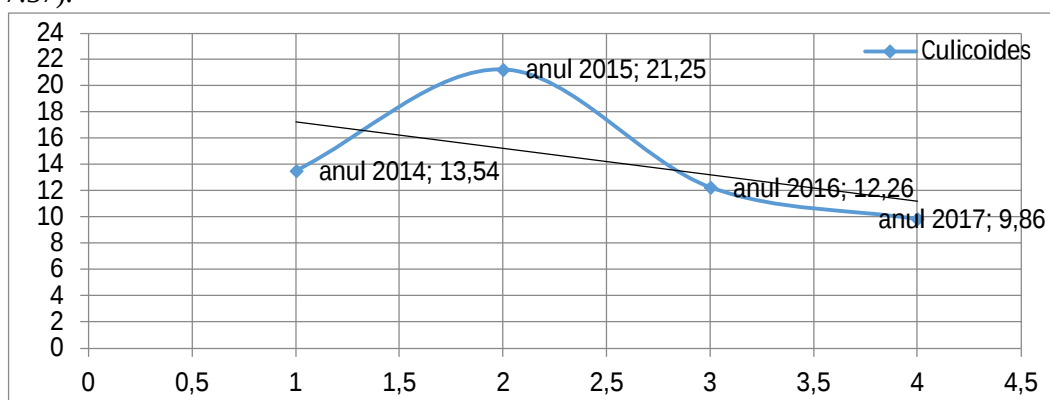


Fig. 7.37. Tendința de descreștere lineară a densității speciilor de *Culicoides* în județul Tulcea

Fig. 7.37. Trend of linear decrease in *Culicoides* species density in Tulcea County

Analizând incidenței speciilor culicoide vectoriale reiese faptul că *C. obsoletus* și *C. pulicaris* coabitează în același areal, iar curbele de incidență arată că activitatea celor două specii vectoriale nu se influențează reciproc. Analiza statistică a incidenței speciei *C. obsoletus* a generat o linie de tendință moderat descrescătoare în timp ce, pentru specia *C. pulicaris* și celelalte specii culicoide, liniile de tendință sunt în ușoară creștere în teritoriul județului Tulcea (fig. 7.38).

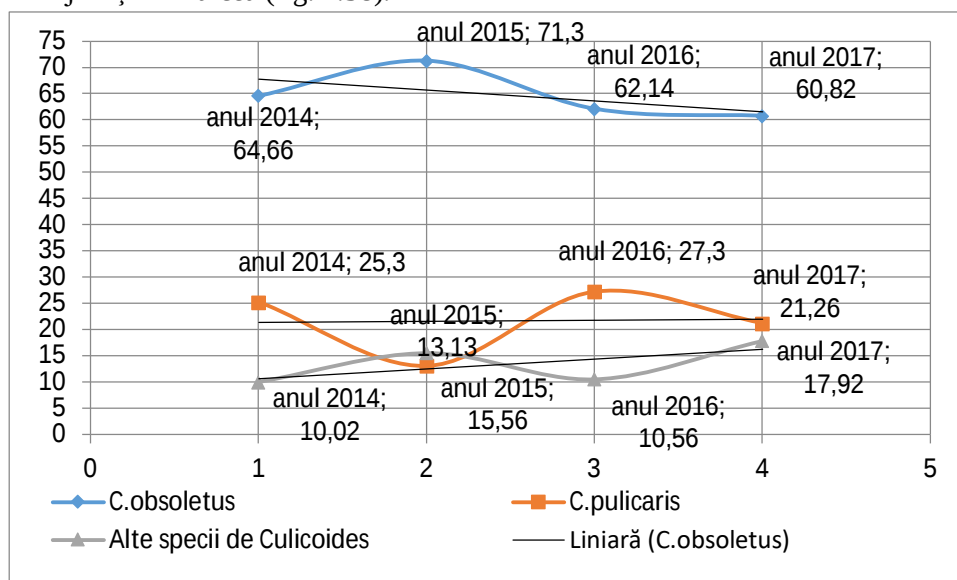


Fig.7.38 Incidența și tendința de evoluție a speciilor de *Culicoides* în perioada 2014-2017, în județul Tulcea

Fig.7.38 The incidence and evolution trend of *Culicoides* species in the period 2014-2017, in Tulcea County

În România, modelul sezonier anual al culicoidelor vectoriale începe în luna mai și încetează în septembrie, fiind direct influențat de climat, specificitatea biologică a speciilor, locurile de înmulțire și disponibilitatea gazdelor (Versteirt ș.a., 2017). Analiza datelor obținute în studiu efectuat arată o extindere a perioadei de activitate a culicoidelor *C. obsoletus* și *C. pulicaris*, prezența lor fiind semnalată încă din luna aprilie (2014, 2015) și până în luna octombrie (2015, 2017).

7.4.3. Concluzii

Investigațiile privind monitorizarea vectorilor transmitători ai virusului *Bluetongue*, au dus la următoarele concluzii:

8. În județul **Tulcea**, au fost identificate insecte hematofage din complexul *C. obsoletus*, *C. pulicaris* considerate vectori pentru transmiterea bolii limbii albastre.
9. În **anul 2014**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **13,54 %** (n=1197), dintre acestea 64,66% (n=774) au fost *C. obsoletus*, 25,30% (n=303) au fost *C. pulicaris* și 10,2% (n=120) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată: în luna aprilie până în octombrie, la valori termice cuprinse între 8°C și 34°C pentru *C. obsoletus*, în perioada mai iulie și septembrie-octombrie când valori termice au fost cuprinse între 14°C- 29°C pentru *C. pulicaris*.
10. În **anul 2015**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **21,25** (n=2056), dintre acestea 71,30% (n=1466) au fost *C. obsoletus*, 13,13% (n=270) au fost *C. obsoletus* și 15,56% (n=320) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada aprilie-noiembrie, la valori termice cuprinse între 7°C și 34°C pentru *C. obsoletus* și în perioada aprilie-septembrie la valori termice cuprinse între 8°C și 34°C pentru *C. pulicaris*.
11. În **anul 2016**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **12,26%** (n=1865), dintre acestea: 62,14% (n=1159) au fost *C. obsoletus*, 27,30% (n=509) au fost *C. pulicaris* și 10,56% (n=197) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor a fost semnalată în perioada mai-octombrie la valori termice cuprinse între 8°C -34°C pentru *C. obsoletus*, în perioada mai-septembrie, când valorile termice au fost cuprinse între 12°C și 34°C pentru *C. pulicaris*.
12. În **anul 2017**, incidența insectelor *Culicoides* a fost de **9,86%** (n=1105), dintre acestea 60,82% (n=672) au fost *C. obsoletus*, 21,26% (n=235) au fost *C. pulicaris* și 17,92% (n=198) au fost specii de *Culicoides* „non-vectoriale”, iar activitatea vectorială a culicoidelor *C. obsoletus* a fost semnalată în luna mai-octombrie când valori termice au fost cuprinse între 10°C-35°C și 12°C - 35°C pentru *C. pulicaris*.

13. Analiza statistică efectuată pentru perioada 2014-2017, arată tendința de descreștere a densității culicoidelor în teritoriul județului Tulcea.
14. Condițiile topo-geo-climatice ale județului Tulcea sunt favorizante pentru apariția unor noi specii vectoriale din genul *Culicoides*.

7.5. Analiza comparată a situației entomologice în județele din Sud-Est a României

Investigațiile efectuate în vederea evaluării situației entomologice, au dovedit existența insectelor culicoide, în județele Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea încă din anul 2014, an reprezentativ pentru epidemiologia *Bluetongue* în România.

7.5.1. Materiale și metodă de lucru

Pentru analiza comparată a situației entomologice din județele Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea, datele obținute au fost ordonate și grupate în tabele centralizatoare și tabele comparative.

Toate tabelele comparative au avut același număr de caracteristici (anul și județul) la care s-au raportat valorile procentuale ale incidenței diferitelor specii de *Culicoides*. Incidența este un indicator de frecvență cu ajutorul căruia s-a calculat numărul de insecte *Culicoides* care au apărut într-un teritoriu, raportat anual (Savuța, 2007).

Pentru a obține distribuțiile de incidență rezultatele au fost corelate în funcție de specia de *Culicoides*, arealul și perioada de monitorizare a acestor specii.

Variabilele cantitative (numărul de culicoizi și ponderea) au fost exprimate în ani (2014, 2015, 2016, 2017) și perioadă/intervale de timp (2014-2017).

Pentru a identifica tendința de evoluție a speciilor de *Culicoides* pe modelul grafic au fost generate liniile de tendință polinomială. Linie de tendință polinomială se utilizează atunci când există fluctuații mari de date și se pot obține curbele de creștere și descreștere valorică.

7.5.2. Rezultate și discuții

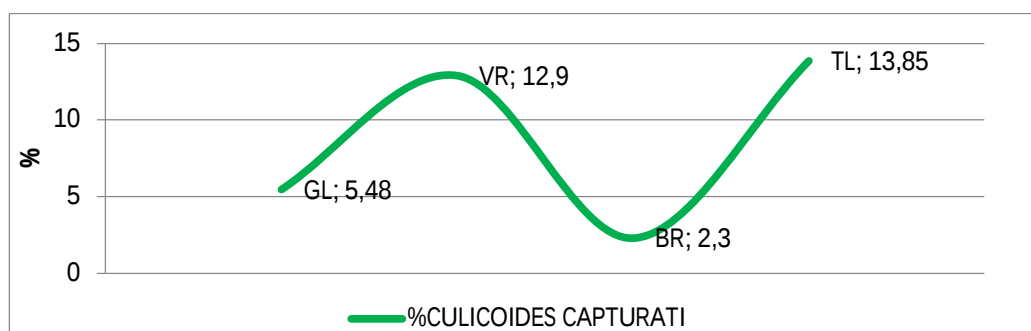
Din analiza datelor obținute se observă că populația de insecte culicoide a variat de la un județ la altul iar prevalența a fost influențată de arealul geografic (tabelul 7.9).

Genul *Culicoides*, include multe specii vectoriale precum: *C. chioperus*, *C. scoticus*, *C. imicola*, *C. devulfi*, *Culicoides lupicaris*, *Culicoides punctatus*, *Culicoides newsteadi*, *C. pulicaris*, *C. obsoletus*, etc., cu rol vectorial în transmiterea *Bluetongue* în Europa (Paslaru ș.a., 2018, Mot ș.a., 2018). Studiul efectuat în județele Galați, Vrancea Brăila și Tulcea a evidențiat doar speciile vectoriale *C. obsoletus* și *C. pulicaris*, iar dintre speciile non-vectoriale *C. nubeculosus*.

Prevalența insectelor culicoide în perioada 2014-2017
The incidence of culicoid insects in 2014-2017

	Nr. insecte capturate	Insecte									
		<i>Culicoides</i>		<i>C. obsoletus</i>		<i>C. pulicaris</i>		<i>C. nubeculosus</i>		alte specii	
		nr	%	nr	%	nr	%	nr.	%	nr	%
GL	40013	2196	5,48	1693	77,09	514	23,4	11	0,5	5	0,22
VR	15208	1963	12,9	1338	68,16	625	31,83	0	0	0	0
BR	61314	1405	2,30	389	27,68	944	67,18	15	1,06	57	4,05
TL	44910	6223	13,85	4071	65,41	1317	21,16	0	0	835	13,41

Analiza incidenței vectoriale, raportată la numărul de insecte capturate în toată perioada luată în studiu (2014-2017), a arătat că Tulcea a fost teritoriul cu cea mai mare densitate de insecte culicoide (13,85%), urmată de Vrancea (12,9%) și Galați (5,48%). În mod surprinzător, deși județul Brăila are o topografie asemănătoare cu cea a județului Galați, densitatea vectorilor culicoizi a fost mult mai redusă (2,3%) (fig. 7.39).



(GL-Galați, VR-Vrancea; BR- Brăila; TL-Tulcea)

Fig. 7.39 Reprezentarea grafică comparativă a densității insectelor *Culicoides*, în perioada 2014-2017

Fig. 7.39 Comparative graphical representation of the density of *Culicoides* insects in the period 2014-2017

Din fig.7.40.reiese că *C. obsoletus* a fost prezent într-o pondere ce a variat de la 77,09% (Galați), la 65,41% (Tulcea), la 68,16% (Vrancea) și la 27,68% în Brăila. Această prevalență ridicată arată că *C. obsoletus* a avut o capacitate mai mare de adaptare la condițiile climatice din regiunea de Sud-Est. Incidența speciei *C. pulicaris* a fost mult mai redusă, variind între 21,16% (Tulcea), 23,4% (Galați), 31,83% (Vrancea) și 67,18% (Brăila). *C. nubeculosus* a fost nesemnificativ din punct de vedere al incidenței (0,50%) în județul Galați și județul Brăila (1,06%) și nu au fost identificate în celelalte județe luate în studiu. De asemenea, a reieșit că, județele Galați (0,22%) și Brăila (4,05%) oferă condiții favorizante pentru apariția și supraviețuirea altor specii culicoide, considerate până la acest moment, fără risc vectorial.

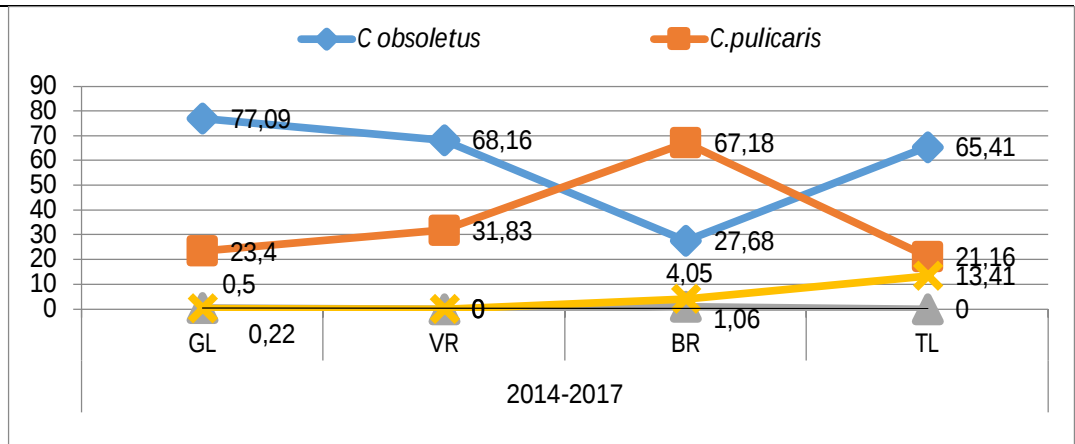


Fig. 7.40. Reprezentarea grafică comparativă a incidenței speciilor *Culicoides* în perioada 2014-2017

Fig. 7.40. Comparative graphical representation of the incidence of *Culicoides* species in the period 2014-2017

Nomograma de distribuție vectorială realizată pe baza incidenței anuale comparative în teritoriu, arată variabilitatea acestor specii vectoriale în regiunea de Sud-Est (fig.7.41).

