

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD,, IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE**

**Doctorand,
Emilia ION (POPA)**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Gheorghe SAVUȚA**

**IAȘI
2017**

**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND
VETERINARY MEDICINE
"ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION INFECTIOUS DISEASES**

**PhD student,
Emilia ION (POPA)**

DOCTORAL THESIS

**PhD Manager
Prof. Gheorghe SAVUȚA, PhD**

**IAȘI
2017**

TEZĂ DE DOCTORAT

**EPIDEMIOLOGIA ȘI DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR CU
PESTIVIRUSURI ÎN ZONA DE EST A ROMÂNIEI**

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Gheorghe SAVUȚA**

**Doctorand,
Emilia ION(POPA)**

**IAȘI
2017**

DOCTORAL THESIS

EPIDEMIOLOGY AND DIAGNOSIS OF PESTIVIRUS INFECTIONS IN EASTERN ROMANIA

PhD Manager
Prof. Gheorghe SAVUȚA, PhD

PhD student,
Emilia ION (POPA)

IAȘI
2017

CUPRINS

ABREVIERI.....	11
LISTA TABELELOR.....	13
LISTA FIGURILOR.....	18
INTRODUCERE.....	22
REZUMAT.....	28

PARTEA I – STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. CARACTERE GENERALE ALE PESTIVIRUSURILOR.....	46
1.1. Filogenie, clasificare și evoluția pestivirusurilor.....	46
1.2. Organizarea genomului la pestivirusuri.....	50
1.3. Structură, morfologie și antigenitate.....	52
1.4. Replicarea pestivirusurilor.....	54
CAPITOLUL II. INFECȚII CU PESTIVIRUSURI LA ANIMALE.....	56
2.1. Pesta porcină clasică.....	57
2.1.1. Definiție.....	57
2.1.2. Etiopatogeneză.....	57
2.1.3. Epidemiologie.....	58
2.1.4. Aspecte morfoclinice.....	59
2.1.5. Diagnostic diferențial.....	61
2.2. Diareea virală - boala mucoaselor.....	62
2.2.1. Definiție.....	62
2.2.2. Etiopatogeneză.....	62
2.2.3. Epidemiologie.....	62
2.2.4. Aspecte morfoclinice.....	63
2.2.5. Diagnostic diferențial.....	65
2.3. Boala Border.....	65
2.3.1. Definiție.....	65

2.3.2. Etiopatogeneză.....	65
2.3.3. Epidemiologie.....	67
2.3.4. Aspecte morfoclinice.....	67
2.3.5. Diagnostic diferențial.....	69
CAPITOLUL III. INFECȚIA SUINELOR DOMESTICE ȘI SĂLBATICE CU PESTIVIRUSURI DE LA RUMEGĂTOARE.....	70
CAPITOLUL IV. DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR CU PESTIVIRUSURI LA ANIMALE.....	73
4.1. Diagnosticul serologic.....	73
4.2. Diagnosticul virusologic.....	73
4.2.1. Metode de izolare și cultivare ale pestivirusurilor.....	74
4.2.2. Identificarea pestivirusurilor utilizând metode imunologice.....	75
4.2.3. Identificarea pestivirusurilor utilizând tehnicile de biologie moleculară.....	76

PARTEA A II A - CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL V. INVESTIGAȚII SEROEPIDEMIOLOGICE ASUPRA INFECȚIEI CU VIRUSUL PESTEI PORCINE CLASICE.....	80
5.1. Anchetă seroepidemiologică privind pesta porcină clasică la suinele domestice în estul României.....	80
5.1.1. Material și metode (descrierea metodelor utilizate în vederea detecției anticorpilor).....	81
5.1.2. Rezultate și discuții.....	82
5.1.3. Concluzii parțiale.....	89
5.2. Anchetă seroepidemiologică privind pesta porcină clasică la mistreți în estul României.....	89
5.2.1. Material și metode.....	90
5.2.2. Rezultate și discuții.....	90
5.2.3. Concluzii parțiale.....	97
CAPITOLUL VI. CERCETĂRI PRIVIND DETECȚIA VIRUSULUI PESTEI PORCINE CLASICE.....	98
6.1. Investigații privind detecția virusului pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și	

mistreți.....	98
6.1.1. Material și metode.....	101
6.1.2. Rezultate și discuții.....	101
6.1.3. Concluzii parțiale.....	107
6.2. Investigații privind detecția virusului pestei porcine clasice prin tehnici de biologie moleculară la suinele domestice și mistreți.....	108
6.2.1. Material și metode.....	108
6.2.2. Rezultate și discuții.....	113
6.2.3. Concluzii parțiale.....	119
6.3. Testele de diferențiere în cazul vaccinării de urgență împotriva pestei porcine clasice.....	119
6.4.Principiile, utilizarea testelor serologice și evaluarea rezultatelor acestora.....	120
6.5. Principiile, utilizarea testelor virusologice și evaluarea rezultatelor acestora.....	124
CAPITOLUL VII. CERCETĂRI PRIVIND INFECȚIA SUINELOR DOMESTICE ȘI SĂLBATICE CU PESTIVIRUSURI DE LA RUMEGĂTOARE.....	125
7.1. Investigații privind infecția suinelor domestice și a mistreților cu pestivirusuri de la rumegătoare în estul României.....	125
7.1.1 Material și metode.....	125
7.1.2. Rezultate și discuții.....	134
7.1.3. Concluzii parțiale.....	143
7.2. Caracterizarea genetică și analiza filogenetică a tulpinilor de pestivirus identificate.....	143
7.2.1. Material și metode.....	144
7.2.2. Rezultate și discuții.....	149
7.2.3. Concluzii parțiale.....	153
CAPITOLUL VIII. CONCLUZII FINALE.....	154
BIBLIOGRAFIE.....	160
ANEXA 1. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE.....	170

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS.....	11
LIST OF TABLES.....	13
LIST OF FIGURES.....	18
INTRODUCTION.....	22
ABSTRACT.....	28

PART I CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CHAPTER I. GENERAL CHARACTERS OF PESTIVIRUSES.....	46
1.1. Phylogeny, classification and evolution pestiviruses.....	46
1.2. Pestivirus genome organization.....	50
1.3. Structure, morphology and antigenicity.....	52
1.4. Replication cycle.....	54
CHAPTER II. PESTIVIRUS INFECTIONS IN ANIMALS.....	56
2.1. Classical swine fever.....	57
2.1.1. Definition.....	57
2.1.2. Ethiotatogenesis.....	57
2.1.3. Epidemiology.....	58
2.1.4. Aspects morphoclinical.....	59
2.1.5. Differential diagnosis.....	61
2.2. Viral diarrhea- mucosal disease.....	62
2.2.1. Definition.....	62
2.2.2. Ethiotatogenesis.....	62
2.2.3. Epidemiology.....	62
2.2.4. Aspects morphoclinical.....	63
2.2.5. Differential diagnosis.....	65
2.3. Border disease.....	65
2.3.1. Definition.....	65

2.3.2. Etiopatogenesis.....	67
2.3.3. Epidemiology.....	67
2.3.4. Aspects morphoclinical.....	67
2.3.5. Differential diagnosis.....	69
CHAPTER III. DOMESTIC PIGS AND WILD BOAR INFECTION WITH RUMINANT PESTIVIRUSES.....	70
CHAPTER IV. DIAGNOSIS OF PESTIVIRUS INFECTIONS IN ANIMALS.....	73
4.1. Serological diagnosis.....	73
4.2. Virological diagnosis.....	73
4.2.1. Methods for isolation and cultivation of pestiviruses.....	74
4.2.2. Identification of pestiviruses using immunological Methods.....	75
4.2.3. Identification of pestiviruses using molecular biology Techniques.....	76

PART II PERSONAL CONTRIBUTIONS

CHAPTE V. SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS ON CLASSICAL SWINE FEVER.....	80
5.1. Seroepidemiological investigations concerning classical swine fever in domestic swine in eastern Romania.....	80
5.1.1 Material and methods (description of the methods used for the detection of antibodies).....	81
5.1.2. Results and discussions.....	82
5.1.3. Partial conclusions.....	89
5.2. Seroepidemiological investigations concerning classical swine fever in wild boars in Eastern Romania.....	89
5.2.1 Material and Methods.....	90
5.2.2. Results and discussions.....	90
5.2.3. Partial conclusions.....	97
CHAPTER VI. RESEARCH ON CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS DETECTION.....	98
6.1. Investigations on classical swine fever virus detection by direct immunofluorescence in domestic pigs and wild boars.....	98
6.1.1 Material and Methods.....	98

6.1.2.Results and discussions.....	101
6.1.3.Partial conclusions.....	107
6.2. Investigation on classical swine fever virus detection by molecular biology techniques in domestic pigs and wild boars.....	108
6.2.1 Material and Methods.....	108
6.2.2. Results and discussions.....	113
6.2.3. Partial conclusions.....	119
6.3. Discriminatory tests in case of emergency vaccination against classical swine fever.....	119
6.4. Principles and use of serological tests with evaluation of their results.....	120
6.5. Principles and the use of virological tests with evaluation of their results.....	124
CHAPTER VII. RESEARCH ON DOMESTIC PIGS AND WILD BOAR INFECTION WITH RUMINANT PESTIVIRUSES.....	125
7.1. Investigation of infection of domestic pigs and wild boars with ruminants pestiviruses in Eastern Romania.....	125
7.1.1. Material and Methods.....	125
7.1.2. Results and discussions.....	134
7.1.3. Partial conclusions.....	143
7.2. Genetic characterization and phylogenetic analysis of the identified pestivirus strains.....	143
7.2.1. Material and Methods.....	144
7.2.2. Results and discussions.....	149
7.2.3.Concluzii parțiale.....	153
CHAPTER VIII. FINAL CONCLUSIONS.....	154
REFERENCES.....	160
ANEXA 1 . LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS.....	170

ABREVIERI ABBREVIATIONS

- **ADN** - acid dezoxiribonucleic
- **ADNc** - acid dezoxiribonucleic complementar
- **ARN** - acid ribonucleic
- **ARNm** - acid ribonucleic mesager
- **ARNr** - acid ribonucleic ribozomal
- **BDV**- Border disease virus (virusul bolii de graniță)
- **bp** - base pairs (perechi de baze)
- **BVDV1** - Bovine viral diarrhoea virus 1 (virusul diareei virale bovine 1)
- **BVDV2** - Bovine viral diarrhoea virus 2 (virusul diareei virale bovine 2)
- **BVDV3** - Bovine viral diarrhoea virus 3 (virusul diareei virale bovine 3)
- **CP**- Crossing point (Prag)
- **CSFV** - Classical swine fever virus (virusul pestei porcine clasice)
- **dATP** - Deoxyadenosine triphosphate (Deoxiadenozin trifosfat)
- **dCTP** - Deoxycytidine triphosphate (Deoxicitidin trifosfat)
- **dGTP** - Deoxyguanosine triphosphate (Deoxiguanozin trifosfat)
- **dTTP** - Deoxythymidine triphosphate (Deoxitimidina trifosfat)
- **dNTP** – Deoxynucleotides (Deoxinucleotide)
- **ddNTP** – Dideoxynucleotides (Dideoxinucleotide)
- **EDTA** - Ethylenediaminetetraacetic acid (acid etilendiaminetetraacetic)
- **ELISA** - Enzyme-linked immunosorbent assay (testul imonoenzimatic)
- **EMBL-EBI** - European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute (Laboratorul european de biologie moleculară - Institutul european de bioinformatică)
- **EtBr** - ethidium bromide (bromura de etidiu)
- **IFD** – direct immunofluorescence assay (testul de imunofluorescență directă)
- **NCBI** - National Center for Biotechnology Information (Centrul Național de Biotehnologie si Informare)
- **PCR** - polymerase chain reaction(reacția de polimerizare în lanț)
- **RT-PCR** - Reverse transcription-polymerase chain reaction (revers transcriptie – reacția în lanț a polimerazei)
- **RRT-PCR** - Real Time reverse transcription-polymerase chain reaction(revers transcriptie în timp real- reacția în lanț a polimerazei)
- **TAE** - Tris-acetate-EDTA buffer(tampon Tris-acetate-EDTA)

- **TBE** - Tris-Borate-EDTA buffer(tamponTris-Borate-EDTA)
- **TFS** - phosphate buffered saline(tampon fosfat salin)
- **TSV** - Tunisian sheep virus(virusul ovin Tunisian)
- **UTR**- untranslated region
- **VN** - testul de virusneutralizare

LISTA TABELELOR LIST OF TABLES

Tabel 5.1 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Vaslui în anii 2007-2008 / Table 1.1 The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Vaslui County during 2007-2008.....	83
Tabel 5.2 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Vaslui în anii 2009-2010 / Table 5.2 The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Vaslui County during 2009-2010.....	84
Tabel 5.3 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Vaslui în anii 2011-2012 / Table 5.3 The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Vaslui County during 2011-2012.....	84
Tabel 5.4 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Suceava în anii 2007-2008 / Table 5.4 The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Suceava County during 2007-2008.....	85
Tabel 5.5 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Suceava în anii 2009-2010 / Table 5.5 The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Suceava County during 2009-2010.....	86
Tabel 5.6 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Suceava în anii 2011-2012 / Table 5.6 The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Suceava County during 2011-2012.....	86
Tabel 5.7 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Iași în anii 2007-2008 / Table 5.7 The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Iași County during 2007-2008.....	87
Tabel 5.8 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Iași în anii 2009-2010 / Table 5.8 The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Iași County during 2009-2010.....	88
Tabel 5.9 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Iași în anii 2011-2012 / Table 5.9 The	

serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Iași County during 2011-2012.....	89
Tabel 5.10 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Vaslui în anii 2007-2008 / Table 5.10 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Vaslui County during 2007-2008.....	91
Tabel 5.11 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Vaslui în anii 2009-2010 / Table 5.11 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Vaslui County during 2009-2010.....	92
Tabel 5.12 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Vaslui în anii 2011-2012 / Table 5.12 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Vaslui County during 2011-2012.....	92
Tabel 5.13 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Suceava în anii 2007-2008 / Table 5.13 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Suceava County during 2007-2008.....	93
Tabel 5.14 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Suceava în anii 2009-2010 / Table 5.14 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Suceava County during 2009-2010.....	94
Tabel 5.15 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Suceava în anii 2011-2012 / Table 5.15 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Suceava County during 2011-2012.....	94
Tabel 5.16 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Iași în anii 2007-2008 / Table 5.16 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Iași County during 2007-2008.....	95
Tabel 5.17 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Iași în anii 2009-2010 / Table 5.17 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Iași County during 2009-2010.....	96
Tabel 5.18 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Iași în anii 2011-2012 / Table 5.18 The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars in Iași County during 2011-2012.....	96
Tabel 6.1 Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență	

directă la suinele domestice și sălbatice în județul Vaslui în anii 2007-2008 / Table 6.1 The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Vaslui County during 2007-2008.....	101
Tabel 6.2 Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Vaslui în perioada 2009-2010 / Table 6.2 The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Vaslui County during 2009-2010.....	102
Tabel 6.3 Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Vaslui în perioada 2011-2012 / Table 6.3 The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Vaslui County during 2011 -2012.....	103
Tabel 6.4 Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Suceava în perioada 2007-2009 / Table 6.4 The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Suceava County during 2007-2009.....	104
Tabel 6.5 Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Suceava în perioada 2010-2012 / Table 6.5 The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Suceava County during 2010-2012.....	105
Tabel 6.6 Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Iași în perioada 2007-2009 / Table 6.6 The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Iași County during 2007-2009.....	106
Tabel 6.7 Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Iași în perioada 2010-2012 / Table 6.7 The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Iași County during 2010-2012.....	107
Tabel 6.8 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT- PCR la suinele domestice și mistreți în județul Iași în anul 2010 / Table 6.8 The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR in domestic swine and wild boars from Iasi County in 2010.....	114
Tabel 6.9 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR la suinele domestice și mistreți în județul Iași în anul 2011 / Table 6.9 The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR in domestic swine and wild boars from Iasi County in 2011.....	114
Tabel 6.10 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR la suinele domestice și mistreți în județul Iași în anul 2012 / Table 6.10 The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR in domestic swine and wild boars from Iasi County in 2012.....	115

Tabel 6.11 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR pe probe de organe la suinele domestice și mistreți în județul Vaslui în perioada 2010 – 2012 / Table 6.11 The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR on organ samples from domestic pigs and wild boars in Vaslui County during 2010 -2012.....	116
Tabel 6.12 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR pe probe de sânge de la suinele domestice din județul Vaslui în anul 2012/ Table 6.12 The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR on blood samples from domestic pigs from Vaslui County in 2012.....	116
Tabel 6.13 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR pe probe de organe la suinele domestice și mistreți în județul Suceava în perioada 2010 – 2012 / Table 6.13 The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR on organ samples from domestic pigs and wild boars in Suceava County during 2010 -2012.....	117
Tabel 6.14 Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR pe probe de sânge de la suinele domestice din județul Suceava în anul 2012 / Table 6.14 The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR on blood samples from domestic pigs from Suceava County in 2012.....	118
Tabel 6.15 Diagnosticul pestei porcine clasice la suinele domestice în județul Iași în anul 2008 utilizând teste serologice de diferențiere / Table 6.15 The diagnosis of classical swine fever in domestic pigs in Iași County in 2008 using IDEXX CSFV Marker Test.....	123
Tabel 6.16 Diagnosticul pestei porcine clasice la suinele domestice în județul Iași în anul 2009 utilizând teste serologice de diferențiere / Table 6.16 The diagnosis of classical swine fever in domestic pigs in Iași County in 2009 using IDEXX CSFV Marker Test.....	123
Tabel 7.1 Detecția prin examen rt-PCR clasic a infecțiilor cu pestivirusuri la suine din județul Iași / Table 7.1 Detection through rt-PCR of pestivirus infections in swine from Iași County.....	135
Tabel 7.2 Detecția prin examen rt-PCR clasic a infecțiilor cu pestivirusuri la suine din județul Vaslui / Table 7.2 Detection through rt-PCR of pestivirus infections in swine from Vaslui County.....	137
Tabel 7.3 Detecția prin examen rt-PCR clasic a infecțiilor cu pestivirusuri la suine din județul Bacău / Table 7.3 Detection through rt-PCR of pestivirus infections in swine from Bacău County.....	137
Tabel 7.4 Detecția VPPC prin examen rt-PCR în probe identificate pozitive pentru pestivirusuri recoltate de la suine din județul Iași / Table 7.4 CSFV detection through rt-PCR on pestivirus positive samples collected from pigs in Iași County.....	139

Tabel 7.5 Detecția VPPC prin examen rt-PCR în probe identificate pozitive pentru pestivirusuri recoltate de la suine din județul Bacău /

Table 7.5 CSFV detection through rt-PCR on pestivirus positive samples collected from pigs in Bacău County..... 140

LISTA FIGURULOR LIST OF FIGURES

Figura 1.1 Analiza filogenetică a principalelor pestivirusuri bazată pe analiza a 2037nt care cuprinde regiunile genomice: 5'UTR, Npro și E2/ Figure 1.1 Phylogenetic analysis of the main pestiviruses based on the analysis of a sequence of 2037nt from comprising genomic regions: 5'UTR, Npro and E2.....	47
Figura 1.2 Noua propunere de clasificare a pestivirusurilor/ Figure 1.2 The new proposal for pestivirus classification	49
Figura 1.3 Structura moleculară a pestivirusurilor/ Figure 1.3 The molecular structure of the pestiviruses.....	51
Figura 1.4 Structura genomului viral la pestivirusuri/ Figure 1.4 The structure of the pestivirus viral genome	52
Figura 1.5 Ciclul de replicare al pestivirusurilor/ Figure 1.5 Viral cycle of pestiviruses.....	54
Figura 2.1 Distribuția pestei porcine clasice pe mapamond în anul 2015/ Figure 2.1 Classical swine fever global distribution in 2015.....	58
Figura 2.2 Aspecte lezionale în forma acută: hemoragii la nivelul limfonodurilor (A) și corticalei renale (B)/ Figure 2.2 Lesions in acute form: haemorrhagic lymph nodes (A) and petechial bleedings in the kidney (B).....	60
Figura 2.3 Aspect lezional în forma cronică: ulcere la nivelul intestinului gros/ Figure 2.3 Lesion in the chronic form: ulcers in the gross intestine	61
Figura 2.4 Căile de transmitere ale VBVD într-un efectiv de bovine/ Figure 2.4 Ways of transmission of BVDV in a dairy herd.....	63
Figura 2.5 Consecințele infecției cu VBVD în funcție de vârsta de gestație a femeii / Figure 2.5 The consequences of BVDV infection according to the gestational age of the female	64
Figura. 2.6 Aspecte clinice în infecția cu VBD: A. Fetus fătat mort cu hiperflexia articulațiilor carpiene și tarsiene și deformări faciale; B. Ataxie pronunțată/ Figure 2.6 Clinical aspects in BDV infection: A. Still-born with hyperflexion of carp and tarsi and facial malformations; B. pronounced ataxia.....	68