Pe parcursul celor patru ani de monitorizare, cele două specii culicoide au supraviețuit în același areal, iar incidența lor s-a modificat, cel mai probabil ca urmare a factorilor de mediu anuali: variații mari de temperatura, perioade lungi de umiditate sau de secetă, etc.

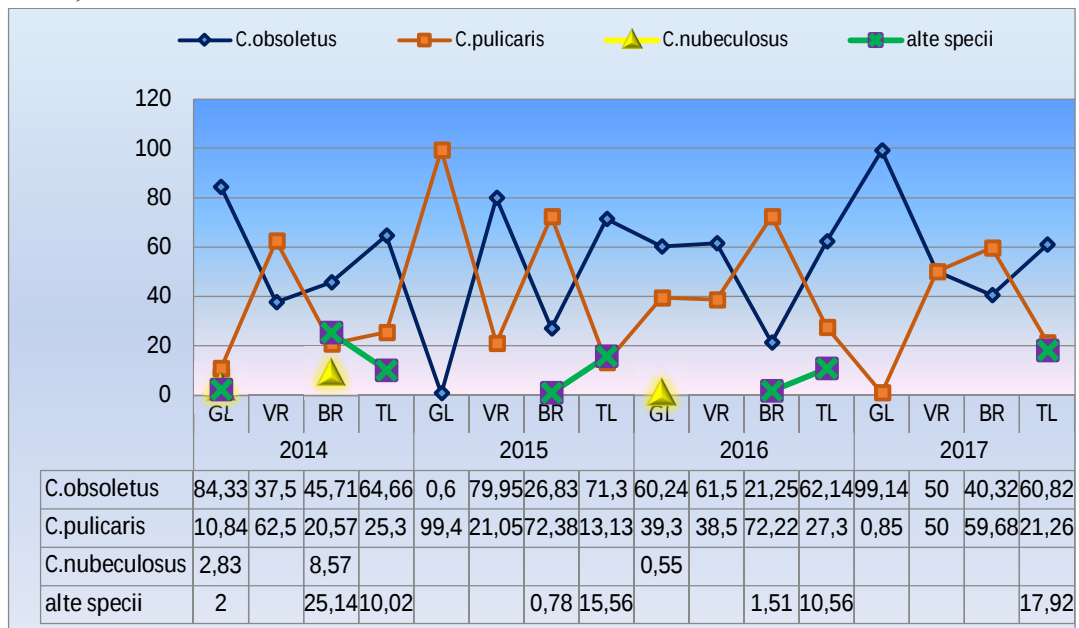


Fig. 7.41. Nomograma de distribuție anuală și evoluție a celor mai importante specii vectoriale: *Culicoides obsoletus* și *Culicoides pulicaris*, în arealul studiat

Fig. 7.41. Annual distribution nomogram and evolution of the most important vector species: *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris*, in the studied area

Din analiza statistică a datelor prezentate în nomograma de distribuție anuală, a reieșit faptul în perioada 2014-2017, linia de previziune polinomială pentru specia *C. obsoletus* în regiunea de Sud Est a României a fost ușor crescătoare, ceea ce presupune menținerea sau creșterea în mod unitar a densității acestora în regiune (fig.7.42).

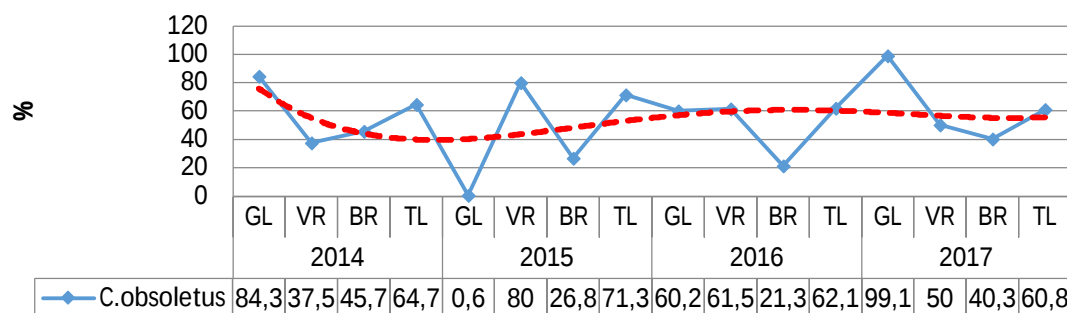


Fig. 7.43. Tendința polinomială și de previziune a speciei *C. obsoletus*, în regiunea Sud-Est a României, 2014-2017

Fig. 7.43. The polynomial and forecast trend of the species *C. obsoletus*, in the South-East region of Romania, 2014-2017

Pentru specia *C. pulicaris*, linia de previziune polinomială este în ușoară descreștere dar care nu previzualizează incapacitatea de adaptare și posibila dispariție a acestei specii vectoriale în regiunea de Sud-Est a României (fig.7.44).

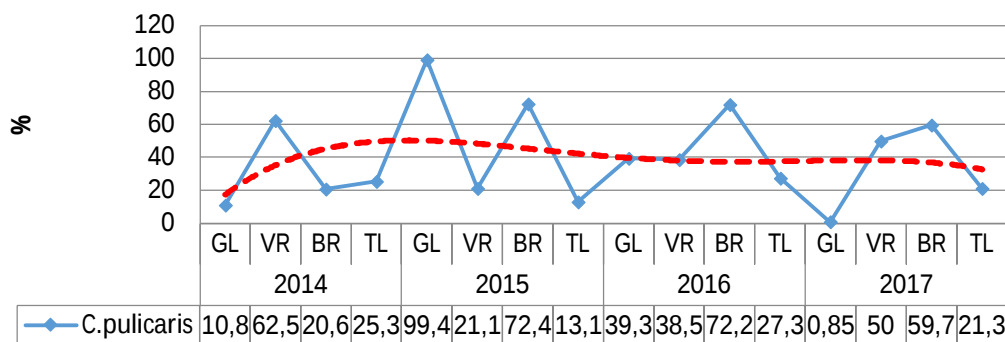


Fig.7.44 Tendința polinomială și de previziune a speciei *C. pulicaris*, în regiunea Sud-Est a României, 2014-2017

Fig.7.44 The polynomial and forecast trend of the species *C. pulicaris*, in the South-East region of Romania, 2014-2017

În ce privește specia *C. nubeculosus*, prezența sa sporadică în cei patru ani de monitorizare a generat statistic o linie de previziune polinomială în continuă descreștere și prin urmare este posibil ca, condițiile topo-geo-climaterice ale regiunii să nu fie prielnice înmulțirii acestei specii de *Culicoides* (fig.7.45).

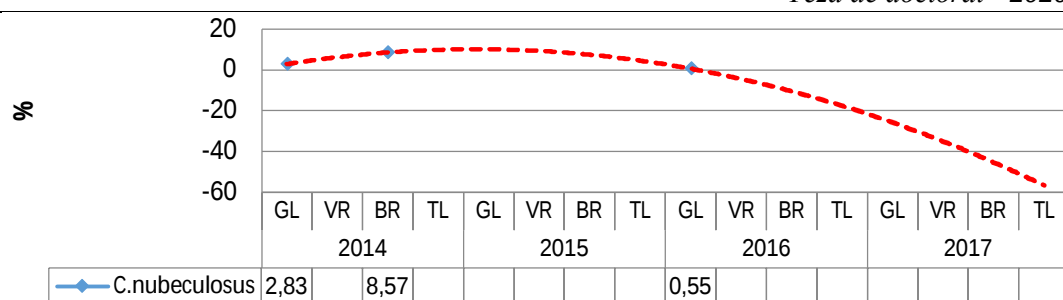


Fig. 7.45. Tendința polinomială și de previziune a speciei *C. nubeculosus*, în regiunea Sud-Est a României, 2014-2017

Fig. 7.45. The polynomial and forecast trend of the species *C. nubeculosus*, in the South-East region of Romania, 2014-2017

În perioada 2014-2017, au fost observate și alte specii de *Culicoides*, care au fost considerate specii non-vectoriale. Prezența lor a fost sporadică în județele Galați (2014), Brăila (2014-2016) și Tulcea (2014-2017). Analiza statistică a datelor obținute arată tendința crescătoare a incidenței acestor specii doar în județul Tulcea (fig.7.46).

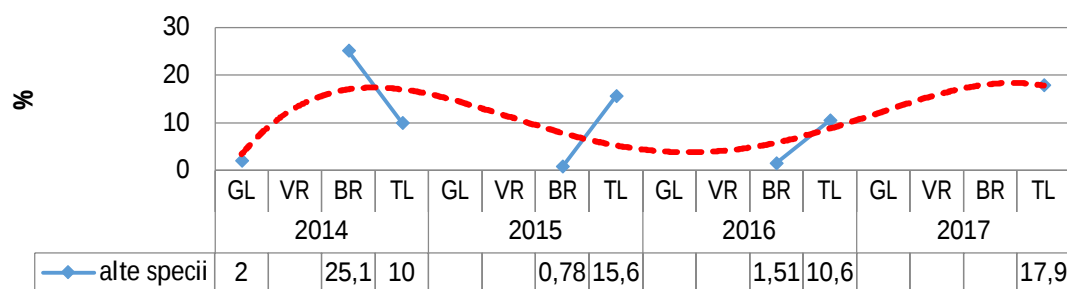


Fig.7.46. Tendința polinomială și de previziune a speciilor non vectoriale, în regiunea Sud-Est a României, 2014-2017

Fig.7.46. The polynomial and forecast trend of non-vector species, in the South-East region of Romania, 2014-2017

Prezența și creșterea incidenței speciilor *Culicoides non-* vectoriale, în condițiile climatice aflate în continuă și rapidă schimbare, arată probabilitatea crescută a apariției și adaptării la condițiile locale a altor specii de culicoide potențial vectoriale care nu au mai fost semnalate în zona de Sud-Est a Europei. Specia *C. imicola* evoluează în jurul bazinului mediteranean și în Franța (țară cu climă temperat continentală). Prin urmare, și-ar putea extinde cu ușurință arealul pe teritoriul României, unde efectele încălzirii globale se resimt în mod accentuat.

Oscilațiile densității culicoidelor în județele din regiunea monitorizată, s-ar putea datorita tipului de capcane utilizate. În România ca și la nivel mondial, sunt recomandate pentru supravegherea entomologică, capcanele luminoase. Emily G. McDermott și col. (2015) au identificat niveluri foarte ridicate de virusuri la nivelul ochilor și țesuturilor nervoase, ceea ce ar putea duce la alterarea vederii și modificarea percepției față de lumină. Deși nu s-a dovedit cu exactitate comportamentul culicoidelor

afectate de virusul *Bluetongue*, totuși, ipoteza este o supoziție plauzibilă care ar putea influența realitatea vectorială.

Conform literaturii de specialitate, insectele culicoide din complexul *C. obsoletus* au densitatea cea mai mare în zonele cu climă complet umedă ale Europei Centrale și de Nord (Peters ș.a., 2011), iar *C.pulicaris* predomină în zonele temperate cu veri calde și secetoase asemănătoare celor din Spania de Nord, Portugalia, Grecia și Italia continentală (Katharina Brugger ș.a. 2013). Având în vedere rezultatele obținute, putem afirma faptul că în regiunea de Sud-Est se întâlnesc condițiile climaterice complexe care au privilegiat supraviețuirea acestor culicoide vectoriale. Prin urmare specia cea mai bine adaptată în regiunea de Sud-Est a fost *C.obsoletus*.

C.pulicaris, a avut o prevalență variabilă dar semnificativă în toată regiunea de Sud-Est. Din analiza generală reiese că această specie, s-a adaptat cel mai bine la condițiile geo-climaterice ale județului Vrancea. Aceste rezultate arată că ouăle și larvele de *C.pulicaris* rezistă mai bine în zonele cu valori termice mai scăzute, aspect menționat și în literatura de specialitate (Dzhafarov, 1964).

În general, boala evoluează endemic în regiunile tropicale unde insectele sunt active pe tot parcursul anului, iar în zonele temperate similare celor din România, boala poate să apară spre sfârșitul verii, când crește densitatea acestor insecte vectoriale. În cazul în care, iernile sunt blânde, vectorii care nu sunt distruși de îngheț și frig pot supraviețui într-un număr suficient de mare pentru a putea constitui un rezervor de boală, căldura având un rol important în creșterea ratei de infecție și replicarea virusului în vector. Temperatura mediului înconjurător este factorul principal care poate influența creșterea, dezvoltarea și răspândirea culicoizilor în zonele cu valori termice mai scăzute (Denison și Mellor, 2007).

Prezența acestor insecte vectoriale în regiune, semnalează riscul major de reapariție a bolii *Bluetongue*, atunci când în arealul unde supraviețuiesc, există animale infectate cu virusul *Bluetongue*. Simpla prezența a acestor culicoide, fără a exista virusuri circulante la animalele receptive, nu prezintă interes epidemiologic major întrucât riscul apariției bolii este unul redus. Cu toate acestea, există studii care au reușit experimental să demonstreze rolul altor insecte hematofage în transmiterea virusului. Această suspiciune a fost consecința activării unor focare de *Bluetongue*, după o lungă perioadă de timp, cu mult mai mare decât perioada maximă de supraviețuire a culicoizilor, și la valori termice scăzute care nu au permis replicarea virusurilor în vectorii culicoizi posibil supraviețuitori (Estrada-Pena ș.a., 2004). Ca urmare, s-au formulat ipotezele privind persistența virusului în lunile de iarnă fără ca acesta să fie detectat sau posibilitatea ca acest virus *Bluetongue* să fie transmis de la alte insecte hematofage. În acest context, Bouwknegt Chantal ș.a.(2010), a demonstrat experimental, capacitatea de supraviețuire a virusul BTV8 la patru specii de căpușe: *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*, *Dermocentor reticulatus* și *R. bursa* care, pentru hrănire, folosesc o gamă largă de gazde, inclusiv bovinele, ovinele și caprinele (Estrada-Pena ș.a., 2004).

Regiunea de Sud-Est a României este mult mai aproape de zona Balcanică, acolo unde, de-alungul timpului boala a evoluat epidemic, această regiune fiind considerată și în

prezent zona cu risc major atât prin prezența culicoidelor cât și prin prezența animalelor contaminate cu virusul *Bluetongue*.

În ultima perioada, datorită schimbărilor climatice, în România și în mod special Sudul și Sud-Estul țării, s-au înregistrat temperaturi ale mediului înconjurător extrem de favorabile înmulțirii și supraviețuirii culicoizilor de-a lungul întregului an, transformând aceste regiuni în zone cu focalitate naturală care trebuie supravegheate corespunzător. Fenomenul de încălzire globală a condus la creșterea temperaturilor multianuale și la extinderea arealului ce oferă condiții optime de viață insectelor culicoide dincolo de 40° latitudine nordică, depășind chiar bariera celor 50° latitudine nordică, fiind semnalată prezența acestor insecte până la 55° latitudine nordică. Raportul de Evaluare al IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), publicat în 2007 descrie o tranziție accelerată către încălzirea globală, marcată de situații mai frecvente cu temperaturi extreme, inclusiv valuri de căldură, agravarea secetei în unele regiuni, precipitații mai abundente în alte regiuni, topirea ghețarilor și a gheții arctice, precum și creșterea globală a nivelului mediu al mărilor și oceanelor. Conform acestui raport, temperatura medie globală a aerului a crescut cu aproximativ 0,74°C în ultimii 100 de ani (1906 -2005) față de 0,6 °C pe perioada 1901-2000 (Raport IPCC, 2001, Analiza de risc *Bluetongue*, 2014). România, are extremitățile pe axa Nordului la o altitudine cuprinsă între 48°15'06" și 43°37'07" (<http://ro-geo.ro/romania-date-generale>). Ca urmare, insectele culicoide vectoriale s-au propagat atât în Sud Estul României cât și în celelalte regiuni și din analiza procentuală a densității acestor populații în cei patru ani de monitorizare, a reieșit acest caracter de focalitate naturală.

Județele monitorizate dețin forme variate de relief atât din punct de vedere al altitudinii cât și al formei, cu numeroase rezervații naturale unde flora și fauna crează habitate complexe pentru supraviețuirea și înmulțirea acestor insecte vectoriale. În acest context, animalele sălbatice și receptive la virusul *Bluetongue* și relația strânsă dintre acestea și insectele vectoriale constituie un alt factor de risc care poate explica persistența virusului în regiune.

7.5.3. Concluzii

Din analiza comparată a situației entomologice, s-au desprins următoarele concluzii:

1. În anul 2014, când a fost semnalat primul focar de *Bluetongue* în România, insectele culicoide au fost prezente în toată regiunea de Sud-Est a României.
2. Speciile vectoriale *Culicoides obsoletus* și *Culicoides pulicaris* au evoluat simultan în fiecare dintre județele monitorizate.
3. Analiza incidenței vectoriale, raportată la numărul de insecte capturate în toată perioada luată în studiu (2014-2017), a arătat că Tulcea a fost teritoriul cu cea mai mare densitate de insecte culicoide (13,85%), urmată de Vrancea (12,9%), Galați (5,48%) și Brăila (2,3%).

4. Variațiile incidenței culicoidale pot fi consecința factorilor de mediu anuali: variații mari de temperatura, perioade lungi de umiditate sau de secetă.
5. În perioada 2014-2017, linia de previziune statistică pentru *C. obsoletus* a fost cu tendință crescătoare, ceea ce presupune menținerea sau creșterea în mod unitar a densității acestora în regiunea de Sud-Est a României.
6. În perioada 2014-2017, linia de previziune statistică pentru *C. pulicaris* a fost cu tendință ușor descrescătoare, dar care nu previzualizează incapacitatea de adaptare și posibila dispariție a acestora.
7. În perioada 2014-2017, linia de previziune statistică pentru *C. nubeculosus* a fost cu tendință continuă descrescătoare ceea ce presupune că, condițiile topo-geo-climaterice ale regiunii, nu au fost prielnice înmulțirii acestei specii de culicoide.
8. Fenomenul de încălzire globală a condus la creșterea temperaturilor multianuale și la extinderea arealului culicoizilor în România, iar condițiile topo-geo-climaterice din județele Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea oferă regiunii caracterul de focalitate naturală.

CAPITOLUL VIII

CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI

Cercetările epidemiologice efectuate în perioada 2014-2017, privind Boala limbii albastre (*Bluetongue*) la rumegătoarele domestice din regiunea de Sud-Est, au dus la desprinderea următoarelor concluzii:

1. Strategia de monitorizare serologică, virusologică și entomologică în *Bluetongue*, a fost aplicată în mod diferit, în funcție de situația epidemiologică anuală din fiecare județ luat în studiu.

2. În perioada 2014-2017, au fost testate 12846 probe de ser, din care: 3052 probe de ser prelevate de la 2342 bovine și 180 caprine din județul Galați, 2778 probe de ser obținute de la 1666 bovine, 946 ovine și 4 caprine din județul Vrancea, 2388 probe de seruri, prelevate de la 2306 bovine, 36 ovine și 46 caprine din județul Brăila, și 4628 probe de seruri prelevate de la 4616 bovine, 8 ovine și 4 caprine din județul Tulcea.

3. Monitorizarea serologică, efectuată prin tehnica cELISA la bovine, ovine și caprinele domestice, a furnizat rezultate pozitive în toate județele luate în studiu, vârful epidemiologic fiind situat:

a. în anul 2014, județul Vrancea a avut cea mai ridicată incidență (58,5%) a animalelor seropozitive, urmat de Galați (3,21%), Brăila (2,24%) și Tulcea (0,58%).

b. În anul 2015, incidența animalelor seropozitive la *Bluetongue* a fost de 32% în Vrancea, 6,62% în județul Brăila, 2,74% în Galați și 0% în Tulcea, cu excepția județului Brăila, unde ponderea a crescut la 6,62%.

c. În anul 2016, incidența animalelor seropozitive a fost de 15,35% în județul Galați, 15,35% în Vrancea și 10,48% în județul Brăila.

d. În anul 2017, incidența animalelor seropozitive a fost: 0,81% în județul Galați și 3,35% în județul Brăila.

4. Examenul virusologic efectuat prin tehnica *Real Time-RT PCR*, a evidențiat genomul viral *Bluetongue* doar în anul 2014: 47,83% (n=77) din probele de sânge bovin (n=161) și 50% (n=102) din probele de sânge ovin (n=204) din județul Vrancea, 50% (n=2) din probele de sânge bovin (n=4) din județul Galați, 66,66% (n=2) din probele de sânge bovin (n=161) din județul Brăila, 50% (n=1) din probele de sânge bovin (n=2) și 50% (n=1) dintre ovinele (n=2) din județul Tulcea.

5. În anul 2014, când a fost semnalat primul focar de *Bluetongue* în România, insectele din genul *Culicoides* au fost identificate în toată regiunea de Sud-Est a României, județul Tulcea fiind teritoriul cu cea mai mare densitate de insecte culicoide (13,85%), urmată de Vrancea (12,9%), Galați (5,48%) și Brăila (2,3%).

6. Investigațiile de biologie moleculară efectuate în Laboratorul de virusologie al IDSA București, au dus la identificarea serotipului BTV4 în toate regiunile din România, serotip care este circulat în Sud-Estul Europei și care, în anii anteriori, a produs focare de *Bluetongue* în Grecia și Ungaria, țări cu care România a derulat contracte de comerț intracomunitar cu rumegătoare.

7. Speciile vectoriale *Culicoides obsoletus* și *Culicoides pulicaris* au evoluat simultan în fiecare dintre județele monitorizate.

8. Confirmarea prezenței virusului *Bluetongue* la rumegătoarele domestice din regiunea de Sud-Est a României, corelată cu rezultatele supravegherii entomologice din arealul fiecărui județ, a dus, în anul 2014, la declararea a 179 focare de *Bluetongue* semnalate în 43 localități din județul Vrancea, 2 focare de *Bluetongue* în județul Galați, 4 focare de *Bluetongue* în județul Brăila și 2 focare de *Bluetongue*, în județul Tulcea.

9. În perioada 2015-2017, virusul *Bluetongue* nu a fost identificat la probele prelevate de la rumegătoarele din județele Vrancea, Galați, Brăila și Tulcea.

10. Tabloul clinic în infecția cu virusul *Bluetongue*, la bovine a fost reprezentativ, fiind identificate următoarele semne clinice: 100% (n=209) cu hiperemia mucoasei conjunctivale, 98,56% (n=206) cu epiforă, 98,56% (n=206) cu sialoree, 97,6% (n=204) cu ulceratii gingivale, 95,7% (n=200) cu tumefierea și cianoza limbii, 95,7% (n=200) cu edem nazal, 90,43% (n=189) cu ulceratii ale mucoasei nazale, 88,90% (n=186) cu jetaj muco-purulent, 80,38% (n=168) cu necroze circumscrie, și ulceratii la nivelul ugerului, 76,07% cu slăbire accentuată; 73,2% (n=153%) congestia zonei coronare, 57,9% (n=121) cu fenomene nervoase (torticolis), 48,32% (n=101) cu diaree, 45,93% (n=96) cu imobilitate, 44,01% (n=92) cu exongulări, 13,88% (n=29) cu ulcere pe trenul posterior și 5,26% (n=11) cu avorturi.

11. Tabloul clinic la ovine a fost similar cu cel de la bovine, evoluând la 94,66 % (n=195) cu stare de prostrație, 100% (n=206) cu secreții nazale muco-purulente, 100% (n=206) cu edeme și ulceratii nazale, 97,10% (n=200) cu cianoza mucoasei bucale și 100% (n=206) cu ulceratii ale buzelor, 100% (n=206) cu ulceratii și necroze circumscrie la nivelul mucoasei bucale, 99,5% (n=205) cu sialoree, 53,4% (n=110) cu epiforă, 99,5% (n=205) tumefierea și cianoza limbii, 96,6% (n=199) cu incapacitatea de a se deplasa și 64,10% (n=132) au prezentat slăbire accentuată.

12. Infecția cu virusul *Bluetongue* la caprine, a avut o exprimare clinică redusă, fiind observate următoarele simptome: 100% (n=3) caprine cu stare de prostrație, 100% (n=3) cu jetaj muco-purulent, 100% (n=3) cu edeme și ulceratii nazale, 66,6% (n=3) cu cianoza mucoasei bucale și 100% (n=3) cu schiopături.

13. Tabloul lezional a fost descris la bovinele sacrificate de necesitate, unde incidența leziunilor a variat în funcție de stadiul evoluției clinice: la 100 % (n=8) bovine s-au identificat peteșii extinse la nivelul țesutului conjunctiv subcutanat, 75% (n=6) cu congestii și hemoragii la nivelul pilierului anterior al rumenului, 100% (n=8) cu hipertrofie splenică, 87,5% (n=7) cu hemoragii multifocale splenice și 100% cu hemoragii la baza arterei pulmonare, 87,5% (n=7) cu congestia, edemul și cianoza laringelui și faringelui și 75% (n=6) prezentau edem pulmonar și spumozități traheo-bronșice.

14. Corelând rezultatele epidemiologice obținute prin investigațiile serologice, virusologice și entomologice, putem conchide faptul că virusul *Bluetongue* se găsește într-o stare latentă, care nu a permis identificarea sa în perioada 2015-2017, dar care se poate reactiva sub influența principalilor factori predispozanți: prezența insectelor vectoriale din genul *Culicoides* și creșterea populației de animale receptive.

Având în vedere riscul crescut de producere a unor noi focare de *Bluetongue* în regiunea de Sud Est a României (județele Galați, Brăila, Vrancea și Tulcea) și efectele economice generate, pentru supravegherea și prevenirea apariției bolii, **recomandăm următoarele măsuri:**

1. Controlul serologic al tuturor rumegătoarelor recepționate atât din interiorul spațiului intracomunitar cât și din spațiul extracomunitar European, indiferent dacă în țările terțe a evoluat sau nu virusul *Bluetongue*.

2. Respectarea carantinei profilactice pentru toate animalele importate.

3. Menținerea supravegherii serologice și virusologice la toate speciile de rumegătoare domestice și sălbatice.

4. Menținerea supravegherea entomologice în toate regiunile României.

5. Efectuarea unor noi investigații care să stabilească cu certitudine, rolul altor vectori hematofagi în transmiterea virusului *Bluetongue*.

6. Efectuarea obligatorie a dezinsecției în spațiile de adăpost a animalelor în perioada de liniște vectorială (decembrie-februarie), asanarea și salubritatea terenurilor care sunt surse constante de vectori.

CHAPTER VIII.

FINAL CONCLUSIONS AND RECOMANDATIONS

The epidemiological research carried out during 2014-2017, regarding *Bluetongue* disease in domestic ruminants in the South-East region, have led to the following conclusions:

1. The strategy for serological, virological and entomological monitoring in *Bluetongue*, has been applied differently, depending on the annual epidemiological situation in each county.

2. During 2014-2017, in the South-East region of Romania, 12846 serum samples were tested, as follows: 3052 serum samples harvested from 2342 cattle and 180 goats from Galați county, 2778 serum samples obtained from 1666 cattle, 946 sheep and 4 goats from Vrancea county, 2388 samples collected from 2306 cattle, 36 sheep and 46 goats from Brăila county, 4628 samples harvested from 4616 cattle, 8 sheep and 4 goats from Tulcea County.

3. The serological monitoring, performed by cELISA technique in cattle, sheep and goats, has provided positive results in all the counties, revealing the epidemiological peak:

- a. In 2014, Vrancea County had the highest incidence (58.5%) of seropositive animals, followed by Galați (3.21%), Brăila (2.24%) and Tulcea (0, 58%).

- b. In 2015, the incidence of positive animals in *Bluetongue* was 32% in Vrancea, 6.62% in Brăila county, 2.74% in Galați and 0% in Tulcea, except for Brăila county, where the share increased to 6 62%.

- c. In 2016, the incidence of seropositive animals was 15.35% in Galați county, 15.35% in Vrancea, 10.48% and in Brăila county.

- d. In 2017, the incidence of seropositive animals was 0.81% in Galați County and 3.35% in Brăila County.

4. The virological examination performed by Real Time-RT PCR technique highlighted the *Bluetongue* viral genome only in 2014, as follows: 47.83% (n = 77) of bovine blood samples (n = 161) and 50% (n = 102) from sheep blood samples (n = 204) from Vrancea County, 50% (n = 2) from bovine blood samples (n = 4) from Galați county, 66.66% (n = 2) from samples of bovine blood (n = 161) and 100% (n = 3) of blood samples taken from positive bovine animals with suspected disease in Brăila county, 50% (n = 1) of bovine blood samples (n = 2) and 50% (n = 1) of the sheep (n = 2) in Tulcea County.

5. In 2014, when the first *Bluetongue* outbreak was reported in Romania, insects of the genus *Culicoides* were identified throughout the South-East region of Romania, Tulcea County being the territory with the highest density of culicoid insects (13.85 %), followed by Vrancea (12.9%), Galați (5.48%) and Brăila (2.3%).