Figura 2.7 Aspecte lezionale în infecția cu VBD : A. Hidraencefalie la un avorton ; B. Malformație a craniului – palatoschizis./ Figure 2.7 Lesions in BDV infection: A. Hydranencephaly in an aborted lamb fetus. B. Palatoschisis.....	69
Figura 3.1 Modelul predictiv de evoluție a virusurile emergente/ Figure 3.1 Predictive model of development of emerging viruses(după Ridpath JF, 2015).....	70
Figura 4.2 Structura genomului la pestivirusuri/ Figure 4.2 Pestivirus genome structure.....	76
Figura 7.1 Pregătirea probelor de țesut în vederea extracției de ARN / Figure 7.1 Tissue sample preparation for extraction of RNA.....	127
Figura 7.2 Mărunțirea probelor de țesut în vederea triturării / Figure 7.2 Grinding the tissue samples	127
Figura 7.3 Încărcarea probelor de țesut în tuburi “Magna lyser green beads” / Figure 7.3 Charging tissue samples in tubes "Magna lyser green beads".....	128
Figura 7.4 Triturarea probelor de țesut utilizând MagNA Lyser Roche / Figure 7.4 Trituration tissue samples using the Roche MagNA Lyser.....	128
Figura 7.5 Extracția de ARN din țesuturi recoltate de la suine. Adăugarea tamponului de liză RLT / Figure 7.5 RNA extraction from tissue. The addition of the lysis buffer RLT.....	129
Figura 7.6 Adăugarea tamponului de spălare RPE / Figure 7.6 The addition of RPE wash buffer.....	130
Figura 7.7 Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri panpestivirus a probelor de origine suină (porc domestic și mistreț) recoltate de pe teritoriul județului Iasi / Figure 7.7 Results of rt-PCR using panpestivirus primers of swine samples (domestic swine and wild boar) collected from Iași County.....	136
Figura 7.8 Rezultatele testării prin rt- PCR utilizând primeri panpestivirus a probelor de origine suină (porc domestic și mistreț) recoltate de pe teritoriul județului Bacău/ Figure 7.8 Results of rt-PCR using panpestivirus primers of swine samples (domestic swine and wild boar) collected from Bacău County.....	138
Figura 7.9 Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri specifici pentru VPPC a probelor pozitive pentru pestivirusuri / Figure 7.9 Results of rt-PCR using specific primers for CFSV on positive samples for pestiviruses.....	139

Figura 7.10 Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri specifici pentru VPPC a probelor pozitive pentru pestivirusuri / Figure 7.10 Results of rt-PCR using specific primers for CFSV on positive samples for pestiviruses	140
Figura 7.11 Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri specifici pentru VBVD1 a probelor pozitive pentru pestivirusuri/ Figure 7.11 Results of rt-PCR using specific primers for BVDV1 on positive samples for pestiviruses	141
Figura 7.12 Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri specifici pentru VBVD2 a probelor pozitive pentru pestivirusuri/ Figure 7.12 Results of rt-PCR using specific primers for BVDV2 on positive samples for pestiviruses.	142
Figura 7.13 Kitul de purificare a produșilor PCR/ Figure 7.13 PCR clean-up system.	144
Figura 7.14 Termomixerul Eppendorf folosit pentru incubarea produșilor PCR Figure. 7.14 Thermomixer Eppendorf used for incubating PCR products.	145
Figura 7.15 Adăugarea soluției de spălare / Figure 7.15 The addition of wash solution.	145
Figura 7.16 Spectofotometru pentru cuantificarea concentrației de ADN / Figure 7.16 Spectrophotometer for measuring DNA concentration.	146
Figura 7.17 Kitul utilizat la secvențializarea produșilor PCR/ Figure 7.17 PCR product sequencing kit used.	147
Figura 7.18 Secvențializatorul Beckman Coulter/ Figure 7.18 Beckman Coulter sequencing machine.	148
Figura 7.19 Probele pozitive selectate pentru secvențiere (înainte de excizarea benzilor de ADN pentru procesul de purificare) / Figure 7.19 Positive samples selected for sequencing(before excising bands for DNA purification).	149
Figura 7.20 Probele pozitive selectate pentru secvențiere (după de excizarea benzilor de ADN pentru procesul de purificare) / Figure. 7.20 Positive samples selected for sequencing(after excising bands for DNA purification).	150
Figura 7.21 Secvența 3'-5' și 5'-3' a produsului PCR 2 (probă porc domestic)/ Figure. 7.21 Forward și reverse sequence of PCR product 2 (pig sample).	151
Figura 7.22 Secvența 3'-5' și 5'-3' a produsului PCR 5 (probă mistreț) / Figure 7.22 Forward și reverse sequence of PCR product 5 (wild boar sample).	151

Figura 7.23 Înrudirea tulpinilor de pestivirus izolate de la suidee și separarea într-o cladă separată a tulpinilor de VBVD1/ Figure. 7.23 Filogeny of pestiviruses strains isolated from suidae and clade separation of BVDV1 strains.....	152
---	-----

INTRODUCERE

Intensificarea creșterii animalelor la nivel industrial, globalizarea traficului de animale și al produselor de origine animală și mai ales deschiderea granițelor au dus la răspândirea infecțiilor virale în întreaga lume. Deschiderea granițelor a dus la răspândirea bolilor din țări în care evoluau endemic, în alte țări care până acum câțiva ani erau considerate indemne. Apariția bruscă a unui nou agent infecțios într-o țară duce la un diagnostic întârziat, cu pierderi economice mari.

Pestivirusurile afectează porcinele, bovinele, ovinele și numeroase specii de animale sălbatice determinând la acestea afecțiuni respiratorii, digestive și de reproducție. Aceste virusuri sunt foarte contagioase și sunt răspândite în întreaga lume.

Virusul diareei virale la bovine (VBVD) împreună cu virusul pestei porcine clasice (VPPC) și virusul bolii de graniță (VBD) aparțin genului *Pestivirus*, familia *Flaviviridae*. Gazdele naturale ale VBVD și VBD sunt în principal bovine, ovine și caprine. În plus, s-a demonstrat că VBVD pot infecta și alte animale domestice, cum ar fi porci (Wang și col., 1996) și chiar mistreți (Vilcek și Nettleton, 2006). VBD poate provoca o infecție naturală nu numai la ovine și caprine ci și la bovine (Cranwell și col., 2007) și porcine (Vilcek și Belák, 1996).

Pestivirusurile reprezintă agenți patogeni care cauzează pierderi economice la animalele domestice de rentă. Pesta porcină clasică și diareea virală bovină sunt boli cu declarare obligatorie la Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (Oficiul Internațional de Epizootii, OIE).

Diagnosticul diferențial al infecțiilor cu VBVD și VPPC joacă un rol important în ceea ce privește impactul epidemiologic și economic. Pesta porcină clasică este o boală virală extrem de contagioasă și devastatoare, diagnosticarea porcilor infectați cu VPPC are nu numai o importanță din punct epidemiologic, dar poate provoca daune economice masive așa cum s-a întâmplat în ultimii ani în urma izbucnirii de focare în Europa de Vest, în Țările de Jos 1997-1998 (Elbers și col., 1999), Marea Britanie în 2000 (Sandvik și col., 2000) și Germania în 2006. În conformitate cu reglementările în vigoare s-a aplicat depopularea efectivelor de porcine infectate sau suspectate de a fi infectate cu VPPC, interzicerea exportului de porci vii, carne de porc și produse din carne de porc.

În ciuda eforturilor de eradicare a pestivirusurilor prin programe de vaccinare, stamping-out, controlul traficului de animale, etc. acestea au o răspândire din ce în ce mai largă și produc pierderi din ce în ce mai mari.

Astfel sunt numeroase motive pentru care acestor virusuri li se acordă o atenție deosebită din partea cercetătorilor și se încearcă eradicarea lor. Astfel, un diagnostic diferențial adecvat folosind metode de laborator este esențial.

Este necesară implementarea unor protocoale de lucru disponibile rapid și care să faciliteze metodele de diagnostic cu un cost redus, utilizând tehnologii sigure și un echipament de laborator accesibil, cu validarea unor astfel de metode. România ca țară integrată în cadrul Uniunii Europene trebuie să fie capabilă să ofere un diagnostic rapid și de calitate care să utilizeze metode validate în cazul apariției oricărei suspiciuni de boală.

Scopul acestei lucrări a fost reprezentat într-o primă etapă de definirea procedurilor de diagnostic, a metodelor de prelevare a probelor și a criteriilor pentru evaluarea testelor de laborator. Au fost luate în discuție metodele de identificare ale agentului viral, metode de depistare a anticorpilor specifici, metode de diferențiere a anticorpilor postvaccinali dar și metode de biologie moleculară pentru identificarea genomului viral. Ulterior, au fost realizate investigații epidemiologice cu privire la infecția suinelor domestice și a mistreților cu pestivirusuri de la rumegătoare.

MULȚUMIRI

Doresc să adresez sincere mulțumiri **D-lui Prof. Univ. Dr. Gheorghe Savuța**, conducătorul de doctorat, pentru îndrumarea și sprijinul oferit pe întreaga durată a studiilor doctorale și în realizarea acestei teze de doctorat.

Mulțumesc în mod special D-nei Dr. Anița Adriana pentru disponibilitatea competentă și permanentă oferită pe toată perioada studiilor doctorale.

Adresez mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare pentru analiza competentă a rapoartelor de cercetare și pentru recomandările oferite pe durata studiilor doctorale.

Sincere mulțumiri adresez și distinșilor membri ai comisiei de doctorat pentru efortul depus în analizarea tezei de doctorat.

Totodată mulțumesc atât conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași, cât și Facultății de Medicină Veterinară pentru condițiile oferite desfășurării studiilor doctorale.

Mulțumesc conducerii Direcției Sanitar Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor, d-lui Director Ciobanu Gabriel și d-nei Dr. Ișan Elena, pentru suportul oferit desfășurării activităților de cercetare.

Mulțumesc colegelor de la laboratorul de Biologie moleculară și laboratorul de Virusologie din cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor Iași, pentru sprijinul oferit și pentru crearea unui ambient profesionist și totodată cald de desfășurare a activității.

Nu în ultimul rând, îmi manifest cu drag recunoștința și doresc să mulțumesc familiei mele, pentru suportul moral și susținerea continuă pe parcursul acestor ani.

INTRODUCTION

The increase of the animals breeding, worldwide animal and animal products trades led to spreading of viral infections. Animal-health and food-safety systems are facing new and additional challenges as a result of the lengthening and increasing complexity of supply chains in the livestock sector that have been facilitated by globalization and trade liberalization. The sudden appearance of new infectious agents in a country leads to a delayed diagnostic with high economic losses.

The pestiviruses affect the swine, cattle, sheep, goats and several species of wild animals determining pulmonary, digestive and reproductive disorders. These viruses are very contagious and have a worldwide distribution.

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) together with classical swine fever virus (CSFV) and border disease virus (BDV) belong to the *Pestivirus* genera, *Flaviviridae* family. Natural hosts of BVDV and BDV are mainly bovine, sheep and goats. Additionally it was proved that BVDV infect other domestic animals too, such as pigs (Wang et al., 1996) and even wild boars (Vilcek and Nettleton, 2006). BDV cause natural infection not in sheep and goats only, but also in cattle (Cranwell et al., 2007) and swine (Vilcek and Belák, 1996).

Pestiviruses represent pathogen agents that cause economic losses in domestic animals. Classical swine fever and bovine viral diarrhoea are notifiable diseases at World Organisation for Animals Health (OIE).

The differential diagnostic of infections with BVDV and CSFV play an important role regarding the epidemiologic and economic impact. Classical swine fever is a viral disease extremely contagious and devastating. Diagnostic of infected pigs CSFV has not only an epidemiologic importance, but can lead to massive economic losses the way it happened in the last few years after the outbreaks in Western Europe, in the Netherlands 1997-1998 (Elbers et al., 1999), Great Britain in 2000 (Sandvik et al., 2000) and Germany in 2006. In accordance with EU regulations animals infected or suspected of CSF were slaughtered and international trades of live pigs, pork and pork products was stopped.

Despite pestiviruses eradication efforts through surveillance programs, stamping-out and control of animal trade, these viruses have spread more and more widely and produce higher losses. The study of pestivirus infections in susceptible species is important both to eradication programs and programs for

maintaining the health and well-being of animal populations. Thus, an adequate differential diagnostic using laboratory methods is essential.

Therefore, it is necessary the implementation of rapidly available protocols and which facilitate rapidly diagnostic with reduced cost, using sensitive technologies and accessible laboratory equipment. Romania, as an integrated country within the European Union, must be capable of offering a fast diagnostic that can use validated methods in the case of any disease suspicion.

The purpose of this study consisted in defining sampling, diagnostic procedures and criteria for the evaluation of laboratory tests. Towards for diagnostic of pestivirus infection in swine and wild boars were used direct identification methods of the virus, immunoassay protocols, differentiation methods for vaccinated/natural infected swine, but also molecular biology techniques for detection of viral genome. Subsequently, there were undertaken epidemiologic investigations regarding domestic pigs and wild boars infection with ruminant pestiviruses.

ACKNOWLEDGEMENTS

I want to sincerely thank my scientific coordinator **Prof.Univ. Dr. Gheorghe Savuța**, for his guidance and support throughout my doctoral studies and for the achievement of this thesis.

Special thanks to Dr. Anița Adriana for competent and permanent availability provided during doctoral studies.

I want to thank to the members of guidance committee for competent analysis of research reports and for recommendations provided during doctoral studies..

Sincere thanks are directed towards the distinguished doctoral committee members for their courtesy to evaluate my thesis.

I would like to thanks to the leadership of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "Ion Ionescu de la Brad" University and the Faculty of Veterinary Medicine for the organizațional framework offered during the course of doctoral studies

I want to thank to the leadership Sanitary Veterinary and Food Safety, Mr. Director Ciobanu Gabriel and Mrs. Dr. Ișan Elena for supporting this work

I want to thank to my colleagues from the Laboratory of Molecular Biology and Virology in the Laboratory Sanitary Veterinary and Food Safety Iasi. Thank you for support offered, for creating a warm and also professional work atmosphere.

Last but not least, I express my my gratitude and I want to thank my family for continued moral support during these yaers of study

REZUMAT

Pestivirusurile sunt agenți patogeni ce cauzează boli importante din punct de vedere economic la rumegătoare domestice și suine, dar ele pot infecta, de asemenea, un spectru larg de specii sălbatice de biongulate. Pestă porcină clasică și diareea virală bovină sunt boli cu declarare obligatorie la Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (Oficiul Internațional de Epizootii, OIE).

Pestivirusurile afectează un număr mare de specii, atât domestice cât și sălbatice, libere sau în captivitate. În multe cercetări se menționează infecții la alte specii decât cele descrise în trecut. Boala Border a fost diagnosticată și la capre și sunt dovezi serologice și virusologice că infecția cu pestivirusuri este frecventă la această specie. Pestivirusurile au fost răspunzătoare și de focare de boală la rumegătoarele sălbatice din grădinile zoologice. La multe specii de rumegătoare sălbatice din toate regiunile lumii au fost depistați anticorpi specifici împotriva pestivirusurilor. Clasificarea acestora a fost făcută pe baza speciilor sensibile, dar s-au izolat de nenumărate ori tulpini de VBVD de la oi și porc și de asemenea VPPC de la bovine și ovine.

Termenul de "virusuri emergente" include virusuri care pot fi încadrate în mai multe categorii diferite. Există virusuri complet noi, care apar dintr-o dată la o specie gazdă fără nici o altă descriere anterioară. Cu toate acestea, virusurile în curs de evoluție includ virusurile care nu se potrivesc cu cele descrise anterior. Acestea pot fi denumite în curs de evoluție ca urmare a modificării modului de transmitere, a severității focarelor, a exacerbarii virulenței sau ca urmare a trecerii barierei de specie.

Virusurile "emergente" pot fi virusuri ce au circulat în populațiile susceptibile, timp de zeci de ani, dar noile metode de supraveghere și diagnostic au permis recent detectarea lor în populațiile de animale domestice sau fauna sălbatică. Exemple din toate aceste categorii de "virusuri emergente" pot fi regăsite în cadrul genului *Pestivirus*.

Manifestările clinice au fost utilizate inițial pentru a diferenția speciile recunoscute de pestivirusuri: virusul pestei porcine clasice, virusul diareei virale bovine - boala mucoaselor și virusul bolii de graniță (bolii Border). În anii care au urmat, a devenit evident că prezentarea clinică a infecției cu pestivirus este foarte variabilă în funcție de vârstă, de statutul imun al gazdei și virulență. Uneori

variațiile de patogenitate ale pestivirusurilor pot avea impact asupra programelor de control așa cum este ilustrat cazul tulpinilor de VPPC cu virulență redusă și tulpini de VBVD cu virulență crescută.

Izolarea pestivirusurilor rumegătoarelor de la porci infectați natural reprezintă dovada directă a producerii infecției cu aceste virusuri cu sau fără evoluție clinică la această specie (Fernelius A.L și colab, 1973; Terpstra C. și colab, 1988). În plus, s-a demonstrat că VBVD poate infecta și alte animale domestice cum ar fi porcii (Wang și colab., 1996), și chiar specii sălbatice (Vilcek și Nettleton, 2006). VBD produce infecții naturale nu numai la ovine și caprine, ci și la bovine (Cranwell și colab, 2007) și porcine (Vilcek și Belák, 1996). Singura specie de virus din genul *Pestivirus* care nu a fost observată a traversa bariera de specie este VPPC, care este încă limitat la porcii domestici și porcii sălbatici (Liess și Moennig, 1990; Moennig și colab., 2000).

Infecții experimentale ale suinelor cu pestivirusurile rumegătoarelor au demonstrat sensibilitatea lor. Porcii infectați au dezvoltat viremie și anticorpi iar virusul recuperat și-a păstrat virulența pentru viței (Passler T., 2010).

Infecțiile cu pestivirusurile rumegătoarelor la porci au o distribuție mondială. Prevalența este variată și depinde, în principal, de contactul cu bovinele, vârsta porcilor și gradul de omologie între tulpina de virus folosită în testul serologic și tulpina sălbatică ce infectează (VBVD sau VBD) porcul. Anticorpii monoclonali disponibili fac diferența între VPPC și pestivirusurile rumegătoarelor. Studiile experimentale au explicat în mare măsură receptivitatea suinelor la infecția cu alte pestivirusuri.

Rezultate recente au arătat existența unor "structuri speciale" ale unor tulpini de VBVD ce asigură receptivitatea pentru celule de bovine, dar și că unele izolate se replică în culturi de celule linia PK15 (celule renale de porc). Dimpotrivă tulpinile VBVD multipotente au probabil, situs-uri de atașare suplimentare pentru celule de ovine și porcine. Identificarea receptorilor pentru celulele de origine ovină și porcine ar putea contribui la o distincție clară între infecțiile cu VBVD și VPPC la porci.

S-a sugerat că pestivirusurile de ovine și porcine nu pot pătrunde în celule de bovine, cu excepția cazului în care variantele virale sunt selectate prin adaptare pe linii celulare bovine în urma pasajelor repetate (Moennig, 1990).

Bovinele sunt considerate ca fiind principalul rezervor și sursa de VBVD pentru porci.

Astfel de infecții încrucișate sunt prezente la suine și pot interfera cu anchetele serologice pentru supravegherea la nivel de efectiv și prin urmare să afecteze programele de eradicare ale pestei porcine clasice.

Teza de doctorat cu titlu **„Epidemiologia și diagnosticul infecțiilor cu pestivirusuri în zona de est a României”** este structurată în concordanță cu normele în vigoare, în două părți principale: prima parte, intitulată **„Stadiul actual al cunoașterii”** ce conține un număr de 34 pagini și o a doua parte, intitulată **„Contribuții personale”**, ce detaliază rezultatele obținute de-a lungul perioadei de studii doctorale, având un număr de 80. Pe lângă aceste două părți principale, teza conține un cuprins, o introducere, un rezumat și o listă de titluri bibliografice.

Prima parte, **„Stadiul actual al cunoașterii”** este structurată în patru capitole și prezintă informații cu privire la caracterele generale ale pestivirusurilor și infecțiile cu pestivirusuri la animale. Ultimul capitol al primei părți prezintă diferite metode de diagnostic folosite în identificarea pestivirusurilor.

Primul capitol, cu titlu **„Caracterele generale ale pestivirusurilor”** începe prin clasificarea pestivirusurilor. Pestivirusurile au fost clasificate inițial în trei specii în funcție de receptivitatea de gazdă: virusul bolii de graniță (VBD) la ovine și caprine, virusul diareei virale bovine bolii mucoaselor (VBVD) la bovine și virusul pestei porcine clasice (VPPC) la suine. Însă în urma cercetărilor s-a demonstrat că atât VBVD și VBD nu sunt limitate la o singură gazdă. De aceea, un pestivirus izolat de la suine poate aparține uneia din cele trei specii. În prezent se poate vorbi de nouă tipuri distincte de virus și sunt multe tulpini virale care sunt încă în studiu. De asemenea sunt oferite informații cu referire la organizarea genomului la pestivirusuri, structură, morfologie, antigenitate și ciclul replicativ al pestivirusurilor.

Capitolul II, intitulat **„infecții cu pestivirusuri la animale”** descrie bolile produse de pestivirusuri la porc și rumegătoare.

Pesta porcina clasică (PPC) a fost cunoscută și descrisă încă de la începutul secolului XIX în SUA. Din America, în anii 1860-1862, boala a trecut în Europa și s-a răspândit pe întreg continentul. Tulpinile foarte virulente de VPPC produc procente ridicate de morbiditate și mortalitate, în timp ce infecțiile produse de tulpini slab virulente pot determina doar afecțiuni congenitale sau chiar să treacă neobservate.

Diareea virală bovină - boala mucoaselor este un complex morbid, manifestat prin febră, tulburări digestive și leziuni erozive sau ulcerative ale mucoasei tubului digestiv și ale altor organe. La bovine adulte, infecția este de obicei subclinică sau uneori poate fi asociată cu semne clinice respiratorii sau digestive (diaree). La animalele de reproducție, se constată fertilitate scăzută la femele iar la masculi o scădere temporară a fertilității corelată cu eliminarea virală prin materialul seminal.

Boala de graniță a fost semnalată pentru prima dată la ovinele din rasele Kerry Hill și Clun Forest, la granița dintre Anglia și țara Galilor, de Hughes și col.

în 1959, de unde și denumirea bolii. În Australia și Noua Zeelandă, a fost descrisă sub numele de „hairy shaker lamb disease” sau „fuzzy lamb” (boala mielului păros și tremurător) din cauza semnelor clinice. Ulterior, boala de frontieră a fost descrisă în America de Nord, Europa și Africa.

Capitolul III, cu denumirea **„Infecția suinelor domestice și sălbatice cu pestivirusuri de la rumegătoare”**, descrie termenul de virusuri "emergente" care pot fi regăsite în cadrul genului *Pestivirus*. Acestea pot fi denumite *în curs de evoluție* ca urmare a modificării modului de transmitere, a severității focarelor, a exacerbării virulenței sau ca urmare a trecerii barierei de specie.

În cadrul Capitolului IV, **„Diagnosticul infecțiilor cu pestivirusuri la animale”** sunt descrise metodele de identificare a pestivirusurilor prin teste serologice și virusologice (izolarea și cultivarea pestivirusurilor, identificarea pestivirusurilor utilizând metode imunologice și tehnici de biologie moleculară).

Partea a doua a tezei, **„Contribuții personale”**, este constituită în patru capitole, fiecare capitol reprezentând detaliat rezultatele obținute pe durata studiilor de doctorat. Această parte de contribuții proprii se încheie cu un capitol în care sunt enumerate concluziile finale ale cercetărilor.

Scopul investigațiilor a vizat obținerea de noi informații cu privire la infecția suinelor domestice și a mistreților cu pestivirusuri de la rumegătoare în zona de est a României. Pentru îndeplinirea scopului propus au fost stabilite trei obiective generale :

- **Investigații seroepidemiologice asupra infecției cu virusul pestei porcine clasice în estul României.** În cadrul acestui obiectiv au fost efectuate două anchete seroepidemiologice. Prima anchetă s-a realizat pentru a determina prevalența anticorpilor specifici anti-VP2C în ser sau plasma la suinele domestice din județele Vaslui, Suceava și Iași. A doua anchetă s-a realizat pentru a determina prevalența anticorpilor specifici anti-VP2C în ser sau plasma la mistreții din județele Vaslui, Suceava și Iași.
- **Detecția virusului pestei porcine clasice** a vizat investigații privind detecția virusului pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și mistreți și investigații privind detecția virusului pestei porcine clasice prin tehnici de biologie moleculară la suinele domestice și mistreți. De asemenea au fost efectuate testele de diferențiere în cazul vaccinării de urgență împotriva pestei porcine clasice.
- **Cercetări privind infecția suinelor domestice și sălbatice cu pestivirusuri de la rumegătoare** a urmărit depistarea infecției suinelor domestice și a mistreților cu pestivirusuri de la rumegătoare în zona de

studiu (estul României), urmată de caracterizarea genetică și analiza filogenetică a tulpinilor de pestivirus identificate.

În capitolul V, intitulat „**Investigații seroepidemiologice asupra infecției cu virusul pestei porcine clasice în estul României**” sunt prezentate rezultatele obținute în urma efectuării de anchete seroepidemiologice pentru detecția anticorpilor specifici anti-VPCC.

Primul subcapitol prezintă pe larg o anchetă seroepidemiologică pentru a determina prevalența anticorpilor specifici anti-VPCC în ser sau plasmă la suinele domestice. Regiunea luată în studiu a fost reprezentată de județele Vaslui, Suceava și Iași.

Investigațiile serologice privind pesta porcină clasică au fost efectuate pe probe recoltate de la suine domestice provenite exploatații profesionale și non-profesionale. Din exploatațiile nonprofesionale au fost recoltate un număr de 12543 probe din județul Vaslui, 11374 probe din județul Suceava și 22261 probe din județul Iași. Din exploatațiile profesionale au fost recoltate un număr de 566 probe din județul Vaslui, 2417 probe din județul Suceava și 4678 probe din județul Iași. Pentru testarea prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică s-a folosit kit-ul comercial Ceditest CSFV- E2 (Cedi-Diagnostics). Porcinele identificate ca fiind pozitive pentru Atc anti-VPCC relevă prezența seroconversiei față de virusul pestei porcine clasice în județele Iași, Suceava și Vaslui.

În perioada 2007-2012 seropozitivitatea suinelor domestice este justificată prin inițierea campaniilor de vaccinare de urgență reglementate prin programul național de control al pestei porcine clasice pe teritoriul României.

Al doilea subcapitol oferă o descriere pe larg a anchetei seroepidemiologice efectuată în vederea determinării prevalenței anticorpilor specifici anti-VPCC în ser sau plasmă la mistreți. În acest scop au fost recoltate probe de sânge de la mistreți din județele Vaslui, Suceava și Iași în perioada 2007-2012. Astfel au fost recoltate și testate un număr de 672 probe din județul Vaslui, 1692 probe din județul Suceava și 751 probe din județul Iași. Metoda utilizată pentru detecția anticorpilor anti-VPCC este aceeași ca la probele analizate de la suinele domestice.

Ca urmare a faptului că în anul 2006 în România au fost tipizate 45 de tulpini de virusul pestei porcine clasice, iar în anul 2007 au fost tipizate alte 39 de tulpini (tulpinile identificate aparțin genotipului 2.3- *Rostock*) în zonele endemice s-a inițiat vaccinarea de urgență ca instrument important în eradicarea bolii. Investigațiile serologice efectuate la mistreți în cele trei județe din estul României (Vaslui, Iași și Suceava) reprezintă o metodă sensibilă și specifică pentru a detecta indirect infecția cu virusul pestei porcine clasice.

Ca urmare a aplicării programului de vaccinare împotriva peștei porcine la porcii domestici începând cu anul 2007 până în 2010, se constată o reducere a circulației virusului și lipsa focarelor din anul 2008 până în prezent. În anul 2010 s-a continuat vaccinarea suinelor sălbatice împotriva peștei porcine clasice (mistreți fiind considerați sursă rezervor de infecție pentru porcii domestici).

Capitolul VI, intitulat „**Cercetări privind detecția virusului peștei porcine clasice**” a avut ca obiectiv investigații privind detecția virusului peștei porcine clasice utilizând reacția de imunofluorescență directă și tehnici de biologie moleculară. Cercetările au fost efectuate pe probe recoltate de la suinele domestice și mistreți. De asemenea s-au făcut teste de diferențiere în cazul vaccinării de urgență împotriva peștei porcine clasice.

Pentru investigațiile privind **detecția virusului peștei porcine clasice prin imunofluorescență directă** au fost recoltate probe de țesuturi (măduvă sternală) de la porcii domestici și mistreți din județele Vaslui, Suceava și Iași în perioada 2007-2012. Din exploatațiile nonprofesionale au fost recoltate un număr: de 470 probe din județul Vaslui, 150 probe din județul Suceava și 1891 probe din județul Iași. Din exploatațiile profesionale au fost recoltate un număr de: 148 probe din județul Vaslui, 1215 probe din județul Suceava și 3318 probe din județul Iași. De la mistreți au fost recoltate un număr de 721 probe din județul Vaslui, 1784 probe din județul Suceava și 1316 probe din județul Iași.

Pentru identificarea antigenelor VPPC din măduva sternală au fost folosite kiturile Gamarom și Ceditest. Prezența virusului în țesuturi a fost pusă în evidență prin examen microscopic cu spectru U.V. în citoplasma celulelor infectate.

În urma testării prin examen virusologic folosind reacția de imunofluorescență directă în vederea detecției antigenelor virusului peștei porcine clasice a probelor recoltate din exploatații non-profesionale, exploatații profesionale și de la mistreți din județele Vaslui, Suceava și Iași în perioada anilor 2007-2012, toate probele din județele Iași și Suceava au fost încadrate ca fiind negative.

În cadrul investigațiilor efectuate în anul 2007 pe probe provenite de la suine de pe teritoriul județului Vaslui au fost identificate 5 probe pozitive și 2 dubioase recoltate de la porci din exploatații non-profesionale.

Investigațiile privind **detecția virusului peștei porcine clasice prin tehnici de biologie moleculară** au constatat în efectuarea de testelor PCR pe următoarele probe: sânge pe anticoagulant (EDTA) și organe (splină, rinichi, tonsile, limfonoduri limfatice, precum cele retrofaringiene, parotidene, mandibulare sau mezenterice).

Tehnicile PCR folosite pentru diagnosticul peștei porcine clasice au fost tehnica One Step RT-PCR clasic și tehnica One Step RT-PCR Real Time.

Testările prin examen RT-PCR efectuate în perioada 2010-2012 pe probe de sânge pe EDTA și țesuturi recoltate de la suine domestice și sălbatice de pe teritoriul județelor Iași, Vaslui și Suceava au evidențiat absența detecției genomului virusului pestei porcine clasice, încadrând animalele testate ca neinfectate sau nepurtătoare ale VPPC.

În ceea ce privesc **testele de diferențiere în cazul vaccinării de urgență împotriva pestei porcine clasice**, există un kit comercial utilizat pentru a diferenția porcii care au fost vaccinați cu vaccinuri marker de porcii care au fost infectați cu tipul sălbatic al virusului pestos. Prin acest test se detectează anticorpii produși împotriva glicoproteinei E_{rns} a virusului pestei porcine clasice. Principiul de bază al acestui test este că animalele vaccinate cu vacin marcat și cele neinfectate, produc anticorpi numai împotriva glicoproteinei E2, în timp ce animalele infectate cu tipul sălbatic al virusului pestei porcine clasice produc anticorpi inclusiv împotriva altor antigene virale. De asemenea porcii care au fost infectați cu alte pestivirusuri cum ar fi virusul diareea bovine sau al bolii de graniță vor reacționa E_{rns} pozitiv.

Diferențierea animalelor vaccinate cu subunitatea virală E2 (E^{rms} negative) de cele infectate (E^{rms} pozitive) s-a realizat utilizând kitul CHEKIT – CSF- MARKER. CHEKIT – CSF- MARKER (IDEXX Laboratories) este un kit imunoenzimatic simplu, specific, sensibil și rapid, pentru detecția anticorpilor față de glicoproteina E^{rms} a pestivirusurilor (virusul pestei clasice porcine, virusul diareei bovine BVD și virusul bolii de frontieră BD).

În cadrul investigațiilor serologice pentru diferențierea animalelor vaccinate cu vaccinul marcat (subunitatea E2 a virusului pestei porcine clasice) au fost prelevate în perioada 2008-2009 un număr de 343 probe de sânge de la suine domestice provenite din ferme comerciale și 456 probe provenite de la porci domestici crescuți în sistem gospodăresc. În urma investigațiilor serologice în vederea detecției anticorpilor împotriva glicoproteinei E^{rms} a virusului pestei porcine clasice 776 probe au fost negative și 23 probe au fost seropozitive (scroafe vaccinate cu vaccin viu atenuat).

În cadrul capitolului VII, „**Cercetări privind infecția suinelor domestice și sălbatice cu pestivirusuri de la rumegătoare**” sunt prezentate rezultatele investigațiilor privind infecția suinelor domestice și sălbatice cu pestivirusuri de la rumegătoare în zona de studiu (partea de est a României).

Investigațiile epidemiologice au fost realizate în perioada 2014-2015 în județe din zona de est a României: Vaslui, Bacău și Iași. Pentru realizarea examenelor de laborator au fost prelevate probe de țesuturi de la suine domestice și sălbatice moarte sau sacrificate provenite din exploatații non-profesionale

precum și de la suine sălbatice. Tehnica PCR folosită pentru diagnosticul infecțiilor cu pestivirusuri la suine a fost metoda One Step rt-PCR convențional.

Utilizând tehnica rt-PCR clasic care să detecteze prezența genomului pestivirusurilor s-au analizat 150 probe organe de la mistreți și 25 probe organe recoltate de la porcii domestici din exploatațile necomerciale din județul Iași. În urma testării prin reacția rt-PCR a probelor din județul Iași, au fost identificate ca fiind pozitive pentru secvența de genom 5'UTR comună pestivirusurilor 6 probe recoltate de la mistreți și 5 probe recoltate de la porci domestici. Rezultatele testelor de biologie moleculară în vederea depistării infecțiilor cu pestivirusuri pe probe recoltate în perioada 2014-2015 în județul Vaslui au arătat că toate probele testate au fost identificate ca fiind negative.

În urma testării prin examen rt-PCR clasic a 52 probe provenite din exploatațile necomerciale și 200 probe organe provenite de la mistreți din județul Bacău au fost identificate 12 probe pozitive pentru prezența genomului pestivirusurilor: 6 probe recoltate de la mistreți și de la 6 porci domestici.

În vederea identificării tipului viral de pestivirus, cele 23 probe pozitive la amplificarea cu primeri panpestivirus (11 probe provenite de la suine de pe teritoriul județului Iași și 12 probe provenite de la suine de pe teritoriul județului Bacău) au fost supuse testării prin reacția rt-PCR în vederea detecției genomului specific virusul pestei porcine clasice și virusului diareei virale bovine-boala mucoaselor. În urma reacției rt-PCR cu primeri specifici pentru VPPC toate probele au fost încadrate ca fiind negative.

De asemenea probele au fost testate prin două protocoale diferite folosind primeri specifici pentru VBVD1, respectiv VBVD2. Validarea reacției s-a realizat utilizând martor pozitiv un extract de ARN provenit din tulpinile vaccinale *Bovela* (Boehringer Ingelheim): VBVD-1 tulpina non-citopatică KE și VBVD-2 tulpina non-citopatică NY.

În urma amplificării celor 23 extracte ARN pozitive pentru genomul pestivirusurilor, utilizând reacția rt-PCR cu primeri specifici pentru VBDB1 au fost detectați cinci produși PCR pozitivi. Aceleași 23 extracte ARN au fost supuse amplificării rt-PCR utilizând primerii specifici pentru VBDV2. În urma testării nu a fost identificat nici un produs PCR pozitiv.

Ulterior s-a realizat secvențierea fragmentelor amplificate pentru confirmarea produșilor PCR pozitivi obținuți. În vederea secvențierii dintre cele 23 ARN-uri pozitive la amplificarea prin reacția rt-PCR cu primeri panpestivirus au fost selectate pentru secvențiere un număr de șapte probe. Criteriile de alegere a probelor au fost: specificitatea amplificării (existența a câtor mai puține benzi suplimentare la amplificare) și intensitatea benzii la migrare (respectiv concentrația de ADN a ampliconului). Din cei șapte ampliconi PCR selectați trei dintre ei

fuseseră încadrați ca pozitivi la reacția rt-PCR cu primeri panpestivirus și cu primeri pentru VBVD1. Patru dintre produșii PCR selectați pentru secvențiere au fost doar pozitivi pentru genomul pestivirusurilor (pozitivi în reacția cu primeri panpestivirus).

Secvențierea de tip Sanger a fost realizată pentru fiecare catenă în parte atât cu primerul panpestivirus forward 324 cât și cu primerul panpestivirus reverse 326. Secvențele obținute au fost comparate cu cele existente în GenBank și EMBL utilizând programul BLAST de la NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Până în prezent, în literatura de specialitate a fost descrisă infecția naturală a suinelor cu pestivirusuri de la rumegătoare. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că pestivirusurile sunt strâns înrudite în ceea ce privește structura genomului și organizarea acestuia, au similaritate semnificativă a secvențelor de nucleotide și de aminoacizi și prezintă reactivitate antigenică încrucișată.

ABSTRACT

The pestiviruses are pathogenic agents that cause important economic losses in swine and ruminants, but they can infect, also, a large spectrum of cloven – hoofed wild species. The classical swine fever and bovine viral diarrhoea are diseases with mandatory declaration at World Organization for Animal Health (The International Office of Epizootics, OIE).

The pestiviruses affect a great number of species, not only domestic but also wild, free or in captivity. In many researches, infections are described in other species than those described in the past. Border disease was diagnosed also in goats, and there are serological and virological proofs that the infection with pestiviruses is frequent in this species. The pestiviruses were also responsible for disease outbreaks in wild ruminants from the zoological gardens. At many wild ruminant species from worldwide were identified specific antibodies against pestiviruses. Their classification was made based on the sensitive species, but there were isolated many times strains of BVDV from sheep and pig and also CSFV from bovine and sheep.

The term of "emerging viruses" includes viruses that can be framing in different categories. There are completely new viruses that appear suddenly in a host species without any other previous description. However, in the course of evolution viruses include the viruses that do not fit with the previously described ones. These can be named in the course of evolution because of the modified transmission, the severity of outbreak, virulence or because crossing the species barriers.

The 'emergent' viruses can be viruses that circulated in susceptible populations, for tens of years, but the new methods of surveillance and diagnostic allowed recently their detection in domestic or wild animal populations. Examples of all these categories of "emerging viruses" can be found within the type of *Pestivirus*.

Clinical manifestations were used initially in order to differentiate the recognised species of pestiviruses: classical swine fever virus (CSFV), bovine viral diarrhoea- mucousal disease (BVDV) virus and border disease virus (BDV).

In the following years became evident that the clinical presentation of the infection with Pestivirus is very variable according to the age, the immune status of the host and strain virulence. Sometimes the variations of pathogeny of the pestiviruses can affect the control programs as in the case of the CSFV with a low virulence and BVDV with high virulence.

Ruminant pestivirus isolation from naturally infected pigs represent the proof of infection with these viruses, with or without clinical evolution (Fernelius A.L et al., 1973; Terpstra C. et al., 1988). Moreover, it was proved that BVDV could also infect other domestic animals such as pigs (Wang et al., 1996), and wild species (Vilcek and Nettleton, 2006). BDV can cause natural infections not only in sheep and goat, but also at cattle (Cranwell et al., 2007) and swine (Vilcek and Belák, 1996). The only *Pestivirus* that had not cross the barrier species is CSFV, the infection being limited to domestic pigs and wild boars (Liess and Moennig, 1990; Moennig et al., 2000).

Swine experimental infections with ruminant pestiviruses have proved their sensitivity. The infected pigs developed viraemia and antibodies, and the recovered virus kept its virulence for calves (Passler T., 2010).

Ruminant pestivirus infections of pigs have a worldwide distribution. The prevalence is varied and depends mainly on contact with cattle, age of pigs and degree of homology of virus strains used for serology, with field strains of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infecting pigs. The available monoclonal antibodies can differentiate between CSFV and the ruminant pestiviruses. The experimental studies explained the swine receptivity and susceptibility to infection with other pestiviruses.

The recent studies highlighted the existence of "special structures" in BVDV that ensure the receptivity for bovine cells, but also that some isolated strains can replicate in PK15 line cells (pig renal cells). The pluripotent BVDV strains probably have supplementary attaching epitops for sheep and swine cells.

The identification of receptors for the sheep and swine cells could contribute to a clear distinction between the infections with BVDV and CSFV in pigs.

It was suggested that sheep and swine pestiviruses could not infect bovine's cells, excepting the case in which the virus had been adapted on bovine cell lines after the repeated passages (Moennig, 1990).

Bovine are considered as being the main source of BVDV for pigs. Such crossed infections are present in swines and can interfere with the serological tests used for surveillance at flock level, consequently affecting the eradication programs of classical swine fever.

The PhD thesis entitled, **“The epidemiology and diagnostic of pestivirus infections in Eastern part of Romania”** is structured, in accordance with the norms, in two main parts. The first part, entitled **“The current stage of knowledge”** contains a number of 34 pages. The second part, entitled **“Personal contributions”**, that details the results obtained throughout the period of PhD studies, has a number of 80 pages. Besides these two main parts, the thesis contains table of contents, introduction, summary and references.

The first part, **“The current stage of knowledge”** is structured in 4 chapters and presents information regarding the general characters of the pestiviruses and infections with pestiviruses in animals. The last chapter of the first part presents different methods of diagnostic used for pestivirus identification.

The first chapter, entitled **“The general characters of pestiviruses”**, starts with pestivirus classification. Pestiviruses were initially classified in three species according to the host receptivity: border disease virus (BDV) in sheep and goat, bovine diarrhea - mucousal disease virus (BVDV) in bovines and classical swine fever virus (CSFV) in swine. Afterwards researches proved that BVDV and BDV are not limited to a single host. Therefore, a pestivirus isolated from swine can belong to one of the three species. Currently pestiviruses are classified in nine different types, and some viral strains are still under consideration. In this chapter is described the organisation of pestiviruses genome, structure, morphology, antigenicity and replicative cycle.

Chapter II, entitled **“Infections with pestivirus in animals”**, describes the diseases produced by pestiviruses in pigs and ruminants. From the beginning of the 19th century, classical swine fever (CSF) was known and described in the USA. From America, in the years 1860-1862, the disease passed into Europe and it spread on the entire continent. The CSFV highly virulent strains produce high percentages of morbidity and mortality, while low virulent strains can determine only congenital diseases or even subclinical infections.

Bovine viral diarrhoea –mucousal disease is a morbid complex, characterized by fever, digestive disorders and erosions or ulcers on digestive tract mucosa. In adult bovines, the infection is usually subclinical or sometimes it can be associated with pulmonary or digestive (diarrhoea) signs. In breeding females' low fertility was diagnosed and temporary decrease of fertility correlated with the viral shedding through seminal material in breeding males.

Border disease was signalled for the first time in sheep from Kerry Hill and Clun Forest breed, at England and Wales border, by Hughes et al. in 1959, whence the name of the disease. In Australia and New Zealand, it was described

under the name of „hairy shaker lamb disease” or „fuzzy lamb” (the shaky and hairy lamb disease) because of the clinical signs. Subsequently, border disease was described in the North America, Europe and Africa.

Chapter III entitled, **”Ruminant pestivirus infection in swine and wild boar”**, describes the term of “emergent” virus that can be retrieved within the Pestivirus subfamily. These viruses can be named “in course of evolution” because of the modification of transmission, severity of outbreaks, virulence, crossing host barriers.