6. The molecular biology investigations carried out by IDSA, led to the identification of the BTV4 serotype in all regions of Romania, a serotype that is circulated in South-East Europe and which, in previous years, produced *Bluetongue* outbreaks in Greece and Hungary, countries with which Romania has conducted intra-Community trade agreements with ruminants.

7. Vector species *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* evolved simultaneously in each of the monitored counties.

8. The confirmation of the presence of the *Bluetongue* virus in the domestic ruminants in the South-East region of Romania, correlated with the results of the entomological surveillance in the area of each county, led, in 2014, to the declaration of 179 *Bluetongue* outbreaks reported in 43 localities from Vrancea County, 2 *Bluetongue* outbreaks in Galați County, 4 *Bluetongue* outbreaks in Brăila County and 2 *Bluetongue* outbreaks in Tulcea County.

9. During 2015-2017, the Bluetongue virus was not identified in the samples taken from the ruminants from the counties of Vrancea, Galați, Brăila and Tulcea.

10. The clinical picture in *Bluetongue* virus infection in cattle was representative, with the following clinical signs: 100% (n = 209) with conjunctival mucosal hyperemia, 98.56% (n = 206) with epiphora, 98.56% (n = 206) with sialoree, 97.6% (n = 204) gingival ulcers, 95.7% (n = 200) with swelling and cyanosis of the tongue, 95.7% (n = 200) with nasal edema, 90, 43% (n = 189) with ulcers of the nasal mucosa, 88.90% (n = 186) with muco-purulent discharge, 80.38% (n = 168) circumscribed necrosis, ulcers in the uterus, 76.07% with weakness; 73.2% (n = 153%) congestion of the coronary area, 57.9% (n = 121) with nervous phenomena (torticollis), 48.32% (n = 101) with diarrhea, 45.93% (n = 96)) with immobility, 44.01% (n = 92) with exongulation, 13.88% (n = 29) with ulcers on the posterior areas and 5.26% (n = 11) with abortions.

11. The clinical picture in sheep was similar to that in cattle, evolving to 94.66% (n = 195) with prostration, 100% (n = 206) with muco-purulent nasal secretions, 100% (n = 206) with edema and nasal ulceration, 97.10% (n = 200) with cyanosis of the oral mucosa and 100% (n = 206) with ulceration of the lips, 100% (n = 206) with ulcers and necrosis circumscribed in the oral mucosa, 99.5% (n = 205) with sialoree, 53.4% (n = 110) with epiphora, 99.5% (n = 205) swelling and cyanosis of the tongue, 96.6% (n = 199) were in the inability to move and 64.10% (n = 132) showed marked weakness.

12. *Bluetongue* virus infection in goats had a reduced clinical expression, the following being observed: 100% (n = 3) goats with prostration, 100% (n = 3) with muco-purulent discharge, 100% (n = 3) with edema and nasal ulceration, 66.6% (n = 3) with oral mucosal cyanosis and 100% (n = 3) with lameness.

13. The lesion picture was described only in bovines slaughtered by necessity, where the incidence of the aspects varied according to the clinical evolution: in 100% (n = 8) bovine animals, enlarged petechiae were identified in the subcutaneous connective tissue, 75% (n = 6) presented congestion and bleeding at the anterior pillar of the rumen, 100% (n = 8) showed splenic hypertrophy, 87.5% (n = 7) with splenic multifocal hemorrhages and arterial pulmonary hemorrhage. In 87.5% (n = 7) congestion, edema and cyanosis of the larynx and pharynx were observed and 75% (n = 6) of animals showed pulmonary edema and tracheo-bronchial foam.

14. Correlating the epidemiological results obtained by serological, virological and entomological investigations, we can conclude that the *Bluetongue* virus is in a latent state, which did not allow its identification during 2015-2017, but which can be reactivated under the influence of the main predisposing factors: the presence of vector insects of the genus *Culicoides* and the increase of susceptible animals population.

Given the increased risk of producing new *Bluetongue* outbreaks in the South-East region of Romania and the economic effects generated by this disease, **we recommend:**

1. The serological control of all the ruminants received both from within the intra-community and from the non-European area, whether or not the Bluetongue virus has evolved in third countries.

2. Compliance with prophylactic quarantine for all imported animals.

3. Maintaining serological and virological surveillance in all species of domestic and wild ruminants in all regions of Romania.

4. Maintaining entomological surveillance in all regions of Romania.

5. Carrying out new investigations that will establish with certainty the role of other hematophagous vectors in the transmission of *Bluetongue* virus.

6. The compulsory carrying out of the disinsection in the animal shelter spaces during the vectorial silence periode (December-February), the sanitation of the lands that are constant sources of vectors.

BIBLIOGRAFIE
BIBLIOGRAPHY

1. Acree, J.A., Echterkamp, S.E., Kappes, S.M., Luedke, A.J., Holbrook, F.R., Pearson J.E., 1991- *Failure of embryos from bluetongue infected cattle to transmit virus to susceptible recipients and offspring*, Theriogenology 36, 689-697.
2. Alexander KA, Maclachlan NJ, Kat PW, House C, O'Brien SJ, Lerche NW. Ş.a., 1994- *Evidence of natural bluetongue virus infection among African carnivores*. AmJTrop Med Hyg.;51:568-576
3. Alexander RA, Gaig DA., 1951- *The use of egg attenuated blue-tongue virus in the production of polyvalent vaccine for sheep. A propagation of the virus in sheep*. Onderstepoort J Vet Res.;25:3-15
4. Angel Miranda Miguel, Stegeman J. A., Bicout D., Dhollander Sofie şi alţi 37 col., 2017 - *Bluetongue: control, surveillance and safe movement of animals* EFSA Panel on Animal Health and Welfare, March EFSA Journal 15(3) DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4698
5. Augot D., Sauvage F., Jouet D., Simphal E., Veuille M., Couloux A., Kaltenbach M.L., Depaquit J., 2010 - *Discrimination of Culicoides obsoletus and Culicoides scoticus, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis*. Infect Genet Evol.;10(5):629-37.
6. Balenghien T., Pagès, N., Goffredo Maria, Carpenter S., Augot D., Jacquier Elisabeth, Talavera, Sandra Monaco, Federica Depaquit, J. Grillet Colette, Pujols Joan, Satta G., Kasbari M., Setier-Rio Marie-Laure, Izzo Francesca, Alkan C., Delécolle J.C., Quaglia Michela, Charrel R., Polci Andrea, Bréard E., Federici Valentina, Cêtre-Sossah Catherine, Garros Claire, 2014- *The emergence of Schmallenberg virus across Culicoides communities and ecosystems in Europe*. Prev Vet Med Special Issue: Schmallenberg Virus: Epidemiology of an Emerging Disease, 2014, 116, 4, 360-369.
7. Bartsch Stefanie, Bauer B., Wiemann A., Clausen P.H., Steuber S., 2009- *Feeding patterns of biting midges of the Culicoides obsoletus and Culicoides pulicaris groups on selected farms in Brandenburg, Germany*, Parasitology Research, Volume 105, Issue 2, pp 373-380
8. Batten C.A. , L. Edwards, C.A.L. Oura, 2013 - *Evaluation of the humoral immune responses in adult cattle and sheep, 4 and 2.5 years post-vaccination with a bluetongue serotype 8 inactivated vaccine*, Vaccine. 20; 31(37): 3783-3785.
9. Bărganuță, A., 2010- *Research on Bluetongue*, PhD Thesis, "Ion Ionescu De La Brad" University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Iași
10. Beaty B. J., Calisher, C. H., 1991- *Bunyaviridae – Natural history*. Curr. Top Microbiol Immunol 169, 27-78.
11. Belbis G., Breard E., Cordonnier N., Moulin V., Desprat A., Sailleau C., Viarouge C., Doceul V., Zientara S., Millemann Y., 2013- *Evidence of transplacental transmission of bluetongue virus serotype 8 in goats*. Veterinary, Microbiology, 166, 394-404.
12. Bitew M., Nandi S., Ravishankar C., Somvanshi R., 2013- *Serological and molecular evidence of bluetongue in sheep and goats in Uttar Pradesh, India*. African J Biotechnol;12(19):2699-2705.
13. Blancou J., Pearson J.E., 2003- *Bioterrorism and infectious animal diseases*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 26, 431-443.
14. Borkent A., 2004- *The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera)*. In: Marquardt W, editor. Biology of Disease Vectors, 2nd edn. Cambridge: Academic Press; p. 113-26
15. Bouwknegt C, van Rijn PA, Schipper JJ, Holzel D, Boonstra J, Nijhof AM, van Rooij EM, Jongejan F., 2010- *Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus*. Exp Appl Acarol 52: 183-192.
16. Bouwknegt Ch., Piet A. van Rijn, Jacqueline J. M. Schipper, Dennis Hölzel, Jan Boonstra, Ard M. Nijhof, Eugène M. A. van Rooij, and Frans Jongejan, 2010- *Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus*, Exp Appl Acarol.; 52(2): 183-192.
17. Bouwknegt Ch., van Rijn P.A., Schipper Jacqueline, Hölzel D., Boonstra J., Nijhof A.M., van Rooij E. M. A., Jongejan F., 2010- *Potential role of ticks as vectors of Bluetongue virus*, Experimental & Applied Acarology, 52(2): 183-192. doi: 10.1007/s10493-010-9359-7

18. Bowen R.A., Howard T.H., 1984- *Transmission of bluetongue virus by intrauterine inoculation or insemination of virus-containing bovine semen*, American Journal of Veterinary Research 45, 1386-1388.
19. Brand S.P., Keeling M.J., 2017 - *The impact of temperature changes on vector-borne disease transmission: Culicoides midges and bluetongue virus*. Journal of The Royal Society Interface , Mar;14(128).
20. Brewer A.W., MacLachlan N.J., 1992- *Ultrastructural characterization of the interaction of Bluetongue virus with bovine erythrocytes in vitro*. Vet Pathol 29: 356–359
21. Brugger K., Rubel F., 2013- *Characterizing the species composition of European Culicoides vectors by means of the Köppen-Geiger climate classification*, Parasit Vector, 6, 333
22. Brugger Katharina, Rubel F., 2013 - *Characterizing the species composition of European Culicoides vectors by means of the Köppen-Geiger climate classification*, Parasites & Vectors, volume 6, Article number: 333
23. Carp Cărare M., Carp-Cărare C., 2001 – *Microbiologie veterinară- Virusologie*, Casa de editura Venus, Iași
24. Carpenter S., 2011- *Temperature dependence of the extrinsic incubation period of orbiviruses in Culicoides biting midges*. PLoS One 6,e27987.
25. Carpenter S., Groschup M.H., Garros C., Felipe-Bauer M.L., Purse B.V., 2013- *Culicoides biting midges, arboviruses and public health in Europe*. Antiviral Res.;100:102–13.
26. Carpenter S., Wilson A., Mellor P.S., 2009- *Culicoides and the emergence of bluetongue virus in northern Europe*. Trends in Microbiology, 17(4), 172–178
27. Chaignat V., Worwa G., Scherrer N., Hilbe M., Ehrensperger F., Batten C., Cortyen M., Hofmann M., Thuer B., 2009- *Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observation in field and experimental infection of goats and sheep*. Vet Microbiol 138:11-19.
28. Chanda M.M., Carpenter S., Prasad S., Sedda L, Henrys P. A., M. R. Gajendragad, Purse B. V., 2019 - *Livestock host composition rather than land use or climate explains spatial patterns in bluetongue disease in South India*, Scientific Reports volume 9, Article number: 4229
29. Clavijo A., Heckert R.A., Dulac G.C., Afshar A., 2000 - *Isolation and identification of Bluetongue virus*. J Virol Methods;87(1–2):13–23.
30. Coetzee P, Stokstad M, Myrmel M, Mutowembwa P, Loken T, Venter EH and Van Vuuren M, 2013- *Transplacental infection in goats experimentally infected with a European strain of bluetongue virus serotype 8*. Veterinary Journal, 197, 335–341.
31. Coetzee P., Stokstad Maria, Venter Estelle H., Mette Myrmel, Moritz Van Vuuren, 2012- *Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa*, Virology Journal; 9: 198., doi: 10.1186/1743-422X-9-198
32. Coetzee P., Stokstad Maria, Venter Estelle, Myrmel Mette, Van Vuuren M., 2012- *Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa*, Virol J.; 9: 198.
33. Collins Áine B., Mee J F., Doherty M. L., Barrett D. J., England M. E., 2018- *Culicoides species composition and abundance on Irish cattle farms: implications for arboviral disease transmission*, Parasit Vectors. 2018; 11: 472.
34. Courtejoie N., Bournez L., Zanella G., Durand B., 2019- *Quantifying bluetongue vertical transmission in French cattle from surveillance data*. Vet Res. 14;50(1):34. doi: 10.1186/s13567-019-0651-1.
35. Dărbăuș Gh., Tilibașa Elena, I. Opreșcu, Mederle Narcisa, Morariu S., Ilie M.S., Imre Mirela, 2017- *Prezența și raportul masculi/femele la unele specii ale Genului Culicoides (Diptera Ceratopogonidae) în România*, Rev Rom Med Vet, 27, 4, 51-57,
36. De Clercq K., De Leeuw I., Verheyden B., Vandemeulebroucke E., Vanbinst T., Herr C., Meroc E., Bertels G., Steurbaut N., Miry C., De Bleecker K., Maquet G., Bughin J., Saulmont M., Lebrun M., Sustronck B., De Deken R., Hooyberghs J., Houdart P., Raemaekers M., Mintiens K., Kerkhofs P., Goris N., Vandenbussche F., 2008- *Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a*