Within the Chapter IV, **”Diagnostic of pestivirus infections in animals”** are described the identification methods of pestiviruses using serological and virological tests (isolation and cultivation of pestiviruses, identification of pestiviruses using immunological methods and molecular biology techniques).

The second part of the thesis, **”Personal contributions”**, consists in four chapters, each chapter presenting the results obtained during PhD studies. This part concludes with a chapter in which the conclusions of the researches are listed.

The aim of the investigations aimed to obtain new information regarding the swines and wild boars infection with ruminant pestiviruses in the Eastern part of Romania. In order to fulfill the suggested aim there were established three general objectives:

- **Seroepidemiological investigations on classical swine fever in the Eastern part of Romania.** Within this objective there were made two seroepidemiological studies. The prevalence of specific antibodies against-CSFV in swine serum or plasma from Vaslui, Suceava and Iași County was established in the first investigation. The second investigation was conducted in order to determine the prevalence of specific antibodies against-CSFV in wild boar serum or plasma from Vaslui, Suceava and Iași County.
- **Detection of classical swine fever virus** aimed to identify the classical swine fever virus in swine and wild boars using direct immunofluorescence and using molecular biology techniques. Differentiation tests for detection of vaccinated /natural infected swine with CSFV were also made.
- **Researches regarding ruminant pestiviruses infection in swine and wild boar** consisted in detection of swine and wild boar infection with ruminant pestiviruses in the study area (The Eastern part of Romania),

followed by genetic characterization and phylogeny of the identified pestivirus strains.

Chapter V, entitled, "**Seroepidemiological investigations on classical swine fever virus infection in Eastern Romania**", presents the results of serological investigations for detection of specific antibodies against-CSFV.

The first subchapter presents a seroepidemiological investigation in order to determine the prevalence of the specific antibodies against-CSFV in swine serum or plasma. Vaslui, Suceava and Iași County represent the studied region.

The serological investigations regarding classical swine fever were made on sample collected from farm and backyard pigs. From backyard pigs were sampling: 12543 serums from Vaslui County, 11374 serums from Suceava County and 22261 serums from Iași County. From farm pigs were sampling: 566 serums from Vaslui County, 2417 serums from Suceava County and 4678 serums from Iași County. As immunoassay technique, the commercial kit Ceditest CSFV-E2 was used (Cedi-Diagnostics). Swine positive for antibodies against CSFV were identified, revealing the seroconversion to CSFV in Iași, Suceava and Vaslui counties.

During 2007 to 2012, the seropositivity against CSFV of domestic swine is justified by initiation of the vaccination campaigns regulated by the national program of control for classical swine fever throughout Romania.

The second subchapter offers the description of seroepidemiological investigation in order to determine the prevalence of the specific antibodies against-CSFV in wild boar serum or plasma. Vaslui, Suceava and Iași County. For this purpose, during 2007 to 2012 were collected blood samples from wild boars originated from Vaslui, Suceava and Iași County. Thereby 672 samples from Vaslui County, 1692 samples from Suceava County and 751 serums from Iași County were collected and tested. The method used for detection of antibodies against-CSFV is the same as for the analysed domestic pig samples

In 2006 in Romania were typified 45 strains of classical swine fever virus, in 2007 there were typified other 39 of strains (the identified strains belong to the genotype 2.3- *Rostock*). As a consequence in endemic areas it was initiated the vaccination schedule as an important tool for disease eradication. The serological testing made on wild boars in three counties from Eastern Romania (Vaslui, Iași and Suceava) represent a sensitive and specific method in order to detect indirectly the infection with classical swine fever virus.

Because of vaccination program against classical swine fever in domestic pigs starting with 2007 until 2010, it is noticed a reduction of the virus circulation and the lack of outbreaks from 2008 until present. In 2010, wild boars vaccination

continued against the classical swine fever (feral pigs are considered a reservoir of infection for domestic pigs).

Chapter VI, entitled, "**Researches on detection of classical swine fever virus**" had as an objective investigations regarding the CSFV identification using direct immunofluorescence and molecular biology techniques. The researches were made on samples collected from pigs and wild boars. Tests of differentiation were also made in the case of emergency vaccinated animals.

Investigations regarding the detection of the classical swine fever virus using **direct immunofluorescence** on tissues samples (sternal marrow) from the domestic pigs and boars from Vaslui, Suceava and Iași Counties were undertaken during 2007 to 2012. From backyard pigs were collected: 470 samples from Vaslui County, 150 samples from Suceava County and 1891 samples from Iași County. Sampling from pig farms represents 148 samples from Vaslui County, 1215 samples from Suceava County and 3318 samples from Iași County. From wild boars were collected 721 samples from Vaslui County, 1784 samples from Suceava County and 1316 samples from Iași County.

Identification of CSFV antigens in sternal marrow used Gammarom and Ceditest kits. The virus presence in tissue sampling used an UV microscop, observing the positive reaction in the cytoplasm of the infected cells. All samples originated from Iași and Suceava County were identified as negative for CSFV. Within the investigations undertaken in 2007 on backyard pigs samples originated from Vaslui County, five positive and two doubtful samples were detected.

The investigations regarding the detection of the classical swine fever virus using molecular biology techniques consisted in testing: blood samples on anticoagulant (EDTA) and organs (spleen, kidney, tonsils and lymphnodes). The methods used for diagnostic were One Step RT-PCR and real time One Step RT-PCR. All samples collected and tested during 2010 to 2012 were identified as negative for the presence of CSFV genome.

Classical swine fever diagnostic of vaccinated/natural infected swine consisted in identification of the animals vaccinated with marker vaccine from the pigs infected with the wild type of swine fever virus. Through this protocol are detected the antibodies against CSFV glycoprotein E^{ms}. The principle of this test is that vaccinated animals with a marker vaccine and non-infected swine produce antibodies only against the glycoprotein E2, while the CSFV infected animals produce antibodies including against other viral antigens. Moreover, the pigs infected with other pestiviruses such as bovine diarrhea virus or border disease will react as gpE^{ms} positive.

The differentiation of the vaccinated animals with the viral subunit E2 (E^{ms} negative) from the infected pigs (E^{ms} positive) was undertaken using CHEKIT

CSF- MARKER kit. CHEKIT – CSF- MARKER (IDEXX Laboratories) it is specific, sensitive and fast immunoassay used for detection of antibodies towards the glycoprotein E^{rms} of pestiviruses (CSFV, BVDV, BDV). The study carried out during 2008 and 2009 on 343 farm pig samples and 456 backyard pig samples. The result consisted in detection of 23 seropositive samples (vaccinated pigs with attenuated vaccine).

Chapter VII entitled **”Researches regarding the infection of domestic swine and wild boars with ruminant pestiviruses”** presents the results of the investigations carried out during 2014 and 2015 on samples from three counties in Eastern Romania: Vaslui, Bacău and Iași. Sampling consisted in tissues samples from backyard pigs dead or slaughtered and from wild boars. The One Step RT-PCR technique was used for the detection of ruminant pestiviruses infections in swine. Sampling consisted in 150 wild boars tissue samples and 25 backyard pig tissue samples from Iași County. The results of the investigation consisted in detection of eleven positive samples for 5'UTR sequence common for all pestiviruses (6 wild boars and 5 domestic pigs). All samples collected and tested from backyard pigs and wild boars from Vaslui County rected negative. Investigation carried out on 52 backyard pigs and 200 wild boars from Bacău County identified 12 positive samples pestiviruses genome: 6 wild boars and 6 domestic pigs.

Molecular characterization of pestivirus type consisted in amplification with pan-pestivirus primers of 23 of positive samples (11 samples from Iași County and 12 samples from Bacău County). The protocol based on amplification of 5'UTR sequence common for all pestiviruses identifies CSFV, BVDV and BDV. Positive samples were subsequent amplified using specific CSFV primers, all PCR product being negative.

Forward all RNAs were amplified using two different protocols with specific primers for BVDV1, respectively BVDV2. Validation was performed using as positive control the vaccinal strains: BVDV-1 a non-cytopathic strain KE and BVDV-2 a non-cytopathic strain NY (*Bovela* -Boehringer Ingelheim). The amplification with BVDV-1 specific primers of the 23 positive pan-pestivirus ARNs resulted in identification of five positive PCR products. None of the positive pan-pestivirus ARNs reacted after amplification with BVDV-2 specific primers.

For sequencing among those 23 positive ARNs detected using pan-pestivirus primers were selected 7 PCR positive products. The sampling criteria was: amplification specificity and the band's intensity in migration (respectively DNA concentration). Sanger sequencing was carried out for each strand using pan-pestivirus primers (forward primer 324; reverse primer 326). The obtained

sequences were compared with the existent ones in GenBank and EMBL using the BLAST program from NCBI (National Centre for Biotechnology Information).

Swine natural infection with ruminant pestiviruses are described in the literature as having a widespread distribution. Interspecies transmission of pestiviruses is explain by closely related genome's structure and organisation of pestiviruses, with significant similarity of nucleotide sequences and aminoacids which leads to crossed antigenic reactivity.

PARTEA I STADIUL CUNOAȘTERII

PART I CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL I. CARACTERE GENERALE ALE PESTIVIRUSURILOR

CHAPTER I. GENERAL CHARACTERS OF PESTIVIRUSES

Pestivirusurile sunt agenți patogeni ce cauzează boli importante punct de vedere economic la rumegătoare domestice și suine, dar ele pot infecta, de asemenea, un spectru larg de specii sălbatice de biongulate. Virusul diaree virale bovine (VBVD) și virusul bolii de graniță (VBD) a ovinelor pot produce infecții tranzitorii sau persistente. Imunotoleranță celulară și umorală a tulpinii infectante este o caracteristică unică a infecției persistente (PI) produsă de pestivirusurile rumegătoarelor. VBVD și VBD au potențialul de a infecta diferite gazde (Becher și colab., 2003; Grøndahl și colab., 2003), în timp ce suinele sunt singura specie rezervor natural al virusului pestei porcine clasice (VPPC). Pestivirusurile sunt înrudite genetic și structural, iar reactivitatea serologică încrucișată apare între toți membrii genului (Schirrneier și colab., 2004), pestivirusurile non-VPPC putând induce în mod normal, infecții subclinice la porci.

1.1. Filogenie, clasificare și evoluția pestivirusurilor

La început erau cunoscute doar trei tipuri de pestivirus: virusul pestei porcine (VPPC), virusul bolii border (VBD) și virusul bolii mucoaselor (VBVD). Ulterior s-au descoperit mai multe subtipuri și chiar virusuri total distincte față de cele clasice. În prezent se poate vorbi de nouă tipuri distincte de virus și sunt multe tulpini virale care sunt încă în studiu.

Pestivirusurile au fost clasificate inițial în trei specii în funcție de receptivitatea de gazdă: virusul bolii de graniță (VBD) la ovine și caprine, virusul diareei virale bovine bolii mucoaselor (VBVD) la bovine și virusul pestei porcine clasice (VPPC) la suine. Însă în urma cercetărilor s-a demonstrat că atât VBVD și VBD nu sunt limitate la o singură gazdă. De aceea, un pestivirus izolat de la suine poate aparține uneia din cele trei specii.

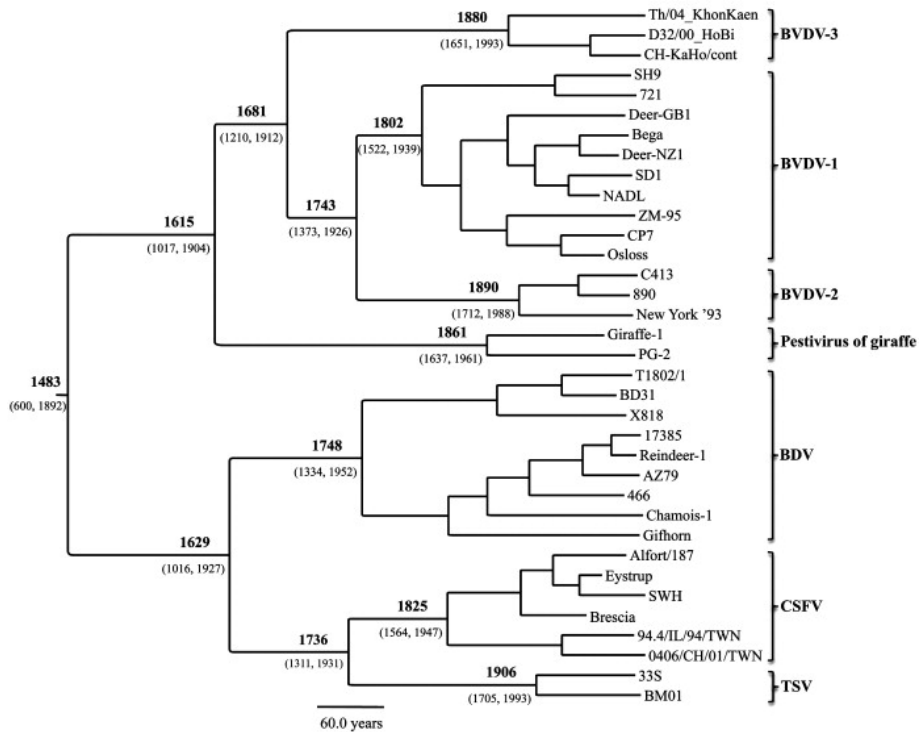


Fig. 1.1. Analiza filogenetică a principalelor pestivirusuri bazată pe analiza a 2037nt care cuprinde regiunile genomice: 5'UTR, Npro și E2.

Fig. 1.1. Phylogenetic analysis of the main pestiviruses based on the analysis of a sequence of 2037nt from comprising genomic regions: 5'UTR, Npro and E2.

(după Liu L. și colab., 2009)

O situație similară a fost întâlnită atunci când s-a realizat clasificarea pestivirusurilor bazate pe modelul lor de legare la anticorpii monoclonali. Din cauza reactivității încrucișate antigenic între specii și datorită variației antigenice în interiorul speciei, doar analiza filogenetică a secvențelor virale a ajutat la clasificarea pestivirusurilor. VBVD este grupat în două genotipuri bazate pe analiza filogenetică a secvențelor din extremitatea 5'UTR a genomului viral (Pellerin și colab., 1994; Ridpath și col., 1994). Cele mai frecvent izolate tulpini de VBVD sunt încadrate în genotipul 1, în timp ce tulpinile detectate în focare de boală manifestate prin sindromul hemoragic sever (mai ales în America de nord), sunt încadrate în genotipul 2. Ambele genotipuri sunt acum recunoscute ca două specii de origine bovină: BVDV-1 și BVDV 2. Analizele filogenetice ale ambelor secvențe genomice sugerează existența și a unei a cincea specii, denumit pestivirusul girafelor (Becher și colab., 1999; Avalos-Ramirez și colab., 2001).

Pe lângă speciile recunoscute și cele nou identificate, există un număr de pestivirusuri, care au fost raportate, dar au rămas neclasificate. În primul rând, - pestivirusul bovin atipic "D32/00_HoBi " ce a fost izolat dintr-un lot de ser fetal bovin originar din Brazilia (Schirrmeier și col., 2004). Au fost descrise patru pestivirusuri suplimentare de origine bovină: BRZ buf 9 izolat pentru prima dată de la un bivoli din Brazilia (Stalder și col., 2005), CH-KAHO/cont izolat dintr-o cultură de celule posibil contaminată de un lot de ser fetal bovin infectat produs în America de sud (Stalder și colab., 2005); Th/ 04_KhonKaen, detectat din serul unui vițel infectat natural în Thailanda (Stähl și colab., 2007); SVA/cont-08, detectat într-un lot de ser fetal bovin contaminat provenit din America de Sud (Liu și colab., 2007).

Așa cum se arată în fig.1.1. la tulpinile de pestivirusuri, cu excepția celor două brațe extrem de divergente, diferențele apar în jurul valorii de 1483nt. Pentru ramurile pestivirusurilor de origine bovină divergența apare între 1615nt și 1743nt pentru a forma cele patru ramuri majore corespunzând celor patru specii: pestivirus de girafă, BVDV-3, BVDV-2 și BVDV-1. Ramurile pestivirusurilor de origine ovină și porcină arată o divergență între 1629nt și 1736nt, pentru a forma cele trei specii: VBD, VTS (tulpini tunisiene) și VPPC.

Toate aceste pestivirusuri atipice sunt strâns înrudite între ele. De asemenea au fost raportate două pestivirusuri foarte divergente de origine non-bovină: un pestivirus izolat de la o antilopă pronghorn bolnavă din Statele Unite ale Americii și virusul Bungowannah izolat de la porci (Vilcek și colab., 2005; Kirkland și colab., 2007). Aceste două virusuri sunt grupate într-un grup bine definit prin analiza filogenetică pe baza analizei extremității 5'UTR și secvențele proteice Npro și E2 (Kirkland și colab., 2007). În plus, așa-numitele tulpini Tunisiene au fost izolate din lapte de oaie tunisiană și din diferite loturi contaminate de vaccin pentru profilaxia variolei ovine în Tunisia (Thabti și colab., 2005). Au fost de asemenea raportate mai multe pestivirusuri de origine tunisiană cum ar fi: 91-F-6731 și 91-F-6732 în Franța (Dubois și colab., 2008), Aydin/04-TR și Burdur/05- TR în Turcia (Oguzoglu și colab., 2009). Cu toate că aceste virusuri sunt încadrate în momentul de față ca VBD ca urmare a speciei receptive, ele sunt mai strâns înrudite filogenetic cu VPPC.

În ciuda unui număr mare de cercetări, există o incertitudine în clasificarea pestivirusurilor. De exemplu, pestivirusul bovin atipic D32/00_HoBi a fost propus a fi o a șasea specie de pestivirusuri conform Schirrmeier și colab. (2004). Becher și colab. (2003) au sugerat că BVDV-1 și BVDV-2 sunt două genotipuri majore în cadrul unei singure specii de VBVD. Clasificarea VBD este neclară: genotipul 4 a fost atribuit la două grupuri de virusuri diferite: Chamois-1 (Arnal și colab., 2004) și izolatele tunisiene TSV (Thabti și colab., 2005).

Relația evolutivă ar trebui să fie considerată drept un criteriu suplimentar pentru încadrarea pestivirusurilor. Izolatele din Tunisia, care au fost introduse ca un subgrup de VBD în conformitate cu înrudirea antigenică și gazdă, sunt propuse ca o altă specie nouă VTS (Liu L și colab., 2009). Relația filogenetică strânsă între VTS cu VPPC, indică o istorie evolutivă independentă de VBD, TSV având un strămoș comun cu VPPC.

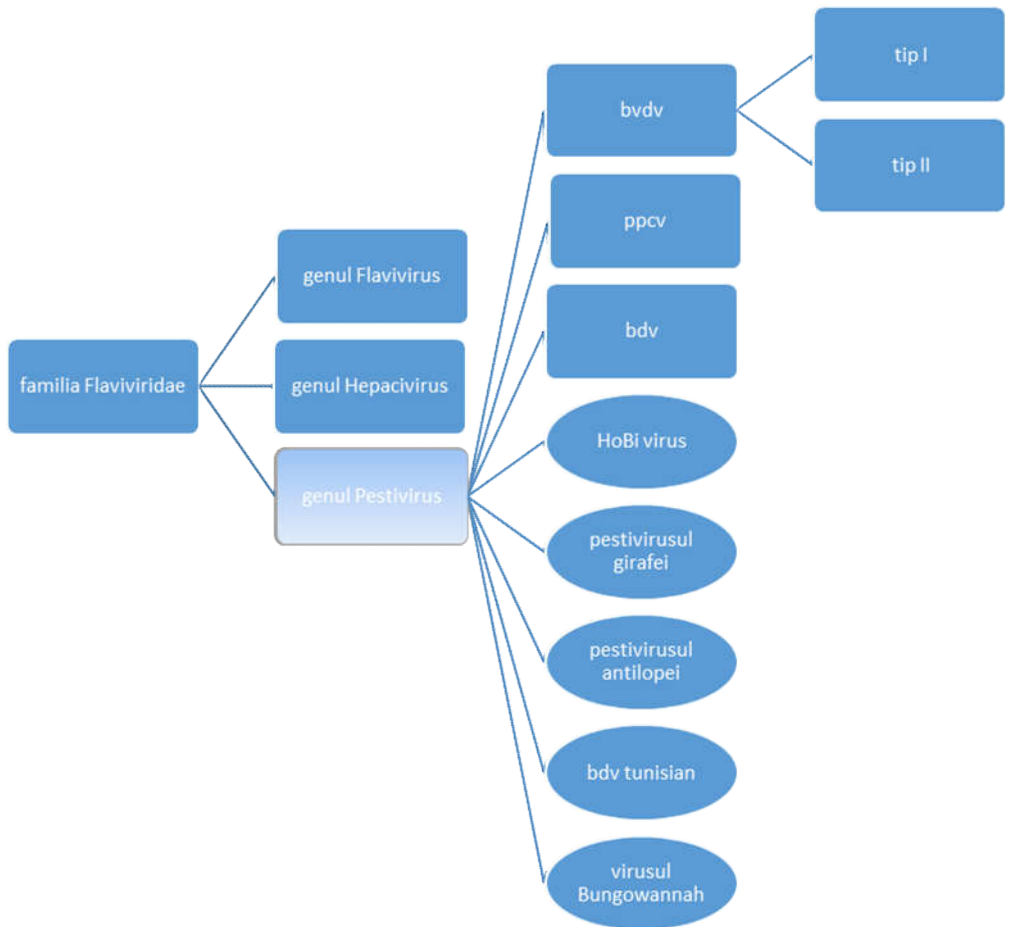


Fig. 1.2. Noua propunere de clasificare a pestivirusurilor

Fig. 1.2. The new proposal for pestivirus classification

Relațiile evolutive dintre specii recunoscute și pestivirusurile neclasificate nu au fost demonstrate în mod clar. Acest lucru este deosebit de evident pentru

relațiile dintre pestivirusurile bovine atipice, pestivirusul de girafă, BVDV-1 și BVDV-2, aceste relații diferite fiind rezultatul analizelor regiunilor diferitelor gene. De exemplu, pestivirusul atipic bovin D32/00_HoBi poate avea trei încadrări filogenetice diferite în funcție de gena analizată (Schirrmeyer și colab., 2004). În plus, un total de nouă topologii diferite de arbori filogenetici au fost prezentate în 12 analize filogenetice a 52 de pestivirusuri folosind trei metode: neighbour-joining, maximum likelihood și abordarea Bayesiană. Astfel de discrepante în filogenia pestivirusurilor pur și simplu duc la concluzii contradictorii cu privire la relațiile dintre pestivirusuri. Studiul noilor variante și includerea lor în genul Pestivirus s-a făcut prin analiza genomului acestora și prin compararea lor cu celelalte pestivirusuri. Metodele prin care s-a determinat structura genetică și evoluția filogenetică sunt: Neighbour-joining, Maximum likelihood și calculul Bayesian.