- wild-type bluetongue virus serotype 8 natural infection. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55, 352–359.
37. Desmecht D., Bergh R.V., Sartelet A., Leclerc M., Mignot C., Misse F., Sudraud C., Berthemin S., Jolly S., Mousset B., Linden A., Coignoul F., Cassart D., 2008- *Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle*. *Vet Rec.*;163:50–52. doi: 10.1136/vr.163.2.50.
 38. Diaconu M.C., 2018- *Studii anatomoclinice și de laborator în focarele de Bluetongue din România*, Teză de doctorat, USAMV București
 39. Du Toit RM., 1944- *The transmission of bluetongue and horsesickness by Culicoides*. *Onderstepoort J Vet Anim Ind.* 1944;19:7–16.
 40. Dungu B., Potgieter C., Von T.B., Smit T., 2004- *Vaccination in the control of bluetongue in endemic regions: the South African experience*. *Dev Biol (Basel)*;119:463–472.
 41. Estrada-Peña A., Bouattour A., Camicas J.L., Walker A.R., 2004- *Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region. A guide to identification of species*. Spain: University of Zaragoza;
 42. Femke Feenstra, Piet A. van Rijn, 2017- *Current and next- generation bluetongue vaccines: Requirements, strategies, and prospects for different field situations*, *Critical Reviews in Microbiology*, 43(2), 142- 155.
 43. Fernandez-Pacheco P., Fernandez-Pinero J., Aguero M., Jimenez-Clavero MA., 2008- *Bluetongue virus serotype 1 in wild mouflons in Spain*. *Vet Rec*162: 659-660.
 44. Foxi C., Delrio G., 2010- *Larval habitats and seasonal abundance of Culicoides biting midges found in association with sheep in northern Sardinia, Italy*. *Medical Veterinary Entomology*.;24:199–20
 45. Garcia I., Napp S., Casal J., Perea A., Allepuz A., Alba A., Carbonero A., Arenas A., 2009- *Bluetongue epidemiology in wild ruminants from Southern Spain*. *Eur J Wildl Res* 55: 173-178.
 46. Gerdes GH., 2004- *A South African overview of the virus, vectors, surveillance and unique features of bluetongue*. *Vet Ital* 40: 39-42.
 47. Gibbs E.P., Greiner E.C., 1994- *The epidemiology of bluetongue*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*;17:207–220. doi: 10.1016/0147-9571(94)90044
 48. Gibbs E.P., Greiner E.C., 1994- *The epidemiology of Bluetongue*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*;17:207–220. doi: 10.1016/0147-9571(94)90044-2.
 49. Gibbs E.P.J., Lawman M.P.J., Hemiman K.A.J. 1979 –*Preliminary observations on transplacental infections in sheep a possible overwintering mechanism*, *Research in Veterinarz Science*, 27, 118-120.
 50. Gonzalez M., Lopez S., Mullens B.A., Baldet T., Goldarazena A., 2013- *A survey of Culicoides developmental sites on a farm with a brief review of immature habitats of European species*. *Veterinary Parasitology*.;191:81–93.
 51. Harrup L.E., Purse B.V., Golding N., Mellor P.S., Carpenter S., 2013- *Larval development and emergence sites of farm associated Culicoides in the United Kingdom*. *Medical Veterinary Entomology*;27:441–9.
 52. Hope A., Gubbins S., Sanders C., Barber J., Stubbins F., Baylis M., Carpenter S., 2018 - *Sheep breed and shearing influences attraction and blood-feeding behaviour of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) on a UK farm*, *Parasites & Vectors*, 11:473
 53. Howerth E.W., Stallknecht D.E., Kirkland P.D., 2001- *Bluetongue, epizootic haemorrhagic disease, and other orbivirus related diseases*. In: Williams ES, Barker IK (eds) *Infectious diseases of wild mammals*. Iowa State University Press, Ames, pp 77-97.
 54. Johnson D.J., Ostlund E.N., Stallknecht D.E., Goekjian V.H., Jenkins-Moore M., Harris S.C., 2006- *First report of blue- tongue virus serotype 1 isolated from a white-tailed deer in the United States*. *J Vet Diagn Invest* 18: 398-401.
 55. Kirkland P.D., 2004- *Bluetongue viruses, vectors and surveillance in Australia - the current situation and unique features*. *Vet Ital*;40:2004–2047
 56. Legisa D.M., Gonzalez F.N., Dus Santos M.J., 2014- *Bluetongue virus in South America, Central America and the Caribbean*. *Virus Res* 182: 87–94. pmid:24239973

57. Linden A., Mousset B., Gregoire F., Hanrez D., Vanden- Bussche F., Vandemeulebroucke E., Vanbinst T., Ver- heyden B., De Clerk K., 2008- *Bluetongue virus antibo- dies in wild red deer in southern Belgium*. Vet Rec 162: 459.
58. Lopez-Olvera J.R., Falconi C., Fernandez-Pacheco P., Fernan- dez-Pineiro J., Sanchez M.A., Palma A., Herruzo I., Vicente J., Jimenez-Clavero M.A., Arias M, Sanchez-Vizcaino J.M., Gortazar C., 2010- *Experimental infection of European red deer (Cervus elaphus) with bluetongue virus serotypes 1 and 8*. Vet Microbiol 145:148-152.
59. Lysyk T.J., Danyk T., 2007 - *Effect of temperature on life history parameters of adult Culicoides sonorensis (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to geographic origin and vectorial capacity for bluetongue virus*. J Med Entomol 44: 741–751.
60. Maan S., Maan N.S., Nomikou K., Batten C., Antony F., Belaganahalli M.N., Samy A.M., Reda A.A., Al-Rashid S.A., El Batel M., Oura C.A., Mertens P.P., 2011- *Novel bluetongue virus serotype from Kuwait*. Emerg Infect Dis 17:886-889.
61. Maclachlan N.J., Guthrie A.J., 2010- *Remergence of bluetongue, African horse sickness, and other Orbivirus diseases*. Vet Res.;41:35. doi: 10.1051/vetres/2010007
62. Maclachlan, N. J., 2010- *Global implications of the recent emergence of bluetongue virus in Europe*, Vet. Clin. North Am Food Anim Pract., 26, 163–171.
63. Mayo C. E., Mullens B. A., Reisen W. K., Osborne C. J., Gibbs E.P.J., Gardner I. A., MacLachlan N. J. 2014- *Seasonal and interseasonal dynamics of bluetongue virus infection of dairy cattle and Culicoides sonorensis midges in Northern California - implications for virus overwintering in temperate zones*. PLoS ONE 9: e106975.
64. Mcholland L.E., Mecham J.O., 2003- *Characterization of cell lines developed from field populations of Culicoides sonorensis (Diptera: Ceratopogonidae)*. J Med Entomol. 2003;40(3):348–351.
65. McVey D.S., MacLachlan N.J., 2015- *Vaccines for prevention of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in livestock: A North American perspective*. Vector Borne Zoonotic Dis 15: 385–396. pmid:26086559
66. Meiswinkel R., van Rijn P., Leijds P., Goffredo M., 2007 – *Potential new Culicoides vector of bluetongue virus in northeru Europe*. Veterinary Record, 161, 564-565.
67. Mellor P.S., Boorman J., 1995- *The transmission and geo- graphical spread of African horse sickness and bluetongue viruses*. Ann Trop Med Parasitol 89: 1-15.
68. Mellor P.S., Boorman J., 1995- *The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses*. Ann Trop Med Parasitol.;89:1–15.
69. Mellor P.S., Boorman J., Baylis M., 2000- *Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors*. Annu Rev En- tomol 45: 307-340.
70. Menzies F.D., McCullough S.J., McKeown I.M., Forster J.L., Jess S., Batten C., Murchie A.K., Gloster J., Fallows J.G., Pelgrim W., Mellor P.S., Oura C.A., 2008- *Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle*. Vet Rec 163: 203-209
71. Moga Mânzat R. ș.a., 2005 – *Boli virotice și prionice ale animalelor*, Ed.Brumar, Timișoara
72. Monaco F., Cammà C., Serini S., Savini G., 2006- *Differentiation between field and vaccine strain of bluetongue virus serotype 16*. Vet. Microbiol.,116, 45–52
73. Moț Daniela, Nichita Ileana, Tîrziu E., Moț T., 2018- *Bluetongue in Europe and Romania in the Last Years*, Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, , 51 (1)
74. Moulin V., Noordegraaf C. V., Makoschey B., ș.a., 2012- *Clinical disease in sheep caused by bluetongue virus serotype 8, and prevention by an inactivated vaccine*, Vaccine, , 30, 22, 28–35.
75. Mullen G. R., 2002 - *Medical and Veterinary Entomology*, cap.10 - Biting Midges (Ceratopogonidae), Pages 163-183, Academic Press
76. Neitz W.O., 1948- *Immunological studies on bluetongue in sheep*. Onderstepoort J Vet Anim Ind.;23:93–136.
77. Niedbalski W., 2015- *Bluetongue in Europe and the role of wildlife in the epidemiology of disease*, Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 18, No. 2 (2015), 455–461

78. Ninio C., Augot D., Dufour B., Depaquit J., 2011- *Emergence of Culicoides obsoletus from indoor and outdoor breeding sites*. Veterinary Parasitology;183:125–9.
79. Osburn B.I., 1994 -*The impact of bluetongue virus on reproduction*, Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Diseases 17, 189-196.
80. Paslaru Anca Ioana, Mathis A. ,Torgerson P. ,Veronesi E. , 2018-*Vectorcompetence of pre-alpine Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) for bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8*, Parasit Vectors ; 11: 466.
81. Paul I., 1982 – *Diagnostic morfopatologic veterinar*, Ed.Ceres, București
82. Paul R., Bessell, Sears K. R., AutyH. K., Handel I. G., Purse B. V. Mark, B.,2016- *Assessing the potential for Bluetongue virus 8 to spread and vaccination strategies in Scotland*, Scientific Reports, 6 38940,10-38.
83. Perianu T. și col., 2012 -*Tratat de boli infectioase ale animalelor, Viroze și boli prionice*, vol. II, Editura Universitas XXI, Iași, 842 pag., ISBN: 978-606-538-084-4
84. Perianu T., ș.a., 2005 -*Boli infecțioase ale animalelor . Viroze* Vol. II. Editura Universitas XXI,Iași, ISBN: 973-7960-06-8
85. Purse B. V., Carpenter S., Venter G. J., Bellis G., Mullens B. A. 2015- *Bionomics of Temperate and Tropical Culicoides Midges: Knowledge Gaps and Consequences for Transmission of Culicoides-Borne Viruses*. Annual Review of Entomology 60, 373–392, <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020614> (2015).
86. Purse B., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.P., Baylis M., 2005- *Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe*. Nat Rev Microbiol 3:171-181.
87. Răpuntean Ghe., Răpuntean S., 2014- *Virusologie veterinară specială*, Ed. Colorama, Cluj Napoca,ISBN 978-606-93684-7-3
88. Rîmbu Cristina, Guguianu Eleonora, Horhoge Cristina, Carp Cărare C., Rusu Raluca, Chitic B., Horhoge R., Dămăceanu Ani, 2018 - *Seroprevalence of the Bluetongue virus to ruminants in Vaslui County*, Proceedings of the International Conference on life Sciences. „Animal breeding and pathology to day”; Filodiritto Editore-Proceedings-Bologna(Italy),First Editins, ISBN 978-88-85813-24-3
89. Rodriguez-Sanchez B., Gortazar C, Ruiz-Fons JF, San- chez-Viscaino JM., 2010- *Bluetongue virus serotypes 1 and 4 in red deer, Spain*. Emerg Infect Dis 16:518-520.
90. Rojas J.M., Rodríguez-Martín D., Martín V., Sevilla N., 2019- *Diagnosing bluetongue virus in domestic ruminants: current perspectives*, Veterinary Medicine: Research and Reports, ISSN: 2230-2034, Vol:10 Pages 17—27
91. Rossi S., Gilbert P., Breard E., Moinet M., Hars J., Maillard D., Wanner M., Klein F., Mastain O., Mathevet P., Bost F., 2010- *Circulation et impact des virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) chez les ruminants sauvages en France*. Bull Epidemiol AFFSA 35:28-32.
92. Ruder M.G., Lysyk T.J., Stallknecht D.E., Foil L.D., Johnson D.J., Chase C.C., 2015- *Transmission and epidemiology of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in North America: Current perspectives, research gaps, and future directions*. Vector Borne Zoonotic Dis 15: 348–363. pmid:26086556
93. Ruiz-Fons F, Reyes-Garcia AR, Alcaide V, Gortazar C., 2008- *Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants*, Spain. Emerg Infect Dis 14:951-953.
94. Saegerman C., Berkvens D., Mellor P.S., 2008- *Bluetongue epidemiology in the European Union*. Emerg Infect Dis 14:539-544.
95. Saegerman C., Bolkaerts B., Baricalla C., Raes M., Wiggers L., de Leeuw I., Vandenbussche F., Zimmer J.Y., Haubruge E., Cassart D., De Clercq K. and Kirschvink N, 2011- *The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep*. The Veterinary Journal, 187,72–80.
96. Samy A.M., Peterson A.T. , 2016- *Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of Bluetongue Virus*. PLoS ONE 11(3): e0150489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150489>
97. Santiago-Moreno J., Carvajal A., Astorga R.J., Coloma M.A., Toledano-Diaz A., Gomez-Guillamon F., Salas-Vega R., Lopez-Sebastian A., 2010- *Potential impact of diseases*