Neighbour-joining: este una din metodele bazate pe distanța dintre gene din diferite genomuri. Este foarte rapidă, dar recuperarea rădăcinii virusului este posibilă doar dacă matrița este corectă. Calcularea distanțelor între diferite gene însă este îngreunată de diversitatea datorată heterogenității.

Maximum likelihood: este bazată pe caractere. Având un model evoluționar, cea mai probabilă rădăcină inițială este determinată printr-un criteriu optimal bazat pe poziția caracterelor (nucleotidelor) într-un anumit set de secvențe.

Calculul Bayesian: a fost recent descoperit pentru determinarea filogeniei. Această metodă permite pe lângă depistarea rădăcinii comune și măsurarea unui procent de asemănare între diferite virusuri comparate.

Utilizând aceste metode pentru determinarea filogeniei genomului s-a putut face o clasificare genetică a pestivirusurilor.

Bazându-se pe filogenia pestivirusurilor se propune o nouă clasificare în nouă specii: virusul bolii mucoaselor de tip 1 (BVDV1), virusul bolii mucoaselor de tip 2 (BVDV2), virusul bolii mucoaselor de tip 3 (BVDV3-pestivirus bovin atipic, HoBi virus), pestivirusul girafei, virusul pestei porcine clasice (VPPC), virusul bolii de graniță (VBD), virusul ovin Tunisian (VTS), virusul izolat de la antilope și virusul Bungowannah.

1.2. Organizarea genomului la pestivirusuri

Genul Pestivirus cuprinde virusuri ce au genomul reprezentat de o moleculă de ARN mc și capsida de tip icosaedric. Pestivirusurile sunt răspândite în întreaga lume, determinând infecții la suine și rumegătoare.

Pestivirusurile au câteva trăsături ce le diferențiază de restul virusurilor din familia Flaviviridae. În structura lor intră două proteine specifice genului Pestivirus: Npro proteină nestructurală și E^{ms} glicoproteină ce intră în componența învelișului viral. De asemenea o trăsătură unică a pestivirusurilor, față de celelalte flavivirusuri este rezistența la pH-ul scăzut. Majoritatea flavivirusurilor sunt inactivate de un pH scăzut, în schimb ce pestivirusurile sunt stabile la limite largi ale pH-ului.

Particulele virale au formă sferoidă, cu un diametrul de 40-60 nm și conțin ARN monocatenar. Capsida virală este formată din proteina structurală C și un înveliș dublu lipidic. Proteinele necodante E^{ms} , E1 și E2 sunt asociate stratului lipidic. Virusul este stabil la un pH cuprins între 5.7 și 9.3, nu este afectat de îngheț, dar infectivitatea scade sub 40°C. Este dezactivat de solvenții organici și detergenți. Mai poate fi inactivat prin tratamentul cu tripsină și prin iradiere (Collett MS și colab., 1988).

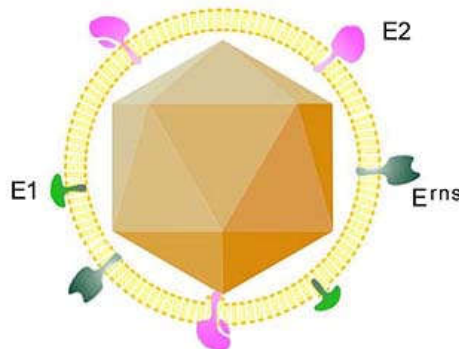


Fig. 1.3. Structura moleculară a pestivirusurilor
Fig. 1.3. The molecular structure of the pestiviruses (după,
[www.expasy.ch/viralzone/all by protein/39.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all%20by%20protein/39.html))

Genomul viral este format din aproximativ 4000 codoni și are la capete două regiuni non-codante 5'(360-390baze) și 3'(200-240). Asemănarea pestivirusurilor apare în regiunea 5' UTR, iar diferențierea lor între nucleotidele 208 și 223. Proteinele structurale virale sunt C, E^{ms} , E1 și E2. C este proteina virală ce formează nucleocapsida. Este constantă la speciile de pestivirus. În culturile de celule E^{ms} poate fi găsită atât cu virusul cât și liberă în mediul de cultură. Această proteină are o acțiune ribonucleazică neobișnuită.

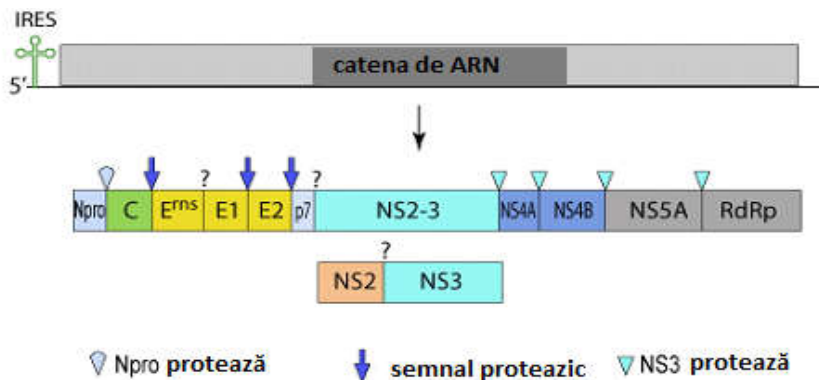


Fig. 1.4. Structura genomului viral la pestivirusuri
 Fig. 1.4. The structure of the pestivirus viral genome (după,
[www.expasy.ch/viralzone/all by protein/39.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all%20by%20protein/39.html))

Deși nu se cunoaște acțiunea sa în replicarea virusului, anticorpilor care inhibă activitatea ribonucleazei neutralizează infectivitatea virusului pestei porcine clasice. E^{ms} a virusului pestei porcine clasice prezintă epitopi care induc formarea de anticorpi neutralizanți. Nu se știe dacă pentru virusul bolii mucoaselor are aceleași proprietăți neutralizante. E1 și E2 sunt glicoproteine membranare. E2 este proteina structurală imunodominantă și posedă epitopi neutralizanți. Este folosită în diferențierea pestivirusurilor pentru că regiunea codificatoare pentru E2 se află într-o zonă hipervariabilă în zona N (Van Gennip și colab., 2005).

Proteinele nestructurale sunt codate de virusul bolii mucoaselor în zona ORF și N^{pro}, proteină unică genului Pestivirus a cărei acțiune este de autoprotează. Următoarea proteină nestructurală p7 se presupune că intervine în asamblarea de virioni infecțioși. Următoarea este proteaza NS2-3. În tipul citopatogen al virusului bolii mucoaselor (VBVD) proteina NS2-3 se împarte în NS2 și NS3. NS2-3 are acțiune imunologică deși nu induce sinteza de anticorpi neutralizanți. În mod normal anticorpilor vaccinali reacționează cu proteinele structurale. Depistarea NS2-3 sau NS3 este o posibilitate de a diferenția infecția naturală de cea postvaccinală. NS4 A și B sunt asemănătoare cu proteinele NS4A și B ale celorlalte flavivirusuri. NS4A acționează ca un cofactor în acțiunea proteazică a NS2-3. NS4B și NS5A și B intervin în replicarea virusului (Beer M. și colab., 2015).

1.3. Structură, morfologie și antigenitate

Genul pestivirus grupează virusuri cu capsidă netedă, lipsite de proprietăți hemaglutinante, ce prezintă la suprafață formațiuni dimerice alcătuite din

proteinele E1 și E2 ce sunt așezate în formațiuni de câte trei (simetrie T=3). La nivelul capsidei se găsește proteina capsidală C.

Poliproteina este prelucrată post-tranlație în 12 polipeptide în următoarea ordine: autoproteaza N-terminală (Npro), proteina capsidei (C), proteinele învelișului (E^{ms} , E1, E2 și), proteinele nestructurale p7 și (NS), proteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A și NS5B).

Extremitatea 5'UTR a genomul BVDV conține două structuri stem care sunt importante pentru replicarea eficientă a ARN-ului (Yu și colab., 2000).

Pestivirusurile codifică o proteină non-structurală unică, Npro, ce se eliberează autocatalitic din poliproteină; această proteină nu este esențială pentru replicarea intracelulară a virusului, dar modulează răspunsul în interferoni a celulelor infectate.

Glicoproteina E2 este principala proteină de înveliș, situată pe suprafața anvelopei, ce induce neutralizarea răspunsurilor anticorpilor în timpul infecției cu PPCV și infecții BVDV (Weiland, E și colab., 1990). E^{ms} este o a doua glicoproteină care mediază neutralizarea, ce are ca și caracteristică unică activitatea intrinsecă a unei ribonucleaze (RNaza) (Hulst M.M și colab., 1994). Dintre cele trei glicoproteinele, funcțiile gp E1 sunt cel mai bine cunoscute.

Determinanții moleculari ai virulenței pestivirusurilor au fost definiți prin tehnologie genetică inversă (Leifer I. și colab., 2013). Se pare că șapte proteine ale pestivirusurilor, inclusiv trei glicoproteine, joacă un rol important în virulență (Ji W. și colab., 2015). Majoritatea evenimentelor care au loc pe suprafața virionilor sunt viabile, cum ar fi activitatea de RN-ază a E^{ms} , variațiile în aminoacizi ale structurilor antigenice și modelele modificate de glicozilare și dimerizare, pot afecta profund virulența virionilor. Mutațiile E^{ms} ce conduc la suprimarea activității RN-aze, determină atenuarea virusului PPC (Risatti G și colab., 2005). Virusul PPC devine tulpină atenuată după desființarea site-ului NLG la nivelul E^{ms} în urma substituției unui reziduu N^2 (Sainz I.F și colab., 2008). În plus, mutația C^{171} în E^{ms} previne homodimerizarea și, de asemenea, duce la atenuarea virusului pestei porcine clasice (Tews B.A. și colab., 2009).

Atunci când 19 aminoacizi sunt inserați în capătul C-terminal al gp E1, tulpini de PPCV extrem de virulente devin complet atenuate. În plus, atunci când aminoacizii N^6 , N^{19} și N^{100} din cadrul gp E1 sunt substituiți, eliminându-se astfel, site-urile NLG, tulpina de VPPC extrem de virulent își pierde infectivitatea și devine atenuată (Fernández-Sainz I. și colab., 2009). Substituirea resturilor de cisteină în pozițiile 24 și 94 ale gp E1 afectează heterodimerizarea E1-E2 și alterează virulența (Fernández-Sainz I. și colab., 2011).

Glicozilarea este un alt aspect important în replicarea pestivirusurilor și N-glicozilarea este importantă pentru următoarele procese: (1) de transport și secreție; (2) sinteza și prelucrarea glicoproteinelor; (3) blocarea inducerii de IFN, astfel evitând mecanisme de imunitate înăscute; și (4) inducerea de anticorpi neutralizanți protectori. Variațiile în aminoacizi și structuri antigenice servesc, de asemenea, ca strategii complexe ale replicării pestivirusurilor, acestea realizându-se fie prin mutații punctiforme sau prin recombinare. Substituirea aminoacizilor din pozițiile cheie ale structurii glicoproteinelor pestivirusurilor pot afecta profund (1) structurile antigenice ce interacționează cu anticorpii; (2) abrogarea legăturilor bisulfite; (3) glicozilarea; și (4) viabilitatea virionilor. În mod colectiv, glicoproteinele pestivirusurilor posedă multiple funcții și roluri critice în replicarea virusurilor și patogenitatea lor.

1.4. Replicarea pestivirusurilor

Pătrunderea pestivirusurilor în organismul gazdei receptive se realizează la nivelul mucoasei oro-nazale, conjunctivale sau genitale. Virusul are tropism pentru celulele epiteliale și celule mononucleare din sânge. Viremia tranzitorie apare la două până la patru zile după infecție, virusul fiind apoi liber sau asociat celulelor mononucleare. La rumegătoare, glicoproteina E2 este un factor determinant major al tropismului, adsorbției și pătrunderii virusului în celulă. Receptorul celular "CD46 bovin" a fost identificat ca fiind receptorul celular utilizat în fixarea BVDV-1 și BVDV 2.

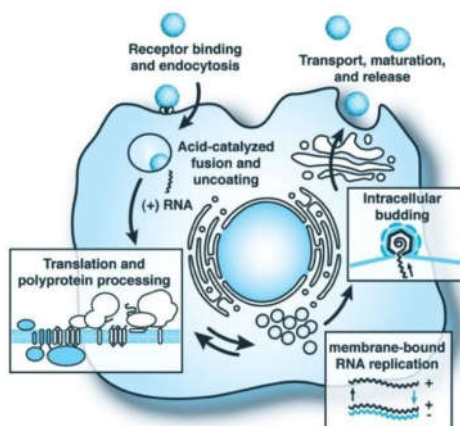


Fig. 1.5. Ciclul de replicare al pestivirusurilor

Fig. 1.5. Viral cycle of pestiviruses (după, Fields Virology, 2007)

Internalizarea virionilor se realizează prin endocitoză și este dependentă de prezența clatrinei (proteină structurală care constituie anvelopa veziculelor). Replicarea ARN-ului este asociată membranei citoplasmatică și necesită intervenția proteinelor NS3 și NS5B și a anumitor componente celulare. Proteinele sunt traduse într-o singură poliproteină lungă de aproximativ 3.400 de aminoacizi, separate ulterior de către proteazele virale și celulare. Ordinea de scindare a poliproteinei virusului NADL- este NH₂-Npro-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Proteina structurală C, glicoproteinele E^{ms}, E1 și E2 sunt codificate de porțiunea 5' a ORF (Lindenbach și colab., 2007). Titrurile maxime de virus sunt atinse la 12 - 24 de ore după infecție.

CAPITOLUL II. INFECȚII CU PESTIVIRUSURI LA ANIMALE

CHAPTER II. PESTIVIRUS INFECTIONS IN ANIMALS

Expresia clinică a infecției cu un pestivirus poate fi foarte diferită, variind de la o simplă viremia subclinică tranzitorie la boală multisistemică severă (Evermann JF, 2006). Semnele clinice se caracterizează prin tulburări de reproducere (infertilitate, avort, mortalitate embrionară sau fetală), imunosupresie (leucopenie și neutropenie asociată cu infecție acută), diaree, și sindrom hemoragic sever. Trei entități clinice sunt recunoscute la animale domestice și sunt asociate cu speciile la care au fost diagnosticate: diareea virală -boala mucoaselor descrisă la bovine, boala de granită descrisă la ovine și pesta porcină clasică la suine.

Pestivirusurile reprezintă agenți patogeni care cauzează pierderi economice la animalele domestice de rentă. Pesta porcină clasică și diareea virală bovină sunt boli cu declarare obligatorie la Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (Oficiul Internațional de Epizootii, OIE).

Pestivirusurile afectează un număr mare de specii, atât domestice cât și sălbatice, libere sau în captivitate. În multe cercetări se menționează infecții la alte specii decât cele descrise în trecut. Boala Border a fost diagnosticată și la capre și sunt dovezi serologice și virusologice că infecția cu pestivirusuri este frecventă la această specie. Pestivirusurile au fost răspunzătoare și de focare de boală la rumegătoarele sălbatice din grădinile zoologice. La multe specii de rumegătoare sălbatice din toate colțurile lumii au fost depistați anticorpi specifici împotriva pestivirusurilor. Clasificarea acestora a fost făcută pe baza speciilor sensibile, dar s-au izolat de nenumărate ori tulpini de VBVD de la oi și porc și de asemenea VPPC de la bovine și ovine.

Rezervoarele de virus sunt considerate animalele sălbatice care de obicei fac forme inaparente de boală și elimină virusul în mediul exterior prin toate secrețiile și excrețiile. Animalele sălbatice se pot contamina de la cele domestice, pot păstra virusul în cadrul speciei și îl pot retransmite la speciile domestice.

Sursele de infecție sunt animalele bolnave, cele cu forme inaparente și cele cu viremie persistentă. Acestea elimină virusul prin toate secrețiile și excrețiile (lacrimi, secreții nazale, salivă, lapte, urină, fecale, spermă). Transmiterea se face direct prin coabitare sau indirect prin alimente și așternut contaminat. Transmiterea poate fi orizontală și verticală. Călea de contaminare poate fi conjunctivală, respiratorie, digestivă, prin montă sau prin realizarea de vaccinări și tratamente cu ace infectate.

2.1. Pesta porcină clasică

2.1.1. Definiție

Pesta porcina clasică (PPC) a fost cunoscută și descrisă încă de la începutul secolului XIX în SUA. În anul 1867 pierderile prin mortalitate provocate de VPPC în unele regiuni ale SUA au atins un nivel de 15-60% din efectivul de porcine. Din America, în anii 1860-1862, boala a trecut în Europa și s-a răspândit pe întreg continentul. Tulpinile foarte virulente de VPPC produc procente ridicate de morbiditate și mortalitate, în timp ce infecțiile produse de tulpini slab virulente pot determina doar afecțiuni congenitale sau să treacă chiar neobservate.

2.1.2. Etiopatogeneză

Virusul PPC se multiplică, putând fi pus în evidență în sângele porcilor înainte de a apărea febra și atinge punctul culminant, la aproximativ 6-7 zile după infecție. Fiind endoteliotrop se replică în organele hematopoetice puternic capilarizate (măduva oaselor, splina, ganglioni limfatici, pulmoni) menținându-se în acestea un timp îndelungat. Având un tropism pronunțat pentru endoteliul vascular, determină tumefierea celulelor endoteliale ale capilarelor și uneori ale vaselor mai mari, produce degenerarea hialină și necroza lor (Tarradas J. și colab., 2014).

Ca urmare, la nivelul acestor degenerări, se produc rupturi de vase, cu apariția consecutivă a hemoragiilor. Se produc, de asemenea și tromboze vasculare, urmate de formarea infarctelor anemice. Locurile de replicare ale virusului sunt măduva osoasă, țesutul limfoid asociat intestinului și timusul (Pauly T. și colab., 1998). Cel mai înalt titru de virus este observat în limfonoduri și splină VPPC poate fi de asemenea detectat și în alte organe, cum ar fi pancreasul, ficatul, rinichii, vezica urinară, plămâni, sistemului nervos central (de las Mulas J.M. și colab., 1997).

În sistemul nervos central se produc inflamații și degenerări cu formarea de manșoane de infiltrație perivasculară. Sistemul hematopoetic fiind afectat, se produce și o leucopenie care scade capacitatea de apărare a organismului față de infecții secundare bacteriene (*Pasteurela* spp., *Salmonella* spp.), care complică tabloul simptomatologic, grăbind astfel sfârșitul.

La scroafe virusul se transmite transplacentar la fetuși și fie că se produce avort, fie sunt fătați porci neviabili. Concentrația maximă a virusului în sânge este în general între zile 5-7 p.i., în funcție de patogenitatea tulpinii; începând cu a 8-a zi după infecție virusul începe să dispară din sânge datorită anticorpilor neutralizanți. La porcii infectați, rămași în viață, virusul persistă în organism în general până la 3 săptămâni, iar în anumite cazuri până la 95 zile p.i.

2.1.3. Epidemiologie

Infecția gazdelor receptive cu virusul PPC se realizează pe cale oronazală după contactul direct sau indirect cu porcii infectați. Alte surse de infecție sunt reprezentate de sursele de hrană contaminate (Fritzemeier J. și colab., 2000). Amigdalele sunt locul primar de replicare al virusului la poarta de intrare.

VPPC are o distribuție pe întreg mapamondul. În prezent, este endemic în America Centrală și de Sud, Asia de Sud-Est și unele țări din Europa de Est. După punerea în aplicare a unor măsuri stricte de control, Australia, Canada, Noua Zeelandă și Statele Unite ale Americii (SUA) au eradicat boala. De asemenea, cele mai multe țări al Uniunii Europene (UE) sunt libere de infecția cu VPPC.

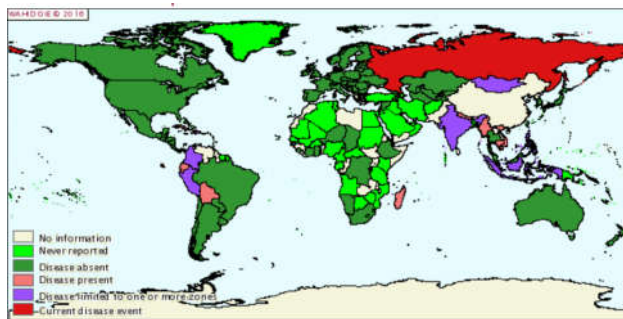


Fig. 2.1. Distribuția pestei porcine clasice pe mapamond în anul 2015

Fig. 2.1. Classical swine fever global distribution in 2015(după, <http://www.oie.int>)

Mistreții reprezintă rezervorul natural al VPPC. aproximativ 60% din focarele primare de pestă porcină clasică la porcii domestici între 1993 și 1998 s-au datorat contactului direct sau indirect cu porcii sălbatici (Floegel G. și colab., 2000).