- transmissible by sperm on the establishment of Iberian ibex (Capra pyrenaica) genome resource banks. Eur J Wildl Res* 57:211-216.
98. Savini G., MacLachlan N. J., Sanchez-Vizcaino J. M., Zientara S., 2008- *Vaccines against bluetongue in Europe. Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 31, 10, 1
99. **Samson (Tudose) Ana**, Rîmbu Cristina, Carp-Cărare C., Tudose A., Cozma Andreea, Carp-Cărare M., 2018- *Serological supervision of Bueltongue disease in the South-East region of Romania*, Conferința Internațională de Științele Vieții. „Animal breeding and pathology to day”Scientifical Papers Veterinary Medicine Timișoara, vol. LI 3, pag.89-97, ISSN 1221-5295, [https://www.usab-tm.ro/utilizatori/medicinaveterinara/Volum%20LI%20\(3\)%202018\(1\).pdf](https://www.usab-tm.ro/utilizatori/medicinaveterinara/Volum%20LI%20(3)%202018(1).pdf)
100. **Samson (Tudose) Ana**, Rîmbu Cristina, Carp-Cărare C., Tudose A., Horhoga Cristina, Carp-Cărare M., 2018 - *Virological supervision of Bluetongue disease in the South-East region of 'Romania*, Lucrări științifice Medicină Veterinară Iași, vol. 61 (4), p.244-248, on -line ISSN 2393 – 4603, ISSN-L 1454 – 7406
101. Savuța Gh., 2007 – *Epidemiologie veterinară*. Ed. PIM; Iași
102. Schwartz-Cornil I., Mertens P.P., Contreras V., Hemati B., Pascale F., Breard E., Mellor P.S., MacLachlan N.J., Zientara S., 2008- *Bluetongue virus: virology, Pathogenesis and Immunity. Vet Res* 39:46.
103. Slama Darine, Hamouda Babba, Emna Chaker, 2017 - *Culicoides spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in Tunisia*, Biological Control of Pest and Vector Insects, Vonnice D.C. Shields, IntechOpen, DOI: 10.5772/66944.
104. Sleeman J.M., Howell J.E., Matthew Knox W, Stenger P.J. 2009- *Incidence of hemorrhagic disease in whitetailed deer is associated with winter and summer climatic conditions. Ecohealth* 6: 11-15
105. Sperlova A., Zendulkova D., 2011- *Bluetongue: a review, Veterinarni Medicina*, 56, (9): 430–452
106. Sreenivasulu D., Subba Rao M.V., Reddy Y.N., Gard G.P., 2004- *Overview of bluetongue disease, viruses, vectors, surveillance and unique features: The Indian Sub-continent and adjacent regions. Vet Ital* 40: 73–77. pmid:20419638
107. Stanciu S, Sarbu R., 2014- *Economic impact of the Bluetongue disease in Romanian livestock sector*, Crafting Global Competitive Economies Proceedings 2014, IBIMA Publishing House, (coord Khalid S. Soliman), ISBN 978-0-9860419-3-8, Milano, Italy Volume: 2 pp. 651-660, <http://www.ibima.org/ITALY2014/papers/silv.html>;))
108. Svobodová M., Dolnik O.V., Čepička I., Rádrová J., -2017- *Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. Parasit Vectors*;10:224
109. Szmargd C., Wilson A., Carpenter S., 2007- *Mortality and case fatality during the recurrence of BTV-8 in northern Europe in 2007, Vet. Rec.*, 161, 571-572.
110. Tabachnick W.J., 1996- *Culicoides variipenis and bluetongue epidemiology in the United States, Annual Rev. Entomol*, 41, p 23-43
111. Temesgen Abera, Molalegne Bitew, Debebe Gebre, Yosef Mamo, Yosef Deneke and Sukdeb Nandi, 2018- *Bluetongue disease in small ruminants in south western Ethiopia: cross-sectional sero-epidemiological study, BMC Res Notes.*; 11: 112.
112. Van der Sluijs M.T., Schroer-Joosten D.P., Fid-Fourkour A., Smit M., Vrijenhoek M.P, Moulin V., de Smit A.J., Moormann R.J., 2013- *Transplacental transmission of BTV-8 in sheep: BTV viraemia, antibody responses and vaccine efficacy in lambs infected in utero. Vaccine*, 31, 3726–3731.
113. Van der Sluijs M.T.W., de Smit A.J., Moormann R.J.M., 2016- *Vector independent transmission of the vector-borne bluetongue virus. Crit Rev Microbiol.*;42:57–64. doi: 10.3109/1040841X.2013.879850.
114. Vasić A., Zdravković N., Anić D., Bojkovski J., Marinov M., Mathis A., Niculaua M., Oşlobanu Elena Luanda, Pavlović I., Petrić D., Pflüger V., Pudar D., Savuța Gh, Simeunović P., Veronesi E., Silaghi C., 2019- *Species diversity, host preference and arbovirus detection of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Serbia. Parasit Vectors*;12(1):61. doi: 10.1186/s13071-019-3292-3.
115. Vasii C., 2003- *Viroze și boli prionice la animale*, Editura Nereamia Napoca.

116. Velescu E., 2004- *Patologia bolilor infecțioase la animale*, ediția a IIa, Editura „Terra Nostra” Iași, ISBN: 973-85616-2-0
117. Velthuis A.G.J., Saatkamp H.W., Mourits M.C.M., de Koeijer A.A., Elbars A.R.W., 2010 – *Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007*, Prev.Vet.Med., 93, 294-304
118. Venter Estelle H.; Gerdes T.; Wright Isabel; Terblanche Johan, 2011-*An investigation into the possibility of bluetongue virus transmission by transfer of infected ovine embryos*, Onderstepoort j. vet. res. vol.78 n.1 Pretoria
119. Versteirt V., Balenghien T., Tack W., Wint W., 2017- *A first estimation of Culicoides imicola and Culicoides obsoletus/Culicoides scoticus seasonality and abundance in Europe*, External Scientific Report, VectorNet, DOI 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1182
120. Verwoerd D.W, Erasmus B.J., 2004- *Bluetongue*. In: *Infectious Diseases of Livestock*, Second Edition, Coetzer J.A.W., Tustin R.C., eds. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa, 1201–1220
121. White David M., William C. Wilson, Carol D. Blair and Barry J. Beaty, 2005-*Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects*, Journal of General Virology (2005), 86, 453–462
122. Wilson A., Darpel K., Mallor P.S., 2008- *Where does Bluetongue virus sleep in the winter*, PLOS Biology, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060210>
123. Wilson A., Darpel K., Mellor P. S., 2008- *Where does bluetongue virus sleep in the winter?*, PLoS Biology, 6 (8), e210. doi:10.1371/journal.pbio.0060210. PMC 2525685 . PMID 18752350.)
124. Wilson A.J., Mellor P.S. 2009- *Bluetongue in Europe: past, present and future*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364: 2669-2681.
125. Wouda W., Roumen M.P.H.M., Peperkamp N.H.M.T., Vos J.H., van Garderen E., Muskens J., 2008- *Hydranencephaly in calves following the bluetongue serotype 8 epidemic in the Netherlands*. Vet Rec.;162:422–423. doi: 10.1136/vr.162.13.422-b.
126. Yilma M., Mekonnen M., 2015- *Competitive enzyme linked immuno-sorbent assay (c-ELISA) based sero-prevalence of bluetongue virus (BTV) on small ruminants in selected areas of Wolyita*, Southern Ethiopia. Virol mycol;4:148. doi: 10.4172/2161-0517.1000148.
127. Zimmer J.Y., Brostaux Y., Hauburge E., Francis F., 2014- *Larval development sites of the main Culicoides species (Diptera: Ceratopogonidae) in northern Europe and distribution of coprophilic species larvae in Belgian Pastures*. Veterinary Parasitology;205: 676–86.
128. Zimmer J.Y., Saegerman C., Losson B., Hauburge E., 2010- *Breeding sites of bluetongue virus vectors*, Belgium. Emerging Infectious Diseases;16:575–576.
129. xxx Manualul operational *Bluetongue*, ANSVSA România, 2014- elaborat de Aurelia Ionescu
130. xxx Commission decision CD 2005/393/EC as regards exemptions from the exit for domestic movements of animals from the restricted zones, Official Journal of the European Union L.151/21 <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:151:0021:0022:EN:PDF>
131. xxx Commission regulation (EC) nr.1108-2008 amending Regulation nr.1266-2007 as regard the minimum requirements for bluetongue monitoring and surveillance programmes and the condition for exempting semen from the exit ban provided for in Council Directive 2000/75/EC Official Journal of the European Union L.299/17 <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:299:0017:0022:RO:PDF>
132. xxx European Commission website- *Bluetongue situation in the EU countries*, <https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/>
133. xxx European Commission website, 2017. Home page address: http://ec.europa.eu/food/animals-diseases/control-measures/bluetongue_en.
134. xxx European Commission. Commission Decision 2009/19/EC amending Decision 2008/655/EC as regards the approval of the emergency vaccination plans against bluetongue of certain Member States and increasing the level of the Community's financial contribution for 2007 and 2008. Off. J. European Commission L8, p.31–32.

135. xxxAutoritatea Națională Sanitar Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor (ANSVSA), 2014 - *Analiza de risc Bluetongue*, http://www.ansvsa.ro/download/analize_de_risc/analiza_de_risc_Bluetongue.pdf
136. xxxBluetongue – Europe (51)". International Society for Infectious Diseases. 2007-10-30. Archived from the original on December 26, 2007. Retrieved 2007-10-31.
137. xxxWorld Organisation for Animal Health, 2012-, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris.
138. xxxThe World Organisation for Animal Health (OIE), 2015 - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals , Seventh Edition, Volume 1, ISBN 978-92-9044-879-2
<https://www.oie.int/doc/ged/D12008.PDF>
139. xxxWorld Organisation for Animal Health (OIE), 2018- Self-declaration by Romania on regaining its *Bluetongue* free status, 26.02.2018
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Self-declarations/BTV_Romania_selfdeclaration_
140. xxxThe World Organisation for Animal Health (OIE), 2014- - Report No.33 (Final report): 16654, 02/12/2014 [file:///C:/Users/hp/Downloads/en_fup_0000016654_20141205_102917%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/hp/Downloads/en_fup_0000016654_20141205_102917%20(1).pdf)
141. xxxRaportul special privind Programele de eradicare, control și monitorizare vizând limitarea răspândirii bolilor animalelor, Curtea Europeană de Conturi. 12, rue Alcide De Gasperi 1615 Luxembourg, Print ISBN 978-92-872-4440-6
https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/SR16_06/SR_ANIMAL_DISEASES_RO.pdf
142. xxxWorld Organisation for Animal Health (OIE), 2019 <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/bluetongue/>
143. xxxWorld Organisation for Animal Health (OIE)- Terrestrial Animal Health Code. <http://www.oie.int/fr/normes/code-terrestre/acces-en-ligne/>. Accessed 19 Feb 2019
144. xxx <http://ec.europa.eu>. Accessed 10 oct 2018
145. xxx <http://eubtnet.izs.it/btnet.reports/BTV8.html>. Accessed 12 nov 2018
146. xxx http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Self-declarations/BTV_Romania_selfdeclaration_EN.pdf
147. xxx <https://www.dovepress.com/diagnosing-bluetongue-virus-in-domestic-ruminants-current-perspectives-peer-reviewed-fulltext-article-VMRR#ref58>
148. xxx https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Self-declarations/BTV_Romania_selfdeclaration_
149. xxx https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/reportarchive

Anexa1 / Annex 1

LISTA TABELELOR

LIST OF TABLES

Tabel 1.1.Clasificarea reovirusurilor cu semnificație veterinară (OIE, 2015) /Table 1.1.Classification of reoviruses of veterinary significance (OIE, 2015)	34
Tabel 1.2. Rezistența virusului <i>Bluetongue</i> (Manual OIE, 2005) /Table 1.2. <i>Bluetongue</i> virus resistance (Manual OIE, 2015)	38
Tabel 1.3.Receptivitatea, sursele de infecție și transmiterea în <i>Bluetongue</i> /Table 1.3.Receptivity, sources of infection and transmission in <i>Bluetongue</i>	38
Tabel 1.4.Metode de identificare a virusului <i>Bluetongue</i> și a anticorpilor specifici/Table.1.4.Methods for identifying <i>Bluetongue</i> virus and specific antibodies	50
Tabel 4.1.Distribuția numerică a probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele din județul Galați/Table 4.1.Numerical distribution of blood samples collected from ruminants of the Galați	62
Tabel 4.2. Unitățile țință de asistență sanitară veterinară conform Programului Național de Supraveghere a <i>Bluetongue</i> (Ord.35/2016)/Table 4.2. The veterinary assistance units according to the National <i>Bluetongue</i> Surveillance Program (Ord.35 / 2016).	62
Tabel 4.3. Distribuția probelor prelevate și testate ELISA, în județul Galați, 2014-2017/Table 4.3.Distribution of samples collected and tested by assays ELISA, in Galați, between 2014-2017	68
Tabel 4.4. Seroprevalența BTV la rumegătoarele din județul Galați, în perioada 2014-2017 /Table 4.4.BTV seroprevalence in ruminants from Galati , between 2014-2017	68
Tabel 4.5. Distribuția numerică a probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele din județul Vrancea	73
Tabel 4.6. Unitățile țință de asistență sanitară veterinară conform Programului Național de Supraveghere a <i>Bluetongue</i> (Ord.35/2016)/Table 4.6.The veterinary assistance units according to the National <i>Bluetongue</i> Surveillance Program (Ord.35 / 2016).	73
Tabel 4.7. Distribuția probelor prelevate și testate ELISA, în județul Vrancea, în 2014-2017/Table 4.7.Distribution of samples collected and tested by assays ELISA, in Vrancea, between 2014-2017	76
Tabel 4.8. Seroprevalența BTV la rumegătoarele din județul Vrancea, în perioada 2014-2017/Table 4.8.BTV seroprevalence in ruminants from Vrancea, between 2014-2017	76
Tabel 4.9. Distribuția numerică a probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele din județul Brăila/Table 4.9.Numerical distribution of blood samples collected from ruminants of the Brăila	81
Tabel 4.10.Unitățile țință de asistență sanitară veterinară conform Programului Național de Supraveghere a <i>Bluetongue</i> (Ord.35/2016)/Table 4.10.The veterinary assistance units according to the National <i>Bluetongue</i> Surveillance Program (Ord.35 / 2016)	81
Tabel 4.11. Distribuția probelor prelevate și testate ELISA, în județul Brăila, 2014-2017/Table 4.11.Distribution of samples collected and tested by assays ELISA, in Brăila, between 2014-2017	82
Tabel 4.12 Seroprevalența BTV la rumegătoarele din județul Brăila, în perioada 2014-2017/Table 4.12.BTV seroprevalence in ruminants from Brăila, between 2014-2017	83
Tabel 4.13. Distribuția numerică a probelor de sânge prelevate de la rumegătoarele din județul Tulcea/Table 4.13.Numerical distribution of blood samples collected from ruminants of the Tulcea	87
Tabel 4.14. Unitățile țință de asistență sanitară veterinară conform Programului Național de Supraveghere a <i>Bluetongue</i> (Ord.35/2016)/Table 4.14.The veterinary assistance units according to the National <i>Bluetongue</i> Surveillance Program (Ord.35 / 2016).	88
Tabel 4.15 Distribuția probelor prelevate și testate ELISA, în județul Tulcea,2014-2017/ Table 4.15.Distribution of samples collected and tested by assays ELISA, in Tulcea, between 2014-2017	90
Tabel 4.16. Seroprevalența BTV la rumegătoarele din județul Tulcea, în perioada 2014-2017/Table 4.16. BTV seroprevalence in ruminants from Tulcea, between 2014-2017	91
Tabel 5.1 Distribuția numerică a animalelor seropozitive la BTV și testate prin examen virologic/Table.5.1.Numerical distribution of BTV seropositive animals and tested by virological examination	97
Tabel 5.2. Rezultatele examenului virologic efectuat prin <i>Real Time-RT-PCR</i> , județul Vrancea, 2014-2017/Table 5.2. The results of the virological examination, carried out by <i>Real Time-RT-PCR</i> , Vrancea, 2014-2017	102
Tabel 5.4. Rezultatele examenului virologic efectuat prin <i>Real Time-RT-PCR</i> , Galați, 2014-2017/Table 5.4.Results of the virological examination carried out by <i>Real-time RT-PCR</i> , Galați, 2014-2017	104
Tabel 5.5. Rezultatele examenului virologic efectuat prin <i>Real Time-RT-PCR</i> , județul Brăila, 2014-	106
	183