Tulpinile de virus PPC pot fi împărțite în trei genotipuri diferite (1-3). Fiecare genotip cuprinde trei sau patru subgrupe (Greiser-Wilke și colab, 1998). Focare recente de PPC din Europa au fost asociate în principal cu tulpini moderat virulente din subgrupa 2.3 (Kaden și colab., 2004; Pol și colab., 2008). Prezenta metodă de clasificare a tulpinilor de virus PPC folosește două fragmente genomice scurte: o regiune de 150 nt înalt conservată 5'-NTR și o regiune de 190 nt mai variabilă ce codifică proteina E2 regiunea (Greiser-Wilke și colab., 2006). În principal pe baza acestor fragmente, o bază de date a tulpinilor de virus este menținută la Laboratorul comunitar de referință (LCR) pentru PPC în Hannover, Germania (Greiser-Wilke și colab., 2000). Folosind secvențele 5'-NTR, s-a constatat că izolatele virale par să fie caracteristice pentru anumite regiuni în care au evoluat focare de boală, iar pentru a distinge izolate, s-au dat nume de locuri în care s-au izolat prima dată, de exemplu, 2.3 * Uelzen, 2.3 * Rostock, 2.3 * Güstrow (Fritzemeier J. și colab., 2000). Pe baza acestor secvențe, evoluția focarelor de PPC a putut fi urmărită în Germania.

2.1.4. Aspecte morfoclinice

Perioada de incubație este de 7-10 zile pentru un individ din efectiv, dar într-o populație, semnele clinice apar după 2-3 săptămâni sau chiar mai târziu, în funcție de vârsta porcilor afectați. Dacă virusul infectează animale adulte sau dacă tulpinile virale au o virulență scăzută, semnele clinice apar mult mai târziu, după momentul infecției. Semnele clinice sunt foarte variate, unele din acestea putând fi întâlnite în diverse alte boli. Gravitatea acestora este dependentă de vârsta animalelor și de virulența tulpinilor virale. În mod obișnuit, animalele tinere sunt afectate mai grav, comparativ cu adultele. La porcinele de reproducție adulte, uneori, evoluția este ușoară sau subclinică.

În mod obișnuit pesta porcină clasică evoluează sub trei forme:

- *Forma supraacută* se manifestă prin tulburări generale grave exprimate prin febră, inapetență, accelerarea pulsului și a respirației. La unele animale se constată pareza trenului posterior, congestia pielii, epistaxis.
- *Forma acută* se întâlnește la purceii înțărcați și la grăsunii. În faza de debut porcii prezintă apatie, somnolență, cifoza, jetaj, epiforă, conjunctivită hemoragică, coada desfredelată, apetit scăzut, hipertermie (41- 42°C), constipație și hiperemia pielii. Pe piele apar zone congestionate izolate sau confluențe cu hemoragii punctiforme, diseminate pe tot corpul sau mai numeroase în zonele cu piele fină. Uneori toată pielea este puternic hiperemiată, de culoare roșu aprins, cu numeroase hemoragii. Ulterior porcii devin complet anorexici, preferă starea de decubit și prezintă o diaree gravă, apoasă, galben cenușie, uneori cu strii

sangvinolente. Conjunctivita progresează până când pleoapele sunt complet lipite și se edemațiază. O parte din porcii bolnavi prezintă convulsii, ataxie și pareză. Moartea survine la 5-15 zile de la debut. Porcii care manifestă convulsii mor chiar la câteva ore de la apariția acestora.

Leziunile tipice constau din inflamații și hemoragii ale ganglionilor limfatici, hemoragii sub formă de peteșii renale, hemoragii la nivelul spline și vezicii urinar, infarcte splenice marginale, peteșii la nivelul laringelui și epiglotei, leziuni la nivelul stomacului și intestinului gros și atrofia timusului (Moennig V. și colab., 2003).

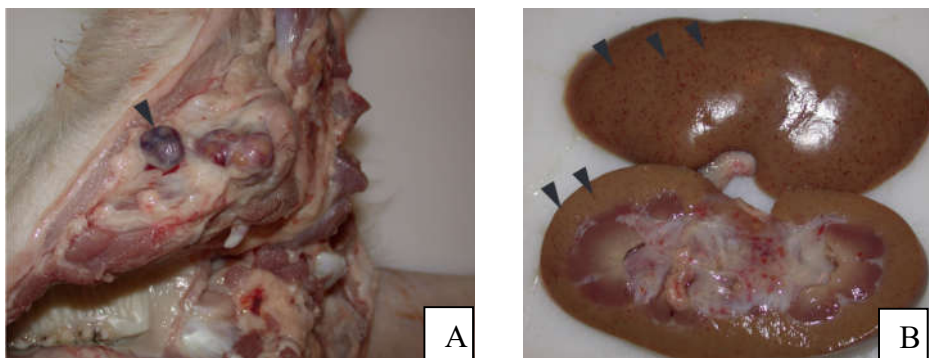


Fig. 2.2. Aspecte lezionale în forma acută: hemoragii la nivelul limfonodurilor (A) și corticalei renale (B)

Fig. 2.2. Lesions in acute form: haemorrhagic lymph nodes (A) and petechial bleedings in the kidney (B) (după, Moennig V. și colab., 2003)

□ **Forma subacută** este la fel de frecventă ca cea acută. Porcinele bolnave prezintă aceleași semne ca în forma acută dar mai puțin grave iar moartea survine după aproximativ 30 de zile de la infecție. În forma subacută, PPC este deseori asociată cu infecții secundare care pot masca sau se suprapun peste semnele tipice, putând conduce la stabilirea unui diagnostic fals.

□ **Forma cronică.** Persistența virusului în organismul porcilor infectați cronic poate determina trei faze de evoluție a bolii. În prima fază, când manifestarea este de tip acut, porcii prezintă anorexie, depresie, hipertermie și diaree. După mai multe săptămâni boala trece în a doua fază de evoluție, când starea generală se îmbunătățește. Temperatura poate fi normală sau cu valori ușor crescute. În cea de a treia fază, finală, se constată din nou anorexie, depresie și hipertermie evoluția sfârșind, de data aceasta, prin moarte. Această formă se poate întâlni cel mai frecvent la porcii cu spor de creștere necorespunzător, slab dezvoltați. (Moennig V. și colab., 1992). Deseori aceste animale prezintă cifoză și leziuni cutanate grave și variate. Perioada de evoluție în forma cronică poate fi mai mare de 100 zile. În această formă hipertermia poate fi decelată numai la animalele

care se află în prima fază de evoluție. Porcii tineri apar chirșiți, au abdomen supt, spatele încovoiat și se deplasează greu. Moartea se produce după epuizare, la 50-70% din cazuri. Cei care rămân în viață sunt purtători și eliminători de virus perioade foarte lungi de timp. Din punct de vedere lezional se constată ulcere la nivelul intestinului gros, asociate cu enterite (Elbers A.R.W. și colab., 2003).



Fig. 2.3. Aspect lezional în forma cronică: ulcere la nivelul intestinului gros

Fig. 2.3. Lesion in the chronic form: ulcers in the gross intestine

(după www.cfsph.iastate.edu)

□ **Forma congenitală.** Virusul traversează bariera placentară și infectează fetoșii, în timp ce scroafele se infectează inaparent clinic. Când infecția are loc într-o fază precoce a gestației se constată avorturi, mortalitate, mumifiere și malformații iar purceii fătați morți prezintă hemoragii cutanate foarte grave, edeme și abdomenul mărit. Toate aceste manifestări duc la reducerea indicilor de fecunditate și de natalitate. Purceii care supraviețuiesc vor fi viremici și nu vor dezvolta anticorpi specifici. Scroafele fac o formă ușoară, exprimată prin pirexie trecătoare și inapetență.

□ **Formele atipice** apar în fermele unde se practică vaccinarea și se întâlnesc de regulă la porci în preajma înțărării, când titrul anticorpilor maternali la majoritatea porcelor scade foarte mult. Inițial, porcii infectați slăbesc și prezintă pete cutanate congestivohemoragice, pentru ca ulterior să apară și manifestări mai tipice, întâlnite în forma subacută.

2.1.5. Diagnostic diferențial

Diagnosticul diferențial în cazul suspiciunii de PPC trebuie să includă orice boala a porcilor foarte contagioasă cu evoluție febrilă: pesta porcină africană, salmoneloza, rujetul, boala lui Aujeszky, sindromul respirator și de reproducție suin. Tiflocolita fibrino-hemoragică poate fi întâlnită în PPC, salmoneloză sau dizenteria colibacilară. Formele cronice de PPC trebuie diferențiate de pneumoniile bacteriene cronice. Intoxicația cu sare/deshidratarea severă poate

produce semne acute encefalitice și moarte similare celor din PPC (Dahle J, Liess B., 1992).

2.2. Diareea virală - boala mucoaselor

2.2.1. Definiție

Diareea virală bovină-boala mucoaselor este un complex morbid, manifestat prin febră, tulburări digestive și leziuni erozive sau ulcerative ale mucoasei tubului digestiv și ale altor organe. La bovine adulte, infecția este de obicei subclinică sau uneori poate fi asociată cu semne clinice respiratorii (infecții bacteriene secundare favorizate de imunosupresia virală locală) sau digestive (diaree). La animalele de reproducție se constată fertilitate scăzută (inactivitate ovariană) la femele, iar la masculi o scădere temporară a fertilității corelată cu eliminarea virală prin materialul seminal.

2.2.2. Etiopatogeneză

Clasificarea tulpinilor de VBVD se bazează pe diferențele de secvență în anumite regiuni ale genomului viral. Prima regiune de interes este o secvență de 245 pb de la capătul 5' UTR. Această porțiune are secvențe specifice de nucleotide foarte conservate ale genului Pestivirus și altele foarte variabile utile în diferențierea viral. Astfel genul pestivirus este împărțit în 7 grupe genetice și două ramuri divergente (pestivirusul de la antilope și pestivirusului Bungowannah). Șapte grupe genetice includ oficial 4 subgenuri (BVDV-1, 2-BVDV, BDV și CSFV), plus un al treilea BVDV genotip BVDV-3 cu pestivirusuri atipice, pestivirusul girafei și izolatele tunisiene grupate sub denumirea de virusul tunisian ovin (TSV).

În cadrul virusului BVD, există foarte multe genotipuri, peste 400 recunoscute și identificate până în prezent. Cel puțin 16 subgrupuri au fost identificate pentru genotipul 1 (BVD1a la BVD1p) și patru pentru genotipul 2 (BVD2a la BVD2d). Un al treilea genotip (BVDV3) regroupează tulpini atipice. Ambele genotipuri au o distribuție geografică diferită, tulpinile BVDV-2 fiind mai frecvent izolate în America de Nord și Europa.

2.2.3. Epidemiologie

Toate rumegătoarele sunt susceptibile la infecție, dar nu toate sunt sensibile în același fel. Statusul imunologic este un prim criteriu discriminatoriu, dar și cel de vârstă este de asemenea important, junincile fiind mai puțin

predispușe la infecții primare decât vacile la a 3-a gestație, sau mai puțin sensibile decât vacile la a cincea gestație (48%, 78% și 91% respectiv). Seroprevalența individuală este dependentă de condițiile locale; prevalența animalelor PI este cuprinsă între 0 și 2%, în timp infecțiile verticale sunt între 8 și 20% (Lackner T. și colab., 2005).

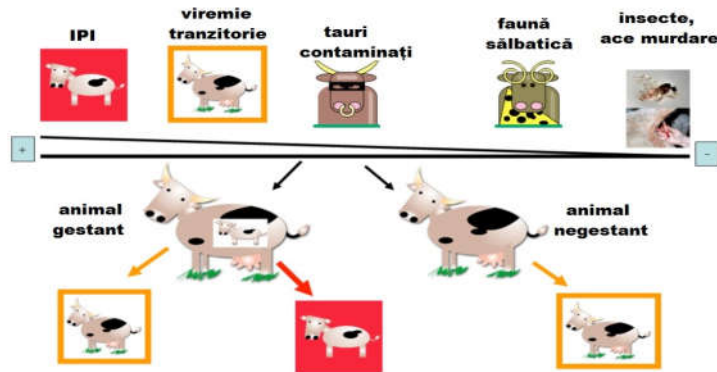


Fig. 2.4. Căile de transmitere ale VBVD într-un efectiv de bovine
Fig. 2.4. Ways of transmission of BVDV in a dairy herd (după, Rush D.M. și colab., 2001).

Transmiterea virusului diareei virale-boala mucoaselor se poate realiza prin:

- contact direct pe cale orizontală: pare cel mai frecvent mod de contaminare. Calea de pătrundere a virusului este de obicei respiratorie, dar virusul poate fi introdus pe cale orală și genitală. Materialul infecțios este reprezentat de sânge, fecale, urină, secreții nazale, salivă, fluid uterin, placenta, embrioni. Virusul poate persista în tractul reproductiv al unei femei non-PI timp de peste 50 de zile (> 2 cicluri). La un taur PI replicarea la nivel testicular poate fi singurul site-ul de multiplicare a virusului, fără apariția viremiei.
- contact indirect orizontal: prin instrumentar medical nesterilizat sau insectele hematofage. Rezistența virusului în mediu este considerată redusă (mai puțin de 10 zile în fecale, câteva minute pe un forceps sau ac). Mai mult decât atât VBVD este sensibil la detergenți convenționali virucidali (Rush D.M. și colab., 2001).
- cale verticală: prin transferul placentar al virusului sau animale PI.

2.2.4. Aspecte morfoclinice

Când un animal vine în contact cu pestivirusurile pentru prima dată este susceptibil la infecție. Sistemul sau imunitar reacționează rapid prin producerea de anticorpi. Virusul este eliminat din țesuturi după câteva săptămâni. La animalele negestante, crescute cu respectarea normelor igienici-dietetice infecția poate trece ca inaparentă, semnele clinice fiind foarte șterse. La femele gestante, consecințele infecției variază în funcție de stadiul de gestație (Fig.2.5.). Animale PI (infecție persistentă - animale imunotolerante) sunt animale infectate in utero cu o tulpină necitopatogenă (NCP) între a 30 și a 125 zi gestație. Aceste animale prezintă viremie permanentă și excreție considerabilă de virus. Identificarea acestor animale este esențială în realizarea oricărui plan de combatere a bolii. Aceste animale PI, în general, nu supraviețuiesc mai mult de 2 ani. Depistarea animalelor cu viremie persistentă se face doar prin identificarea agentului etiologic (Letellier C. și colab., 2003).

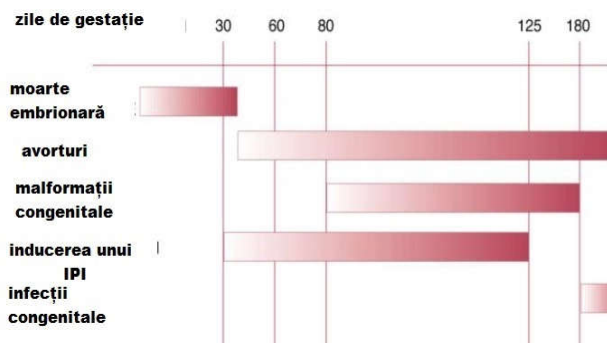


Fig. 2.5. Consecințele infecției cu VBVD în funcție de vârsta de gestație a femelei

Fig. 2.5. The consequences of BVDV infection according to the gestational age of the female (după Thiry, 2007)

În a doua parte a gestației când sistemul imunitar începe să se dezvolte, fătul este capabil să producă anticorpi însă nu suficienți pentru a combate în totalitate virusul, astfel va duce la apariția unor progenituri cu malformații congenitale. Infecția în ultima parte a gestației nu afectează cu nimic fătul determinând doar seroconversie. (Goyal SM și colab., 2005).

Forma de "boala mucoaselor" apare la animalele PI ca urmare a infecției asociate dintre o tulpină inițială infecțioasă și o tulpină având un biotip citopatic; acesta din urmă, putând fi ca urmare a suprainfecției (Bolin, 1995), mutația biotipului inițial sau recombinația între biotipuri necitocitopatogene (Loehr și colab., 1998). Această formulă clinică are o evoluție clinică fatală, uneori însoțită de o fază scurtă de diaree abundentă și pierdere semnificativă în greutate.

Morfopatologic se constată eroziuni ale mucoasei cavității bucale, în special la nivel gingival; eroziuni pe tot traiectul mucoasei digestive, în special la nivelul plăcilor Peyer din intestinul subțire și a formațiunilor limfoide din colon.

2.2.5. Diagnostic diferențial

În cazul suspiciunii de BVD trebuie făcut un diagnostic diferențial față de febră catarală malignă, pesta bovină, boala limbii albastre și a bolilor veziculoase (la acestea din urmă se observă apariția de vezicule înainte de eroziuni ale mucoasei). De asemenea se impune diagnostic diferențial față de boli cu manifestări digestive precum: salmoneloză, boala Johne și infestații parazitare.

2.3. Boala Border (Boala de graniță)

2.3.1. Definiție

Boala de graniță a fost semnalată pentru prima dată la ovine din rasele Kerry Hill și Clun Forest, la granița dintre Anglia și țara Galilor, de Hughes și col. în 1959, de unde și denumirea bolii. În Australia și Noua Zeelandă, a fost descrisă sub numele de „hairy shaker lamb disease” sau „fuzzy lamb” (boala mielului păros și tremurător) din cauza semnelor clinice. Ulterior, boala de frontieră a fost descrisă în America de Nord, Europa și Africa.

Boala de graniță produce pierderi economice importante la ovine, prin morbiditate, mortalitate neonatală, obținerea unor produși debili sau neviabili, avorturi și infecunditate.

2.3.2. Etiopatogeneză

Agentul patogen, virusul bolii border (VBD) este un pestivirus, care face parte din familia *Flaviviridae*, fiind strâns înrudit cu VBVD și VPPC (Thiel și colab., 2005). Acest pestivirus poate fi transmis între diferite specii de animale (rumegătoare și suine), deoarece aceste virusuri sunt antigenic înrudite. Este evident că VBVD și VBD sunt capabile să infecteze rumegătoare mici (Carlsson, 1991), în timp ce VBD poate infecta bovinele (Cranwell și colab., 2007) și porcii (Oguzoglu și colab., 2001; Schirrmeyer și colab. 1999; Rasmussen și colab., 2010).

Diagnosticul molecular a permis analiza secvențelor din genomul diferitelor pestivirusuri, relevând unele diferențe în nomenclatura și încadrarea lor.

Recent, tulpinile de VBD au fost încadrate pe baza înrudirii filogenetice în șapte genogroups (Tabelul 2.1.) (Becher și colab., 2003; Arnal și colab., 2004; Thabti și colab., 2005; Dubois și colab., 2008; Giammarioli și colab., 2011).

La ovinele adulte și la tineret, infecția este totdeauna subclinică. La oile gestante, virusul traversează placenta, infectând fetusul. Leziunile placentei se instalează la 10-20 de zile după infecție și pot conduce la insuficiență placentară, care are drept consecință hrănirea insuficientă a fetusului și apoi avortul. Modificările patologice ale fetusului depind de perioada de embriogeneză și dezvoltare fetală, manifestându-se prin moartea și rezorbția embrionului, moartea fetusului, avort, obținerea unor produși malformați sau a unor miei debili sau neviabili.

Tabel 2.1.

Încadrarea în genogrupuri ale VBD și originea lor

Table 2.1.

Border Disease Virus genogroups and their origin

Genotipuri VBD	Specia gazdă de la care a fost izolat	Referință
VBD 1	Tulpini ovine	Becher și colab., 2003
VBD 2	Căprioară, bizon, oaie	Becher și colab., 2003
VBD 3	Tulpini de origini porcine	Becher și colab., 2003
VBD 4	Capra pireniană	Arnal și colab., 2004
VBD 5	Tulpini ovine franceze	Dubois și colab., 2008
VBD 6	Tulpini ovine franceze	Dubois și colab., 2008
VBD 7 din Turcia	Oaie și capra	Oguzoglu și colab., 2009
VBD 7 din Italia	4 oi și o capră	Giammarioli și colab., 2011
Tunisian	Oi	Thabti și colab., 2005

Moartea și rezorbția embrionului sau fetusului au loc în primele 16-45 de zile de gestație. Forma tipică a bolii de frontieră o reprezintă obținerea de produși cu malformații, insuficient dezvoltați, neviabili. Acest sindrom este asociat cu perioada de 45-80 de zile de gestație.

Perturbarea procesului de mielinizare în sistemul nervos are drept consecință apariția unor deformații ale scheletului și dezvoltarea excesivă a foliculilor piloși, favorizând hirsutismul. Tremurăturile tonico-clonice sunt, de asemenea, rezultatul hipomielinogenezei. Unii fetoși infectați în această perioadă

supraviețuiesc până la termenul de fătare, dar rămân purtători persistenți ai virusului pentru tot restul vieții și un pericol permanent pentru animalele susceptibile. Ei elimină virusul pe termen lung, prin toate secrețiile și excrețiile, inclusiv prin spermă dar își păstrează seronegativitatea. La rândul lor, acești produși manifestă o debilitate congenitală și pot contracta cu ușurință alte infecții (Nettleton P.F și colab., 1998).

2.3.3. Epidemiologie

VBD afectează în mod natural ovinele și sporadic caprinele. Infecția cu VBD a fost identificată serologic, în afara ovinelor și caprinelor, la taurine, porcine, cervide și alte specii de ruminante sălbatice, care contribuie la întreținerea virusului în natură și la transmiterea acestuia la ovine. Deși boala de graniță a fost considerată o boală a ovinelor, infecțiile experimentale la vacile, caprele și scroafele gestante, au produs avorturi sau modificări patologice ale fetoșilor. În fermele cu infecție în primul sezon de reproducție, mieii pot fi afectați în proporție de 50%. Ulterior, incidența bolii clinice se reduce, boala devenind enzootică, oile adulte devin imune și boala va afecta numai mioarele și animalele nou-introduse în efectiv (Cranwell M.P și colab., 2007)

Infecția cu VBD se realizează prin contactul direct al animalelor infectate cu cele sănătoase. Deși virusul este prezent în învelișurile și lichidele fetale ale oilor infectate, observațiile au arătat că transmiterea bolii în perioada fătărilor este limitată.

2.3.4. Aspecte morfoclinice

La oile adulte negestante și la tineret, boala evoluează subclinic. Oile gestante pot prezenta o perturbare a funcției de reproducere, atunci când a avut loc moartea și resorbția embrionară. Boala clinică se manifestă la mieii. Unii dintre aceștia sunt hipotrepsici, debili, prezintă deformări ale craniului și anchiloze ale articulațiilor. La mieii din rasele cu lână fină, lâna este modificată, având aspectul unui păr lung, gros și inegal (hirsutism), uneori cu zone pigmentate.

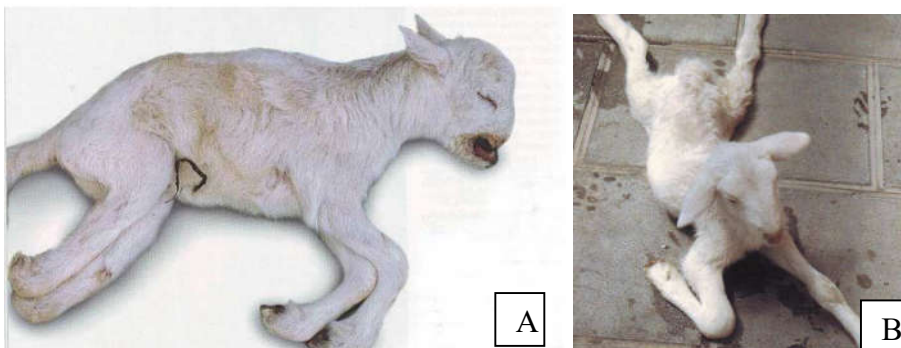


Fig. 2.6. Aspecte clinice în infecția cu VBD: A. Fetus fătat mort cu hiperflexia articulațiilor carpiene și tarsiene și deformări faciale; B. Ataxie pronunțată
Fig. 2.6. Clinical aspects in BDV infection: A. Still-born with hyperflexion of carp and tarsi and facial malformations; B. pronounced ataxia
(după L.M Ferrer, J García de Jalón, M. de las Heras, 2002)

Un număr însemnat de miei prezintă simptomatologie nervoasă exprimată prin spasme tonice sau clonice, care împiedică deplasarea și implicit, alăptarea. La unii dintre miei care reușesc să supraviețuiască, spasmele dispar după 3-4 luni. Infecția experimentală la iezi și viței, realizată prin infectarea mamelor în perioada de gestație s-a manifestat prin semne nervoase de gravitate mai redusă decât la miei, fără modificarea părului. (Cranwell MP și col., 2007).

Din punct de vedere lezional la oile care au avortat recent se constată necroza caruncurilor placentari.

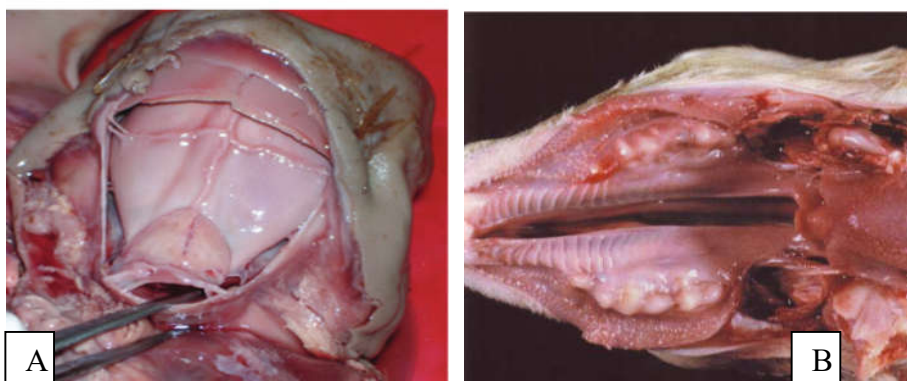


Fig. 2.7. Aspecte lezionale în infecția cu VBD : A. Hidraencefalie la un avorton ; B. Malformație a craniului – palatoschizis.
Fig. 2.7. Lesions in BDV infection: A. Hydranencephaly in an aborted lamb fetus. B. Palatoschisis (după L.M Ferrer, J García de Jalón, M. de las Heras, 2002)

La miei, modificările constatate au fost: greutate redusă la naștere, debilitate, hidrocefalie sau hidranencefalie, hipoplazie cerebeloasă și cerebrală, modificări ale scheletului, hirsutism.

2.3.5. Diagnostic diferențial

În cazul suspiciunii bolii border diagnosticul diferențial se impune față de:

- în cazul evoluției bolii la tineret: ataxia enzootică, meningo-encefalite bacteriene,
- în cazul evoluției bolii la femelele gestante: avortul salmonelic, clamidioză, bruceloză, febra Q, toxoplasmoză.

CAPITOLUL III. INFECȚIA SUINELOR DOMESTICE ȘI SĂLBATICE CU PESTIVIRUSURI DE LA RUMEGĂTOARE

CHAPTER III. INFECTION OF PIGS AND WILD BOARS WITH RUMINANT PESTIVIRUSES

Termenul de "virusuri emergente" include virusuri care pot fi încadrate în mai multe categorii diferite (Fig. 3.1.). Există virusuri complet noi care apar dintr-o dată la o specie gazdă fără nici o altă descriere anterioară. Cu toate acestea, virusurile în curs de evoluție includ virusurile care nu se potrivesc cu cele descrise anterior. Acestea pot fi denumite în curs de evoluție ca urmare a modificării modului de transmitere, a severității focarelor ca urmare a exacerbarii virulenței sau ca urmare a trecerii barierei de specie.

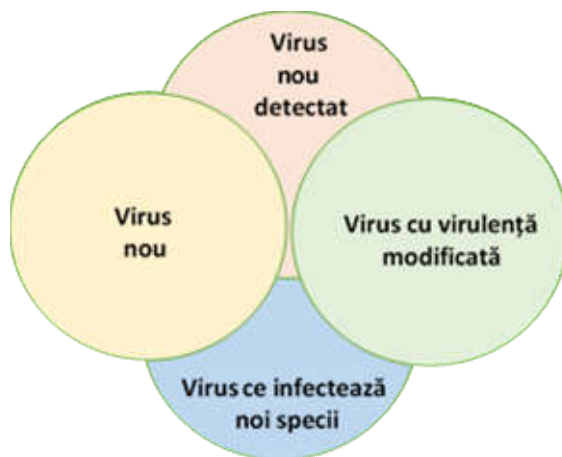


Fig. 3.1..Modelul predictiv de evoluție a virusurilor emergente
Fig. 3.1 Predictive model of development of emerging viruses
(după Ridpath JF, 2015)

Virusurile "emergente" pot fi virusuri ce au fost în circulație, timp de zeci de ani, dar noile metode de supraveghere și diagnostic au permis recent detectarea lor în populațiile de animale domestice sau fauna sălbatică. Exemple din toate

aceste categorii de "virusuri emergente" pot fi regăsite în cadrul genului Pestivirus.

Manifestările clinice au fost utilizate inițial pentru a diferenția speciile recunoscute de pestivirusuri: virusul pestei porcine clasice, virusul diareei virale bovine- boala mucoaselor și virusul bolii de graniță (bolii Border). În anii care au urmat a devenit evident că prezentarea clinică a infecției cu pestivirus este foarte variabilă în funcție de vârstă, de statutul imun al gazdei și virulență. Uneori variațiile de patogenitate ale pestivirusurilor pot avea impact asupra programelor de control așa cum este ilustrat cazul tulpinilor de VPPC cu virulență redusă și tulpini de VBVD cu virulență crescută.

Izolarea pestivirusurilor rumegătoarelor de la porci infectați natural reprezintă dovada directă a producerii infecției cu aceste virusuri cu sau fără evoluție clinică la această specie (Fernelius A.L și colab, 1973; Terpstra C. și colab, 1988). În plus s-a demonstrat că VBVD poate infecta și alte animale domestice cum ar fi porcii (Wang și colab., 1996), și chiar specii sălbatice (Vilcek și Nettleton, 2006). VBD produce infecții naturale nu numai ovine și caprine, dar, de asemenea la bovine (Cranwell și colab, 2007) și porcine (Vilcek și Belák, 1996). Singura specie de virus din genul Pestivirus, care nu a fost observată a traversa bariera de specie este VPPC, care este încă limitat la porcii domestici și porcii sălbatici (Liess și Moennig, 1990; Moennig și colab., 2000).

Infecții experimentale ale suinelor cu pestivirusurile rumegătoarelor au demonstrat sensibilitatea lor. Porcii infectați au dezvoltat viremie și anticorpi, iar virusul recuperat și-a păstrat virulența pentru viței (Passler T., 2010).

Infecțiile cu pestivirusurile rumegătoarelor la porci au o distribuție mondială. Prevalența este variată și depinde, în principal, de (I) contactul cu bovinele, (II) vârsta porcilor și (III) gradul de omologie între tulpina de virus folosită în testul serologic și tulpina sălbatică ce infectează (VBVD sau VBD) porcul. Anticorpii monoclonali disponibili fac diferența între VPPC și pestivirusurile rumegătoarelor. Studiile experimentale au explicat în mare măsură receptivitatea suinelor la infecția cu alte pestivirusuri.

Rezultate recente au arătat existența unor "structuri speciale" ale unor tulpini de VBVD ce asigură receptivitatea pentru celule de bovine, dar și că unele izolate se replică în culturi de celule linia PK15 (celule renale de porc). Din potrivă tulpinile BVDV multipotente au probabil, situs-uri de atașare suplimentare pentru celule de ovine și porcine. Identificarea receptorilor pentru celulele de origine ovină și porcine ar putea contribui la o distincție clară între infecțiile cu VBVD și VPPC la porci. Eficiența de replicare în celule heterologe variază semnificativ și poate într-o anumită măsură să reflecte abilități diferite pentru a interacționa cu

moleculele celulelor gazdă care servesc ca receptori pentru virus (Roche și Edwards, 1994).

Una sau mai multe molecule încă necaracterizate de pe suprafață celulelor mediază atașarea virionilor VBVD și VBD la celule de porcine (Moennig și col., 1988). Nu se cunoaște nimic încă despre cerințele celulei gazdă în momentul fuziunii în endozom și transferul capsidei pestivirusurilor la nivelul matricei citoplasmatică. S-a sugerat că pestivirusurile de ovine și porcine nu pot pătrunde în celule de bovine, cu excepția cazului în care variantele virale sunt selectate prin adaptare pe linii celulare bovine în urma pasajelor repetate (Moennig, 1990).

Bovine sunt considerate ca fiind principalul rezervor și sursa de VBVD pentru porci (Gatto I. și colab, 2014; Loeffen W. și colab, 2009). Lenihan și Colliery a constatat că 27,8% dintre scroafe serologic pozitive pentru VBVD au avut contact cu bovine, în timp ce 3,6% au fost scroafe seropozitive fără contact cu bovine, iar 4,5% dintre grăsuți au avut un număr redus sau nici un contact cu bovinele. Conform De Smit și colab. (2000) 59% dintre scroafe seropozitive pentru VBDV proveneau din ferme mixte (bovine și porci în aceleași locații) sau din fermele în care rumegătoare au fost ținute în imediata apropiere a crescătoriei de porci. Loeffen și colab. (2009) au evaluat mai mulți factori de risc asociați cu prezența porcinelor și rumegătoarelor în aceeași fermă sau în imediata apropiere a crescătoriei de porci. Ei au constatat că scroafe din fermele mixte au avut o probabilitate de 3,4 ori mai mare de a avea un statut-VBVD seropozitiv decât suinele fără contact cu bovinele. Mai mult decât atât, în cazul în care există mai mult 60 turme de rumegătoare pe o rază de 3 km în apropierea crescătoriei de porci, posibilitatea de a avea un răspuns VBVD-seropozitiv este 2,1-2,6 ori mai mare decât în cazul porcinelor unde în apropiere numărul de turme de bovine este mai mic de 60. Infecția porcine poate avea loc printr-un contact indirect, prin intermediul așternutului contaminate, sau vaccin accidental infectat cu VBVD (ser fetal bovin utilizat pentru întreținerea culturii celulare infectate cu virus vaccinal).

Astfel de infecții încrucișate sunt prezente la suine și pot interfera cu anchetele serologice pentru supravegherea la nivel de efectiv și prin urmare și să afecteze programele de eradicare ale pestei porcine clasice.

CAPITOLUL IV. DIAGNOSTICUL INFECȚIILOR CU PESTIVIRUSURI LA ANIMALE

CHAPTER IV. DIAGNOSIS OF PESTIVIRUS INFECTIONS IN ANIMALS

Certificarea statusului de sănătate al animalelor este necesară pentru o diversitate de scopuri comerciale. Acestea variază de la vânzare și introducerea de animale în efectivele de animale cu status epidemiologic cunoscut până la selecție pentru artificială programe de reproducere asistată, inclusiv selecția de masculi donatori de material seminal, cât și a vacilor primitoare pentru transferul de embrioni

Diagnosticul specific al infecțiilor cu pestivirusuri presupune o înțelegere a mecanismelor patogenetice virale în cazul infecției fetale, a persistenței virusului și dezvoltarea răspunsului imun. Infecția fătului la mai puțin de 100 de zile de gestație va duce la persistența pestivirusului în țesuturile fetale; infecția ulterioară (după 100 zile de gestație) va induce apariția anticorpilor specifici în sânge. Detectia virusului sau a anticorpilor specifici necesită selectarea corectă a probelor patologice și a testelor corespunzătoare, în vederea realizării unui diagnostic corect.

4.1. Diagnosticul serologic

Tipurile de teste serologice utilizate în mod obișnuit pentru testarea anticorpilor împotriva pestivirusurilor sunt:

- (A) Testul de imunodifuzie în gel de agar (IGA);
- (B) Testul de virusneutralizare (VN);
- (C) Testele ELISA.

Fiecare dintre aceste teste are un rol în diagnosticul infecției cu pestivirus. Alegerea unuia sau mai multora dintre aceste teste depinde într-o mare măsură de scopul testării. Testul de IGA este recunoscut că va detecta în mod fiabil

anticorpii împotriva tuturor tulpinilor de pestivirus, fie de bovine, ovine sau de origine porcină. În schimb, VN este mai puțin reactivă și reflectă un grad de specificitate de serotip. Totuși și în cazul VN se constată un grad semnificativ de reactivitate încrucișată între cele mai multe tulpini de pestivirus. Alegerea unei tulpini endemice a virusului ca antigen pentru VN ar trebui să permită, de obicei, detectarea anticorpilor neutralizanți (Wensvoort G. și colab., 1989).

Testul ELISA indirect este similar ca specificitate ca și VN. Testele de tip blocking ELISA au o sensibilitate ridicată și au avantajul că pot fi utilizate pentru a identifica anticorpi împotriva proteinelor virale specifice prin varierea anticorpului monoclonal care este folosit (Lin M. și colab., 2010) Pentru un examen serologic complet în cazul pestivirusurilor, un set cu mai multe antigene specifice este urmărit, de exemplu un set de peptide care reprezintă epitopi unici ale limfocitelor B pentru principalele proteine imunogene ale VPPC, VBVD și VBD. Utilizarea acestui test are totuși aplicații limitate în cercetare.

O diferență importantă între cele trei teste serologice principale este capacitatea lor de a detecta anticorpii specifici împotriva pestivirusurilor în momente diferite: după încetarea viremiei la animalele cu infecții acute sau la animalele cu infecție persistentă.

În primele două săptămâni de seroconversie, testul IGA și VN sunt mai sensibile decât ELISA ; dar după perioade, dar lungi (mai mare de nouă luni) VN și ELISA sunt mai sensibile decât testul IGA. Intensitatea reacției în testul IGA poate fi utilizat ca indicator al unei infecții recente (Le Potier și colab., 2006).

La animalele purtătoare, infectate persistent, anticorpii pot fi detectați doar uneori. Acest lucru se explică prin dezvoltarea fenomenului de imunotoleranță față de antigenele specifice ale tulpinii de pestivirus responsabil pentru infecția persistentă. În cazul în care animalul se reinfectează cu o tulpină de pestivirus divergentă antigenic și filogenetic, ea poate induce producerea de anticorpi specifici față de antigenele care diferă de cele ale tulpinii persistente. Astfel de reacții sunt adesea detectate în testul IGA, dar în acest caz titrurile sunt foarte mici.

4.2. Diagnosticul virusologic

4.2.1 Metode de izolare și cultivare ale pestivirusurilor

Virusurile din genul Pestivirus, în general, se replică bine în culturi celulare primare și continue derivate din gazda receptivă: virusul diareei virale se replică în culturi celulare de fibroblaste sau celule embrionare renale de bovine. VBD este cel mai bine izolat prin cultivare pe celule ovine și VPPC în celule limfoide sau

renale de porc. Pestivirusurile izolate de la animale infectate natural sunt predominant non-citopatice în culturi celulare.

Culturile celulare de origine ovină sunt folosite cu succes pentru izolarea și cultivarea VBD și BVDV de tip 1 și 2. Culturile utilizate până în prezent au fost reprezentate de celule testiculare, traheale embrionare sau celulele cornetelor nazale. În cazul infecției cu VBD, de la animale vii se poate recolta sânge în faza de viremie, cel mai sensibilă metodă pentru a confirma viremiei este utilizarea unui inocul din leucocite, și cultivarea lor pe celule sensibile timp de 5-7 zile.

Izolarea virusului PPC în culturi celulare este o metodă sensibilă dar relativ lentă în ceea ce privesc alternativele pentru diagnostic. Izolarea este cel mai bine realizată pe linia celulară PK-15 în cazul infecției cu inocul viral reprezentat de o suspensie 2% din țesut amigdalien. Alternativ, splina, rinichi, porțiuni de ileon sau limfoganglioni pot fi de asemenea folosiți ca și material patologic.

4.2.2. Identificarea pestivirusurilor utilizând metode imunologice

Introducerea metodelor ELISA directe (pestivirus antigen capture test) a revoluționat identificarea rumegătoarelor cu infecție persistente. Metoda nu se bazează pe culturi de celule și prin urmare, este mai puțin costisitoare și este relativ rapid, permițând un diagnostic să fie făcut în termen de 1-2 zile în loc de câteva săptămâni. De asemenea, metoda permite testarea unui număr mult mai mare de probe concomitent (Shannon AD și colab., 1991). Testul se bazează pe utilizarea de asociații de anticorpi pentru a captura antigenul pe suprafața godeurilor și un alt set de anticorpi pentru detectarea antigenului legat. Unele teste folosesc un antiser policlonal larg reactiv pentru a captura antigenul și un amestec de mai multe grupări reactive ale anticorpilor monoclonali pentru detectarea antigenului legat. Datorită utilizării acestor amestecuri de anticorpi, testul este foarte specific pentru pestivirusuri, dar este de asemenea, în mare parte reactiv în cadrul grupului pestivirusurilor. Un astfel de test ELISA configurat corect va detecta VBVD (tip I și tip II), VBD și VPPC (Entrican G. și colab., 1994).

De asemenea este posibil utilizarea de anticorpi monoclonali pentru obținerea de teste specifice pentru identificarea de specii de pestivirusuri individuale, adică, fie VBVD, VBD sau VPPC. Pentru VBVD există două genotipuri antigenic distincte, tipul 1 și 2, cu subspecii genetice sesizabile. Cele două genotipuri pot fi diferențiate unul de altul, și de celelalte pestivirusuri utilizând anticorpi monoclonali (MAbs) îndreptați împotriva glicoproteinelor majore E2 și E^{RNS} (Vilcek S. și colab., 2001). Detecția antigenelor virale specifice

pestivirusurilor se poate realiza utilizând testul de imunofluorescență directă și testul imunohistochimic pe secțiuni de țesut congelat.

4.2.3. Identificarea pestivirusurilor utilizând tehnicile de biologie moleculară

Având în vedere importanța pestivirusurilor, impactul economic al bolilor și riscurile folosirii produselor biologice contaminate, există necesitatea de a dezvolta metode sensibile pentru detectarea pestivirusurilor și identificarea lor. Pentru a satisface această cerință, o serie de teste RT-PCR au fost dezvoltate pentru detectarea rapidă, specifică și sensibilă a pestivirusurilor din probe patologice recoltate de la animale precum și în produsele biologice.

Izolarea pestivirusurilor de la animale sălbatice este necesară pentru a permite o înțelegere a eventualelor moduri de transmitere a pestivirusurilor între animale domestice și care trăiesc liber. Cu toate acestea, recunoașterea faptului că pestivirusurile pot fi contaminanți semnificativi ale componentelor utilizate pentru cultivarea virusurilor în culturi celulare trebuie să fie luată în considerare. Pestivirusurile pot contamina un spectru larg de linii celulare de mamifere care sunt utilizate pentru cultivarea virusurilor. Serul fetal de vițel utilizat ca supliment în mediu de cultură este adesea o sursă nedorită de VBVD, deoarece astfel de seruri pot fi colectate de la descendenții bovinelor infectate cu VBVD.

Nu numai porcii domestici, ci și mistreții sunt susceptibili la infecția cu VPPC (Laddomada, 2000). VPPC a fost izolat de la porci mistreți în diferite țări europene precum Austria, Republica Cehă, Franța, Germania, Italia, Slovacia, Elveția (Bartak și Greiser-Wilke, 2000; Biagetti și col., 2001; Fritzemeier și col., 2000; Jemersic și col., 2003; Laddomada, 2000) și au fost legate direct de focare de pestă porcină clasică la porcii domestici. O tulpină relativ rară a VPPC citopatică izolată din mistreț în 1982 a fost caracterizată recent (Aoki și col., 2001).