2017/	Table 5.5. Results of the virological examination carried out by <i>Real-time RT-PCR</i> , Galați, 2014-2017	
Tabel 5.6	Rezultatele examenului virusologic efectuat prin <i>Real Time-RT-PCR</i> , județul Tulcea, 2014-2017/	
Table 5.6.	Results of the virological examination carried out by <i>Real-time RT-PCR</i> , in Tulcea, 2014-2017	108
Tabel 6.1.	Distribuția numerică a animalelor cu semne clinice suspicinate de infecție cu BTV/	
Table.6.1.	Numerical distribution of animals with clinical aspects suspected of BTV infection	114
Tabel 6.2	Incidența semnelor clinice specifice infecției cu virusul <i>Bluetongue</i> , la bovine/	
Table 6.2.	The incidence of clinical signs specific to <i>Bluetongue</i> virus infection in cattle	115
Tabel 6.3.	Incidența leziunilor anatomopatologice specifice infecției cu virusul <i>Bluetongue</i> , la bovine/	
Table 6.3.	The incidence of anatomopathological lesions specific to infection with <i>Bluetongue</i> virus in cattle	119
Tabel 6.4.	Incidența semnelor clinice specifice infecției cu virusul <i>Bluetongue</i> , la ovine/	
Table 6.4.	The incidence of clinical signs specific to <i>Bluetongue</i> virus infection in sheep	120
Tabel 6.5.	Incidența semnelor clinice specifice infecției cu virusul <i>Bluetongue</i> , la caprine/	
Table 6.5.	The incidence of anatomopathological lesions specific to infection with <i>Bluetongue</i> virus in the goats	123
Tabel 7.1.	Coordonatele GPS ale localităților cu capcane permanente /	
Table 7.1.	GPS coordinates of localities with permanent traps	129
Tabel 7.2.	Situația supravegherii vectorilor în județul Vrancea/	
Table 7.2.	The situation of vector surveillance in Vrancea county	132
Tabel 7.3.	Coordonatele GPS ale localităților cu capcane permanente, în județul Brăila /	
Table 7.3.	GPS coordinates of localities with permanent traps, in Brăila	139
Tabel 7.4.	Situația supravegherii vectorilor în județul Brăila/	
Table 7.4.	The situation of vector surveillance in Braila county	140
Tabel 7.5.	Coordonatele GPS ale localităților cu capcane fixe și mobile din județul Galați /	
Table 7.5.	GPS coordinates of localities with fixed and mobile traps in Galați County	147
Tabel 7.6.	Situația supravegherii entomologice, în județul Galați/	
Table 7.6.	The situation of entomological supervision in Galați	148
Tabel 7.7.	Coordonatele GPS ale localităților cu capcane fixe și mobile din județul Tulcea/	
Table 7.7.	GPS coordinates of localities with fixed and mobile traps in Tulcea County	155
Tabel 7.8.	Situația supravegherii entomologice, în județul Tulcea/	
Table 7.8.	The situation of entomological surveillance, in Tulcea county	156
Tabel 7.9.	Prevalența insectelor culicoide în perioada 2014-2017 /	
Table 7.9.	The incidence of culicoid insects in 2014-2017	164

Anexa 2/ Annex 2

LISTA FIGURILOR

LIST OF FIGURES

Fig.1.1. Distribuția geografică a serotipurilor de virus BT și vectorii majori transmitători (FAD PreP - BTV, USDA, 2016)/Fig. 1.1. Geographic distribution of BT virus serotypes and major transmitting vectors	39
Fig.1.2. Metoda de hrănire a culicoidelor (Toby Dix St George)/Fig.1.2. Midges feeding method (Toby Dix St George)	40
Fig.1.3. Ciclul de transmitere a virusului de la vector la animalele receptive (adaptat după Purse ș.a.2005)/. Fig.1.3. BTV-vector-borne transmission cycle (adapted from Purse ș.a.2005)	40
Fig. 1.4. Posibile exemple de overwintering(după A Wilson , Darpel K, Mallor PS 2008)/Fig. 1.4. Possible examples of overwintering (Wilson and al., 2008)	41
Fig. 1.5. Transmiterea BTV în sezonul cald și rece (dupăWilson ș.a., 2008)/Fig. 1.5. The transmission of BTV in summer and winter (Wilson and al., 2008)	42
Fig.1.6 Posibilitățile replicării virusului <i>Bluetongue</i> :virus-gazda nevertebrată-gazda vertebrată/fig.1.6 Possibilities of <i>Bluetongue</i> virus replication: virus- invertebrate host-vertebrate host	43
Fig.1.7. Ciclul de transmitere a virusului pe gazde nevertebrate(Bethan V. Purse si col., 2005)/Fig.1.7. The cycle of transmission of the virus on invertebrate hosts	45
Fig.1.8. Ciclul de transmitere a virusului pe gazde vertebrate(Bethan V. Purse si col., 2005)/Fig. 1.8. Virus transmission cycle on vertebrate hosts ((Bethan V. Purse et.al., 2005)	45
Fig.2.1. Harta epidemiologică a Europei cu zonele afectate de virusul <i>Bluetongue</i> , în septembrie 2014 (http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/control-measures/bt-restrictedzones-map.jpg)/Fig.2.1. Epidemiological map of Europe with areas affected by the <i>Bluetongue</i> virus, in September 2014	53
Fig. 4.1. Distribuția teritorială a Circumscripțiilor Sanitar Veterinare de asistență țintă, în județele Galați, Brăila, Vrancea, Tulcea/fig. 4.1.Territorial distribution of veterinary units in the Galați, Brăila, Vrancea, Tulcea	61
Fig. 4.2. Modelul de distribuție al probelor în godeuri/fig.4.2. Distribution model of the samples in the wells	65
Fig. 4.3. Repartizarea martorilor/fig.4.3.Distribution of witnesses	65
Fig. 4.4. Incubarea plăcilor/fig.4.4. Incubation of plates	65
Fig. 4.5. Repartizarea conjugatului/fig.4.5. Distribution of the conjugate	65
Fig. 4.6.Aspectul plăcilor ELISA după adăugarea substratului TMB/fig. 4.6. The appearance of the ELISA plates after addition of TMB	66
Fig. 4.7. Aspectul plăcilor ELISA după blocarea reacției/fig. 4.7. The appearance of ELISA plates after blocking the reaction	66
Fig.4.8. Valorile densității optice obținute în urma citirii la spectrofotometru pentru kitul ELISA Pourquier de competiție/fig.4.8. Optical density values obtained after reading the spectrophotometer - ELISA Pourquier de competition	67
Fig. 4.9.Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Galați, în perioada 2014-2017/fig.4.9.Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Galați County, between 2014-2017	69
Fig. 4.10.Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Galați, în 2014/fig.4.10. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Galați County, in 2014	69
Fig.4.11. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Galați, în 2015/fig.4.11. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Galați County, in 2015	70
Fig.4.12. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă din județul Galați, în 2016/fig.4.12. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals, in Galați County, in 2016	70
Fig.4.13 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă din județul Galați, în 2017/fig.4.13. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Galați County, in 2017	71
Fig. 4.14. Evoluția seroprevalenței anticorpilor anti-BTV în perioada 2014-2017, în Galați/fig.4.14. Evolution of the seroprevalence of anti-BTV antibodies, between 2014-2017, in Galați	71

Fig.4.15. Valorile densității optice obținute în urma citirii la spectrofotometru cu kitul cELISA VMRD/	
Fig.4.15. Optical density values obtained after reading the spectrophotometer (ELISA VMRD-Bluetongue antibody)	75
Fig.4.16. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Vrancea, în perioada 2014-2017/	
Fig.4.16. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Vrancea, between 2014-2017	77
Fig. 4.17. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Vrancea, în 2014/	
Fig.4.17. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Vrancea, in 2014	77
Fig.4.18 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Vrancea, în 2015/	
Fig.4.18. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Vrancea, in 2015	78
Fig. 4.19. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă din județul Vrancea, în 2016/	
Fig.4.19. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Vrancea, in 2016	78
Fig.4.20. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă din județul Vrancea, în 2017/	
Fig.4.20. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Vrancea, in 2017	79
Fig. 4.21. Evoluția seroprevalenței anticorpilor anti-BTV în perioada 2014-2017, în Vrancea/	
Fig.4.21. Evolution of the seroprevalence of anti-BTV antibodies, between 2014-2017, in Vrancea	79
Fig.4.22. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Brăila, în perioada 2014-2017/	
Fig.4.22. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Brăila, between 2014-2017	83
Fig.4.23. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și cu suspiciuni de boală, din județul Brăila, în 2014/	
Fig.4.23. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Brăila, in 2014	84
Fig. 4.24. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și cu suspiciuni de boală, din județul Brăila, în 2015/	
Fig.4.24. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Brăila, in 2015	84
Fig.4.25. Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă, din județul Brăila, în 2016/	
Fig.4.25. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Brăila, in 2016	85
Fig.4.26 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă, din județul Brăila, în 2017/	
Fig.4.26. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Brăila, in 2017	85
Fig. 4.27. Evoluția seroprevalenței anticorpilor anti-BTV în perioada 2014-2017, în Brăila	
Fig.4.27. Evolution of the seroprevalence of anti-BTV antibodies, between 2014-2017, in Brăila	85
Fig.4.28 Valorile densității optice obținute în urma citirii la spectrofotometru utilizând kitul ELISA “Dubla Recunoastere-INGEZIM BTV DR/ INGENASA/	
Fig.4.28. Optical density values obtained after reading the spectrophotometer -ELISA INGEZIM BTV DR/ INGENASA	89
Fig. 4.29 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și la animalele cu suspiciune de boală din județul Tulcea, în perioada 2014-2017/	
Fig.4.29. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Tulcea, between 2014-2017	91
Fig. 4.30 Seroprevalența Atc. anti BTV la animalele santinelă și cu suspiciuni de boală, din județul Tulcea, în 2014/	
Fig.4.30. Seroprevalence Atc.- anti BTV in sentinel animals and animals of suspected <i>Bluetongue</i> , in Tulcea, in 2014	91
Fig.4.31. Evoluția seroprevalenței Atc anti-BTV, în perioada 2014-2017/	
Fig.4.31. Evolution of the seroprevalence of anti-BTV antibodies, between 2014-2017	93
Fig.5.1. Diagrama flux pentru supravegherea bolii limbii albastre (adaptare după Manualul de diagnostic <i>Bluetongue</i> , 2010)/	
Fig.5.1. Flowchart for <i>Bluetongue</i> disease surveillance (adapted from <i>Bluetongue</i> Diagnostic Manual, 2010)	98
Fig.5.2. Cuplarea mixului cu probele de ADN/	
Fig.5.2. Coupling the mix with DNA samples	100
Fig. 5.3. Sistemul 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) /	
Fig. 5.3. 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	100
Fig.5.4. Real time-RT-PCR - Aspectul curbele de amplificare în timp real a materialului genetic (calibrarea programului)/	
Fig.5.4. Real time-RT-PCR - Appearance of real-time amplification curves of genetic material (program calibration)	101
Fig.5.5. Real time-RT-PCR Aspectul curbelor de amplificare la testarea probelor biologice: probele	101

pozitive au un CT sub cel al maritorilor E+ și C+./Fig.5.5. <i>Real time-RT-PCR</i> -Aspects of amplification curves when testing biological samples: positive samples have a CT below the E + and C + controls.	
Fig.5.6. Distribuția numerică a probelor prelevate de la animalele seropozitive pentru BTV și testate prin <i>Real-Time RT-PCR</i> , în Vrancea, perioada 2014-2017/ Fig.5.6. Numerical distribution of samples collected from BTV seropositive animals and tested by Real-Time RT-PCR, in Vrancea, 2014-2017	102
Fig.5.7. Incidența virusului <i>Bluetongue</i> identificat prin <i>Real Time-RT-PCR</i> , în județul Vrancea, 2014-2017/ Fig.5.7. The incidence of <i>Bluetongue</i> virus identified by <i>Real-Time RT-PCR</i> , in Vrancea, 2014-2017	103
Fig.5.8. Distribuția numerică a probelor prelevate de la animalele seropozitive pentru BTV și testate prin <i>Real-Time RT-PCR</i> , în județul Galați, perioada 2014-2017/ Fig.5.8. Numerical distribution of samples collected from BTV seropositive animals and tested by Real-Time RT-PCR, in Galați, 2014-2017	104
Fig.5.9. Incidența virusului <i>Bluetongue</i> identificat prin <i>Real Time-RT-PCR</i> , Galați, 2014-2017	
Fig.5.9. The incidence of <i>Bluetongue</i> virus identified by <i>Real-time RT-PCR</i> , in Galați, 2014-2017	105
Fig. 5.10. Distribuția numerică a probelor prelevate de la animalele seropozitive pentru BTV și testate prin <i>Real-Time RT-PCR</i> , în județul Brăila, perioada 2014-2017/ Fig.5.10. Numerical distribution of samples collected from BTV seropositive animals and tested by Real-Time RT-PCR, in Brăila, 2014-2017	106
Fig.5.11. Incidența virusului <i>Bluetongue</i> identificat prin <i>Real Time-RT-PCR</i> , în județul Brăila, 2014-2017/ Fig.5.11. The incidence of <i>Bluetongue</i> virus identified by <i>Real-time RT-PCR</i> , in Brăila, 2014-2017	107
Fig.5.12. Distribuția numerică a probelor prelevate de la animalele seropozitive pentru BTV și testate prin <i>Real-Time RT-PCR</i> , în județul Tulcea, perioada 2014-2017/ Fig.5.12. Numerical distribution of samples collected from BTV seropositive animals and tested by Real-Time RT-PCR, in Tulcea, 2014-2017	107
Fig.5.13. Incidența virusului <i>Bluetongue</i> identificat prin <i>Real Time-RT-PCR</i> , în județul Tulcea, 2014-2017/ Fig.5.13. The incidence of <i>Bluetongue</i> virus identified by <i>Real-time RT-PCR</i> , in Tulcea, 2014-2017	108
Fig.6.1. Repartiția animalelor cu suspiciune de <i>Bluetongue</i> / Fig 6.1. The numerical distribution of ruminant with suspicion of <i>Bluetongue</i>	112
Fig.6.2. Incidența animalelor care au prezentat semne clinice specifice infecției cu BTV, în perioada 2014-2017/ Fig.6.2 Incidence of animals with clinical signs specific to BTV infection, 2014-2017	114
Fig. 6.3. Distribuția cazurilor cu aspecte clinice de <i>Bluetongue</i> : a. 2014; b. 2015/ Fig. 6.3. Distribution of clinical cases with <i>Bluetongue</i> : a. 2014; b. 2015	115
Fig. 6.4. Reprezentarea grafică a incidenței semnelor clinice specifice infecției cu virusul <i>Bluetongue</i> , la bovine/ Fig.6.4. Graphical representation of the incidence of clinical signs specific to <i>Bluetongue</i> virus infection in cattle	116
Fig.6.5. Hiperemia mucoasei conjunctivale și epiforă/ Fig.6.5. Hyperemia of the conjunctival mucosa, and epiphora	116
Fig.6.6. Hiperemia conjunctivală/ Fig.6.6. Hyperemia of the conjunctival mucosa	116
Fig.6.7. Sialoree și edem nazal la bovine/ Fig.6.7. Hepersalivation and nasal edema in cattle	117
Fig. 6.8. Edem și ulcerații nazale/ Fig. 6.8. Edema and nasal ulcers	116
Fig.6.9. Ulcerații gingivale la bovine/ Fig.6.9. Gingival ulcers in cattle	116
Fig. 6.10. Tumefierea și cianoza limbii/ Fig. 6.10. Swollen and cyanosis of the tongue	116
Fig. 6.11. Necroze localizate la nivelul ugerului / Fig.6.11. Necrosis located on the udder	116
Fig. 6.12. Necroze și ulcerații localizate la nivelul ugerului/ Fig.6.12. Necrosis and ulcerations located on the udder	117
Fig. 6.13. Necroze și cruste localizate la nivelul ugerului / Fig.6.13. Necrosis and scabs located on the udder	118
Fig.6.14. Imposibilitatea deplasării datorită afectării zonei coronare/ Fig.6.14. The impossibility of moving due to damage to the coronary area	118
Fig. 6.15. Diaree și ulcere decubitale / Fig. 6.15. Diarrhea and decubital ulcers	118
Fig.6.16. Inflamații vulvare/ Fig.6.16. Vulvar inflammation	118
Fig. 6.17. Reprezentarea grafică a incidenței semnelor clinice specifice infecției cu virusul <i>Bluetongue</i> , la bovine/ Fig.6.17. Graphical representation of the incidence of clinical signs specific to <i>Bluetongue</i> virus infection, in the cattle	119
Fig.6.18. Hemoragii în țesutul subcutanat / Fig.6.18. Hemorrhage in subcutaneous tissue	120
Fig.6.19. Hipertrofie splenică cu hemoragii multifocale/ Fig.6.19. Splenic hypertrophy with multifocal hemorrhage	120

Fig. 6.20.Reprezentarea grafică a incidenței semnelor clinice specifice infecției cu virusul <i>Bluetongue</i> , la ovine/ Fig.6.20. Graphical representation of the incidence of clinical signs specific to <i>Bluetongue</i> virus infection in sheep	120
Fig. 6.21. Stare de prostrație și torticolis la ovine cu <i>Bluetongue</i> /Fig.6.21.Deviation and torticollis in sheep with <i>Bluetongue</i>	121
Fig.6.22. Jetaj mucopurulent/ Fig. 6.22. Mucopurulent secretions	122
Fig.6.23. Edem și ulceratii nazale/ Fig.6.23. Edema and nasal ulcers	122
Fig.6.24. Cianoza mucoasei bucale și ulceratii ale buzelor /Fig.6.24. Oral mucosal cyanosis and lip ulceration	123
Fig. 6.25.Sialoree la ovine/ Fig.6.25. Excess salivation in sheep	123
Fig. 6.26. Tumefierea și cianoza limbii(limba albastră)/ Fig. 6.26. Swelling and cyanosis of the tongue(blue tongue)	123
Fig. 6.27.Reprezentarea grafică a incidenței semnelor clinice specifice infecției cu virusul <i>Bluetongue</i> , la caprine /Fig.6.27. Graphical representation of the incidence of clinical signs specific to <i>Bluetongue</i> virus infection in the goats	124
Fig.7.1. Harta distribuției arealului climatic specific pentru supraviețuirea vectorilor culicoizi în România, anterior anului 2014(OIE, 2017)/Fig.7.1. Map of the distribution of the specific climatic area for the survival of culicoid vectors in Romania, prior to 2014 (OIE, 2017).	127
Fig. 7.2. Harta cu locațiile capcanelor permanente/ Fig. 7.2. Map with locations of permanent traps	129
Fig.7.3. Capcane fixe, amplasate în interiorul adăposturilor de animale/ Fig.7.3. Fixed traps, located inside the animal shelters	130
Fig. 7.4. Examinarea culicoizilor capturați (a și b)/ Fig. 7.4. Examination of captured culicoids (a and b)	131
Fig.7.5.. Identificarea și sortarea speciilor de <i>Culicoides</i> pe baza morfologiei/ Fig.7.5 . Identification and sorting of <i>Culicoides</i> species based on morphology	131
Fig. 7.6. Probe de culicoizi suspendate în TFS cu antibiotic/ Fig. 7.6. Samples of culicoids suspended in TFS with antibiotic	131
Fig.7.7.Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2014, în județul Vrancea/ Fig.7.7 Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2014, in Vrancea county	132
Fig.7.8.Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2014, județul Vrancea/ Fig.7.8 Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values from 2014, Vrancea	133
Fig.7.9.Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2015, în județul Vrancea/ Fig.7.9 Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2015, in Vrancea	133
Fig.7.10. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2015, județul Vrancea/ Fig.7.10. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2015, Vrancea	134
Fig.7.11.Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2016, în județul Vrancea/ Fig.7.11. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2016, in Vrancea	135
Fig.7.12. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2016, județul Vrancea/ Fig.7.12. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2016, Vrancea	135
Fig.7.13.Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2016, în județul Vrancea/ Fig.7.13. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2016, in Vrancea	136
Fig.7.14. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2017, județul Vrancea/ Fig.7.14. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2017, Vrancea county	136
Fig. 7.15. Tendința de descreștere lineară a densității speciilor de <i>Culicoides</i> în județul Vrancea/ Fig. 7.15. The trend of linear decrease of the density of <i>Culicoides</i> species in Vrancea	137
Fig. 7.16. Incidența și tendința de evoluție a speciilor de <i>Culicoides</i> în perioada 2014-2017, în județul Vrancea/ Fig. 7.16. Incidence and evolution trend of <i>Culicoides</i> species in 2014-2017, in Vrancea	137
Fig. 7.17. Harta cu locațiile capcanelor permanente în județul Brăila/ Fig. 7.17. Map of the locations of permanent traps in Brăila County	139
Fig.7.18. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2014, în județul Brăila/ Fig.7.18. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2014, in Braila	140
Fig.7.19. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2014, județul Brăila/ Fig.7.19. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values from 2014, Brăila	141
Fig.7.20. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2015, în județul	141

Brăila Fig.7.20. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2015, in Braila	
Fig.7.21. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2015, județul Brăila / Fig.7.21. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to thermal values of 2015, Brăila	142
Fig.7.22. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2016, în județul Brăila Fig.7.22. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2016, in Braila	142
Fig.7.23. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2016, județul Brăila/ Fig.7.23. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2016, Brăila county	143
Fig.7.24. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2017, în județul Brăila Fig.7.24. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2017, in Braila	143
Fig.7.25. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2017, județul Brăila/ Fig.7.25. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2017, Brăila	144
Fig. 7.26. Tendința de descreștere lineară a densității speciilor de <i>Culicoides</i> în județul Brăila Fig. 7.26. Trend of linear decrease of <i>Culicoides</i> species density in Braila	144
Fig. 7.27. Incidența și tendința de evoluție a speciilor de <i>Culicoides</i> în perioada 2014-2017, în județul Brăila/ Fig. 7.27. Incidence and evolution trend of <i>Culicoides</i> species in the period 2014-2017, in Brăila	145
Fig. 7.28. Harta cu locațiile capcanelor fixe și mobile, în județul Galați / Fig. 7.28. Map with the locations of fixed and mobile traps, in Galați County	147
Fig.7.29 Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2014, în județul Galați Fig.7.29 Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2014, in Galați county	148
Fig.7.30. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2014, județul / Fig.7.30. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values from 2014, Galați	149
Fig.7.31. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2015, în județul Galați Fig.7.31. Distribution of the <i>Culicoides</i> species identified in 2015, in Galați County	149
Fig.7.32. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2015, județul Galați/ Fig.7.32. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2015, Galați County	150
Fig.7.33. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2016, în județul Galați Fig.7.33. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2016, in Galați	150
Fig.7.34. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2016, județul Galați Fig.7.34. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to thermal values in 2016, Galați County	151
Fig.7.35. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2017, în județul Galați Fig.7.35. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2017, in Galați county	151
Fig.7.36. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2017, județul Galați/ Fig.7.36. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2017, Galați	152
Fig. 7.37. Tendința de creștere lineară a densității speciilor de <i>Culicoides</i> în județul Galați/ Fig. 7.37. Trend of linear increase of <i>Culicoides</i> species density in Galați County	152
Fig.7.38 Incidența și tendința de evoluție a speciilor de <i>Culicoides</i> în perioada 2014-2017, în județul Galați/ Fig.7.38 Incidence and evolution trend of <i>Culicoides</i> species in 2014-2017, in Galați County	153
Fig. 7.39. Harta cu locațiile capcanelor fixe și mobile, în județul Tulcea/ Fig. 7.39. Map with the locations of fixed and mobile traps, in Tulcea county	155
Fig. 7.40. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2014, în județul Tulcea/ Fig. 7.40. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2014, in Tulcea County	156
Fig.7.41 Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2014, județul Tulcea/ Fig.7.41 Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values from 2014, Tulcea county	157
Fig.7.42. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2015, în județul Tulcea Fig.7.42. Distribution of the <i>Culicoides</i> species identified in 2015, in Tulcea county	157
Fig.7.43 Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2015, județul Tulcea/ Fig.7.43 Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values from 2015, Tulcea county	158
Fig.7.44. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2016, în județul Tulcea Fig.7.44. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2016, in Tulcea county	159
Fig.7.45. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2016,	159

județul Tulcea/	Fig.7.45. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2016, Tulcea County	
Fig.7.46. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> identificate în anul 2017, în județul Tulcea/	Fig.7.46. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species identified in 2017, in Tulcea county	160
Fig.7.47. Distribuția grafică a speciilor de <i>Culicoides</i> în raport cu valorile termice din anul 2017, județul Tulcea/	Fig.7.47. Graphical distribution of <i>Culicoides</i> species in relation to the thermal values of 2017, Tulcea county	160
Fig. 7.37. Tendința de descreștere lineară a densității speciilor de <i>Culicoides</i> în județul Tulcea/	Fig. 7.37. Trend of linear decrease in <i>Culicoides</i> species density in Tulcea County	161
Fig.7.38 Incidența și tendința de evoluție a speciilor de <i>Culicoides</i> în perioada 2014-2017, în județul Galați/	Fig.7.38 The incidence and evolution trend of <i>Culicoides</i> species in the period 2014-2017, in Galați County	161
Fig. 7.39 Reprezentarea grafică comparativă a densității insectelor <i>Culicoides</i> , în perioada 2014-2017/	Fig. 7.39 Comparative graphical representation of the density of <i>Culicoides</i> insects in the period 2014-2017	164
Fig. 7.40. Reprezentarea grafică comparativă a incidenței speciilor <i>Culicoides</i> în perioada 2014-2017/	Fig. 7.40. Comparative graphical representation of the incidence of <i>Culicoides</i> species in the period 2014-2017	165
Fig. 7.41. Nomograma de distribuție anuală și evoluție a celor mai importante specii vectoriale: <i>Culicoides obsoletus</i> și <i>Culicoides pulicaris</i> , în arealul studiat/	Fig. 7.41. Annual distribution nomogram and evolution of the most important vector species: <i>Culicoides obsoletus</i> and <i>Culicoides pulicaris</i> , in the studied area	165
Fig. 7.43. Tendința polinomială și de previziune a speciei <i>C. obsoletus</i> , în regiunea Sud-Est a României, 2014-2017/	Fig. 7.43. The polynomial and forecast trend of the species <i>C. obsoletus</i> , in the South-East region of Romania, 2014-2017	166
Fig.7.44 Tendința polinomială și de previziune a speciei <i>C. pulicaris</i> , în regiunea Sud-Est a României, 2014-2017/	Fig.7.44 The polynomial and forecast trend of the species <i>C. pulicaris</i> , in the South-East region of Romania, 2014-2017	166
Fig. 7.45. Tendința polinomială și de previziune a speciei <i>C. nubeculosus</i> , în regiunea Sud-Est a României, 2014-2017/	Fig. 7.45. The polynomial and forecast trend of the species <i>C. nubeculosus</i> , in the South-East region of Romania, 2014-2017	167
Fig.7.46. Tendința polinomială și de previziune a speciilor non vectoriale, în regiunea Sud-Est a României, 2014-2017/	Fig.7.46. The polynomial and forecast trend of non-vector species, in the South-East region of Romania, 2014-2017	167

ABREVIERI ABBREVIATIONS

BTV- virusul *Bluetongue*
 IDSA- *Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală*
 RT/PCR- *Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays*
 OIE- *Organizația Mondială pentru Sănătatea Animală*
 EHD- *Epizootic haemorrhagic disease*
 EEE- *Equine encephalosis virus*
 AHS - *African horse sickness*
 VP7- *proteina virală majoră*
 BHK 21- *Linie celulară de hamster tânăr*
 VERO- *linie celulară din rinichi de maimuță verde africană*
 i-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)- *testul imunoenzimatic indirectă*
 c-ELISA – *ELISA de competiție*
 MIA- *testul de imunoanaliză a microsferelor*
 VNT- *testul de seroneutralizare a virusului*
 E.C.- *Comisia Europeană*
 DSVSA- *Direcția Sanitar Veterinară și pentru Siguranța animalelor*
 ANSVSA *Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor*
 SP- *supraveghere serologică*
 SB- *suspiciuni de boală*
 EDTA- *Acidul etilendiaminotetraacetic*
 DO- *densitate optică*
 Atc- *anticorpi*
 VR- *Vrancea,*
 GL- *Galați,*
 BR- *Brăila,*
 TL- *Tulcea*

LISTA LUCRĂRILOR

Prim autor- Lucrări științifice indexate BDI

1. **Samson (Tudose) Ana**, Rîmbu Cristina, Carp-Cărare C., Tudose A., Cozma Andreea, Carp-Cărare M., 2018- *Serological supervision of Buetongue disease in the South-East region of Romania*, Conferința Internațională de Științele Vieții. „Animal breeding and pathology to day”Scientifical Papers Veterinary Medicine Timișoara, vol. LI 3, pag.89-97, ISSN 1221-5295,[https://www.usab-tm.ro/utilizatori/medicinaveterinara/Volum%20LI%20\(3\)%202018\(1\).pdf](https://www.usab-tm.ro/utilizatori/medicinaveterinara/Volum%20LI%20(3)%202018(1).pdf)

2. **Samson (Tudose) Ana**, Rîmbu Cristina, Carp-Cărare C., Tudose A., Horhogeia Cristina, Carp-Cărare M., 2018 - *Virological supervision of Bluetongue disease in the South-East region of 'Romania*, Lucrări științifice Medicină Veterinară Iași, vol. 61 (4), p.244-248, on -line ISSN 2393 – 4603, ISSN–L 1454 – 7406