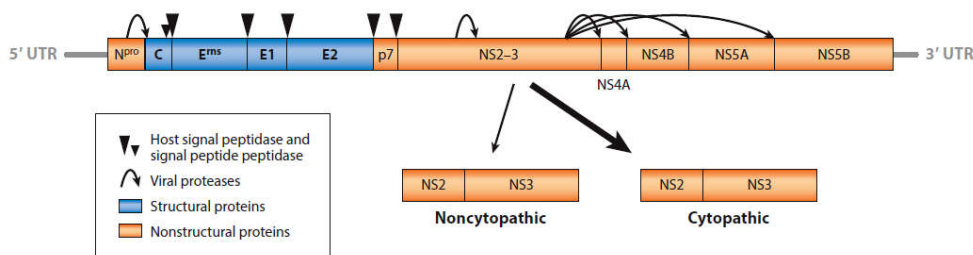


Fig 4.2.Structura genomului la pestivirusuri

Fig. 4.2. Pestivirus genome structure
(după Schweizer M, Peterhans E., 2014)

O contribuție semnificativă la identificarea de noi pestivirusuri și încadrarea mai precisă a venit în urma aplicării metodelor moleculare, și anume RT-PCR și secvențierea, urmată de analiza filogenetică. În prezent, este cunoscut că genomul pestivirusurilor are lungimea de 12,3 kbp, este reprezentat de o moleculă de ARN de sens pozitiv, compus dintr-un singur ORF care codifică 4000 de aminoacizi.

Pentru tipizarea genetică și analiză filogenetică a pestivirusurilor mai multe secvențe genomice parțiale inclusiv 5'-UTR precum regiunile genomice care codifică Npro și E2 au fost utilizate în mod frecvent (Becher și col., 2003; Dubois și col., 2008).

Criteriile de demarcare a speciilor de pestivirus includ: înrudirea secvenței de nucleotide, încrucișarea serologică și gazdă de origine. Noile pestivirusuri descrise în prezent necesită o caracterizare suplimentară înainte de clasificarea finală. Gazda de origine este deosebit de pertinentă pentru această revizuire, care încearcă să identifice gazde naturale aparente ori de câte ori este posibil.

Reacția de amplificare a lanțurilor de acizi nucleici (PCR), este folosită pentru a se detecta genomul viral în probe de sânge, țesut sau organ. Fragmente mici ale ARN-ului viral sunt transcrise în fragmente de ADN care apoi sunt amplificate prin reacția PCR, producându-se cantități detectabile. Întrucât acest test detectează doar o secvență a genomului viral, PCR poate fi pozitiv chiar și atunci când nu este prezent virusul (ex. țesuturi autolizate sau probe de la porcii convalescenți).

PCR-ul poate fi folosit pentru probe care au fost atent selectate de la animale suspecte sau din materii provenind de la feteșii avortați. Poate fi o metodă indicată pentru carcasele de porcii sălbatici, dacă materialul este autolizat și nu este posibilă izolarea virusului datorită citotoxicității.

Materialele potrivite ca probă pentru diagnosticul prin PCR sunt organele descrise pentru izolarea virusului sau sângele necoagulat. PCR-ul poate fi realizat în 48 de ore. Necesită un echipament de laborator adecvat, spații separate și personal calificat. Un avantaj este că particulele de virus nu sunt replicate în laborator. Metoda este foarte sensibilă, dar poate surveni ușor contaminarea, ceea ce conduce la rezultate fals pozitive. De aceea, este esențială existența unor proceduri eficiente pentru controlul calității. Unele metode sunt specifice mai degrabă pentru pestivirusuri decât pentru virusul peștei porcine clasice, necesitând teste de confirmare ulterioare, cum ar fi secvențializarea produsului PCR obținut.

Tipizarea sistematică a izolatelor VBD au condus la identificarea a cel puțin șapte genotipuri (BDV-1-BDV-7). Până în prezent secvențe genomice complete au fost raportate pentru genotipurile BDV-1, -2, -3, -4 și (Avalos-

Ramirez și col., 2001, Rasmussen și col., 2010; Vilcek și col., 2010). Tulpina VBD Aveyron a fost utilizată ca o tulpină de referință în multe laboratoare de virologie. În plus, tehnica RT-PCR pentru detecția specifică a VBD a fost descrisă de Willoughby și col. (2006).

Virusul pestei porcine clasice poate fi detectat prin RT-PCR folosind o singură sondă hidrolizată specifică (TaqMan) (Risatti și col., 2003; Hoffmann și col., 2005; Ophuis și col., 2006; Liu și col., 2007; Zhao și col., 2008), sau două sonde de hibridizare (van Rijn și col., 2004). Utilizând reacția RT-PCR s-a realizat detecția BVDV-1 și BVDV-2 (Baxi și col., 2006). Toate aceste teste sunt utile pentru detectarea specifică a speciilor de pestivirusuri în probele clinice și pentru a sprijini programele de control.

Pe măsură ce noi specii sau variante noi de virusuri sunt în mod continuu în curs de evoluție și care prezintă amenințări la adresa sănătății și bunăstării animalelor este necesar să se păstreze actualizarea și modificarea testelor de diagnostic, precum și dezvoltarea de noi tehnici pentru detectarea cât mai specifică a pestivirusurilor. Detectarea rapidă, sensibilă și specifică a acestor agenți patogeni este pasul cheie către un control mai eficient al bolilor.

PARTEA A II A CONTRIBUȚII PERSONALE

PART II PERSONAL CONTRIBUTIONS

CAPITOLUL V

INVESTIGAȚII SEROEPIDEMIOLOGICE ASUPRA INFECȚIEI CU VIRUSUL PESTEII PORCINE CLASICE

CHAPTER V.

SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS ON CLASSICAL SWINE FEVER

5.1. Anchetă seroepidemiologică privind pesta porcină clasică la suinele domestice în estul României

Până în anul 2001, când au fost notificate oficial primele focare de pestă porcină clasică, vaccinarea profilactică a fost obligatorie pentru toți porcii domestici din România, pentru vaccinare utilizându-se un vaccin viu atenuat. Vaccinarea s-a interzis în anul 2003 la porcinele din exploatațiile non-profesionale, fiind acceptate derogări pentru unele exploatații comerciale cu efective mari de porcine, unde vaccinarea s-a aplicat până la 31.12.2005. Între anii 2001 – 2007 pesta porcină clasică (PPC) a fost diagnosticată în special în exploatațiile non-profesionale. Ultimul focar de PPC la porcii domestici a fost diagnosticat în luna octombrie a anului 2007.

Majoritatea cazurilor de pestă porcină clasică apărute până în anul 2007 au fost diagnosticate în exploatațiile mici din gospodăriile populației din sudul României sau la porcii domestici crescuți temporar liber din județul Brăila. În luna august 2007, boala a evoluat în trei exploatații comerciale mari din partea de vest a României afectând mai mult de 50.000 porcine domestice.

În lunile noiembrie și decembrie din anul 2008 a fost efectuată vaccinarea de urgență în 22 de județe. În anul 2009 vaccinarea a fost realizată în două campanii pe teritoriul a 33 de județe. În anul 2010 și 2011 vaccinarea a fost efectuată în 8 județe ale României într-o zonă tampon la granița de nord - est cu Ucraina și Republica Moldova.

Prezentul studiu s-a realizat pentru a determina prevalența anticorpilor specifici anti-VPPC în ser sau plasma. Regiunea luată în studiu a fost partea de est a României : județele Vaslui, Suceava și Iași.

Testul ELISA presupune că anticorpii din serurile de analizat sunt recunoscuți și fixați de către antigenul de captură (legat la placă). La rândul lor anticorpii, recunosc și fixează anticorpi-anti-anticorpi cuplați cu enzima (conjugatul imunoenzimatic) care descompune substratul și produce oxidarea cromogenului, a cărei culoare se schimbă. Intensitatea acesteia se măsoară la o anumită lungime de undă cu ajutorul unui spectofotometru exprimându-se în DO (unități densitate optică). Există o relație directă între valoarea DO și cantitatea de anticorpi din proba analizată.

5.1.1. Material și metodă (descrierea metodelor utilizate în vederea detecției de anticorpi)

Au fost recoltate probe de sânge de la porcii domestici din județele Vaslui, Suceava și Iași în perioada 2007-2012. Din exploatațiile nonprofesionale au fost recoltate un număr de 12543 probe din județul Vaslui, 11374 probe din județul Suceava și 22261 probe din județul Iași. Din exploatațiile profesionale au fost recoltate un număr de 566 probe din județul Vaslui, 2417 probe din județul Suceava și 4678 probe din județul Iași.

- Protocolul de lucru privind detecția anticorpilor specifici anti-virusului pestei porcine clasice (CSFV) din ser sau plasmă cu kitul Ceditest CSFV (Cedi-Diagnostics)(E2)

Testul folosește doi anticorpi monoclonali pentru a măsura legarea anticorpilor din proba de cercetat la proteina E2 a virusului pestei porcine clasice. Antigenul este reprezentat de proteina E2 exprimată în celule de insecte infectate cu baculovirus care a fost inserat cu gena pentru proteina E2 virală.

Modul de lucru

S-au identificat probele, s-a decantat serul în tuburi micronic de 1 ml.

Toate componentele kitului au fost aduse la temperatura camerei înainte de începerea lucrului.

- s-au pus câte 50μl în godeurile A1 și B1 din serul martor 1
- s-au pus câte 50μl în godeurile C1 și D1 din serul martor 2
- s-au pus câte 50μl în godeurile E1 și F1 din serul martor 3
- s-au pus câte 50μl în godeurile G1 și H1 din serul martor 4
- s-au pus câte 50μl din serurile de testat în godeurile rămase.
- s-au pus câte 50μl din conjugatul la diluția de lucru, în toate godeurile.
- s-au pus câte 50μl din antigen la diluția de lucru, în toate godeurile.
- s-a acoperit placa cu o folie adezivă și se agită ușor pentru omogenizare.
- s-a incubat 90 de minute la temperatura camerei.

- s-a spălat placa de 6 ori cu soluție de spălare apoi se bate ferm.
- s-au pus câte 100μl din soluția cromogen/substrat în toate godeurile.
- s-au incubat 15 - 20 de minute la temperatura camerei.
- s-au pus câte 100μl soluție de stopare în toate godeurile și s-a omogenizat coținutul godeurilor.

Citirea și calcularea rezultatelor

- Densitatea optică (DO) se măsoară la 450 nm în cel mult 15 minute de la stopare.
- S-a calculat densitatea optică medie a serului martor 1 din godeurile A1 și B1.
- S-a calculat densitatea optică medie corectată a serurilor martor 2, 3, 4 și a probelor prin substracția DO medie a serului martor 1.
- S-a calculat procentul de inhibiție (PI) a serului martor 2, 3 și a probelor după următoarea formulă:

$$PI = 100 - \frac{DO \text{ corectată a probei}}{DO \text{ corectată a serului martor 4}} \times 100$$

Criterii de validare:

- DO medie a serului martor 1 < 0,250
- DO medie a serului martor 4 > 1,000
- PI a serului martor 2 > 50%
- PI a serului martor 3 < 50%
- PI < 30% - Negativ – Anticorpul specific virusului pestos sunt absenți în probă
- P > 50% - Pozitiv – Anticorpul specific virusului pestos prezenți în probă.
- PI între 31-50% - Dubios – Probele se repetă cu acest test. Dacă obținem același rezultat se retestează probele prin virusneutralizare.

5.1.2. Rezultate și discuții

Investigațiile seroepidemiologice au fost realizate în intervalul 2007-2012 în trei județe din zona de est a Moldovei: Vaslui, Suceava și Iași. Probele au provenit de la suine domestice din exploatații profesionale dar și non-profesionale.

Rezultate privind diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic în județul Vaslui în perioada 2007-2012

Investigațiile seroepidemiologice privind pesta porcină clasică au constat în recoltarea de probe de sânge cu scopul evidențierii anticorpilor specifici față de virusul pestei porcine clasice.

Tabel 5.1

Dianosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Vaslui în anii 2007-2008

Table 5.1

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Vaslui County during 2007-2008

TEST	Specificație	2007		2008	
		Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale	Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale
Serologic ELISA E2	Nr.de probe	-	2713	-	1095
	Probe pozitive	-	2702	-	1095
	Probe negative	-	11	-	-

Din analiza datelor prezentate în tabelul 5.1. se poate observa că în urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică, în anul 2007 pe 2713 probe recoltate din exploatațiile non-profesionale au fost identificate un număr de 2702 suine seropozitive, reprezentând o seroprevalență de 99,59%.

În anul 2008 în județul Vaslui, în urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 1095 probe recoltate din exploatațiile non-profesionale, toate probele au fost identificate ca seropozitive, reprezentând o seroprevalență de 100%.

Prin examen serologic folosind metoda ELISA au fost testate în anul 2009, 2190 seruri provenite de la suine din exploatații non-profesionale, toate animalele fiind identificate ca seropozitive. Identificarea a 100% dintre animalele testate ca fiind seropozitive este explicată de obligativitatea vaccinării animalelor, ca urmare a campaniei naționale de prevenire specifică a pestei porcine clasice.

În urma efectuării examenului serologic în anul 2010 folosind tehnica imunoenzimatică, cele 74 probe provenite din exploatații profesionale au fost identificate ca fiind negative.

Tabel 5.2

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Vaslui în anii 2009-2010

Table 5.2

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Vaslui County during 2009-2010

TEST	Specificație	2009		2010	
		Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale	Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	-	2190	74	-
	Probe pozitive	-	2190	-	-
	Probe negative	-	-	74	-

Investigațiilor serologice efectuate în vederea diagnosticul pestei porcine clasice pe probe recoltate din județul Vaslui în anul 2011 și 2012 sunt prezentate în tabelul nr. 5.3. Rezultatele testelor utilizând tehnica imunoenzimatică pe probe de ser suin recoltate din exploatațiile non-profesionale (2471 probe recoltate în 2011 și 4074 probe recoltate în 2012) au evidențiat absența seroconversiei față de virusul PPC.

Tabel 5.3

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Vaslui în anii 2011-2012

Table 5.3

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Vaslui County during 2011-2012

TEST	Specificație	2011		2012	
		Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale	Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	202	2471	290	4074
	Probe pozitive	-	-	-	-
	Probe negative	202	2471	290	4074

În urma testării prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică a 202 probe recoltate în anul 2011 și 290 probe recoltate în anul 2012 din exploatațiile profesionale, toate probele au fost identificate ca fiind seronegative.

Rezultate privind diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic în județul Suceava în perioada 2007-2012

Probele de sânge investigate cu scopul evidențierii anticorpilor specifici pestei porcine clasice au provenit de la suinele domestice din exploatații profesionale dar și non-profesionale din județul Suceava.

Tabel 5.4

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Suceava în anii 2007-2008

Table 5.4

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Suceava County during 2007-2008

TEST	Specificație	2007		2008	
		Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale	Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	-	3147	-	2164
	Probe pozitive	-	3147	-	2064
	Probe negative	-	-	-	100

Testarea serologică a fost realizată pe 3147 probe recoltate din exploatațiile non-profesionale. Toate probele testate au fost identificate ca pozitive ceea ce corespunde unei seroprevalențe de 100%.

În urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 2164 probe recoltate din exploatațiile non-profesionale, 2064 probe au fost identificate ca seropozitive, reprezentând o seroprevalență de 95.3% și 100 probe au fost identificate ca fiind negative, concluzia fiind că serurile negative provin de la animale nevaccinate.

Din analiza datelor prezentate în tabelul 5.5. se poate observa că în anul 2009 în urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 1605 probe recoltate din exploatațiile non-profesionale, 1580 probe au fost identificate ca seropozitive, reprezentând o seroprevalență de 98.4% și 25 probe au fost identificate ca fiind negative, concluzia fiind că acestea din urmă proveneau de la animale nevaccinate.

Tabel 5.5

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice
în județul Suceava în anii 2009-2010

Table 5.5

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine
in Suceava County during 2009-2010

TEST	Specificație	2009		2010	
		Exploatații profesionale	Exploatații non- profesionale	Exploatații profesionale	Exploatații non- profesionale
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	406	1605	162	-
	Probe pozitive	-	1580	-	-
	Probe negative	406	25	162	-

În urma testării prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 406 probe recoltate din exploatațiile profesionale, 406 probe au fost identificate ca seronegative, reprezentând o seroprevalență de 100%, urmare a faptului că în anul 2009 nu s-a mai făcut vaccinarea în ferme cu vaccin marker.

În anul 2010 ca urmare a efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 162 probe recoltate din exploatațiile profesionale, toate probele au fost identificate ca fiind seronegative.

Tabel 5.6

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice
în județul Suceava în anii 2011-2012

Table 5.6

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine
in Suceava County during 2011-2012

TEST	Specificație	2011		2012	
		Exploatații profesionale	Exploatații non- profesionale	Exploatații Profesionale	Exploatații non- profesionale
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	1200	3029	649	1429
	Probe pozitive	-	-	-	-
	Probe negative	1200	3029	649	1429

În urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe probe recoltate din exploatațiile non-profesionale (3029 probe recoltate în anul

2011 și 1429 probe recoltate în anul 2012) din județul Suceava, toate probele au fost identificate ca fiind seronegative pentru Atc anti-VPPC.

În urma testării prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică a probelor recoltate din exploatațiile profesionale (1200 probe recoltate în anul 2011 și 649 probe recoltate în anul 2012), toate probele au fost identificate ca seronegative, reprezentând o seroprevalență de 100%.

Rezultate privind diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic în județul Iași în perioada 2007-2012

În urma investigațiilor serologice realizate în anul 2007 folosind tehnica imunoenzimatică pentru identificarea anticorpilor împotriva glicoproteinei E2 a virusului pestei porcine clasice, s-a constatat că din 3353 probe recoltate din exploatațiile non-profesionale au fost identificate un număr de 2804 suine seropozitive, reprezentând o seroprevalență de 83,62%.

Tabel 5.7 /Table 5.7

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Iași în anii 2007-2008

Table 5.7

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Iași County during 2007-2008

TEST	Specificație	2007		2008	
		Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale	Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale
Serologic ELISA E2	Nr.de probe		3353	47	2389
	Probe pozitive		2804	-	2186
	Probe negative		549	47	198

În anul 2008 în urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 2389 probe recoltate de la porcii din exploatațiile non-profesionale, 2186 probe au fost identificate ca seropozitive, reprezentând o seroprevalență de 95,50% și 198 probe au fost identificate ca fiind negative, acestea din urmă provenind de la animale nevaccinate. Testarea a 47 probe provenite din exploatațiile profesionale de la porcii de reproducție importati au fost negative (animalele provenite din state ale Comunității Europene nu se vaccinau).

Tabel 5.8

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice în județul Iași în anii 2009-2010

Table 5.8

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine in Iași County during 2009-2010

TEST	Specificație	2009		2010	
		Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale	Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	940	7496	718	20
	Probe pozitive	12	7158	-	20
	Probe negative	928	338	718	-

În anul 2009 în urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 7496 probe recoltate din exploatațiile exploatațiile non-profesionale, 7158 probe au fost identificate ca seropozitive, reprezentând o seroprevalență de 95.49% și 338 probe au fost identificate ca fiind negative, concluzia fiind că acestea din urmă proveneau de la animale nevaccinate.

Tot în anul 2009 în urma testării prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 940 probe recoltate din exploatațiile profesionale, 928 probe au fost identificate ca seronegative, reprezentând o seroprevalență de 98,72%, și 12 probe au fost seropozitive (tineretul porcine care provine din scroafe indigene vaccinate atât cu vaccin viu inactivat cât și cu marker).

În anul 2010, în urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 20 probe recoltate din exploatațiile non-profesionale, toate probele au fost identificate ca seropozitive.

În urma testării prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 718 probe recoltate din exploatațiile profesionale, toate probele au fost identificate ca seronegative, reprezentând o seroprevalență de 100%.

Din analiza datelor prezentate în tabelul 5.9. se poate observa că în urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 5520 probe recoltate în anul 2011 din exploatațiile non-profesionale și pe 3483 probe recoltate în anul 2012 tot din exploatațiile non-profesionale, toate probele au fost identificate ca seronegative.

Tabel 5.9

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la suinele domestice
în județul Iași în anii 2011-2012

Table 5.9

The serological diagnosis of classical swine fever in domestic swine
in Iași County during 2011-2012

TEST	Specificație	2011		2012	
		Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale	Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	1476	5520	740	3483
	Probe pozitive	-	-	-	-
	Probe negative	1476	5520	740	3483

Folosind aceeași tehnică imunoenzimatică pe 1476 probe recoltate din exploatațiile profesionale în anul 2011 și 740 probe recoltate în anul 2012, toate probele au fost identificate ca seronegative reprezentând o seroprevalență de 100%.

5.1.3. Concluzii parțiale

Investigațiile serologice privind pesta porcină clasică au fost efectuate perioada 2007-2012 pe probe recoltate de la suine domestice provenite exploatații profesionale și non-profesionale.

Porcinele identificate ca fiind pozitive pentru Atc anti-VPSC relevă prezența seroconversiei față de virusul pestei porcine clasice în județele Iași, Suceava și Vaslui.

În perioada 2007-2012 seropozitivitatea suinelor domestice este justificată prin inițierea campaniilor de vaccinare de urgență reglementate prin programul național de control al pestei porcine clasice pe teritoriul României.

5.2. Anchetă seroepidemiologică privind pesta porcină clasică la mistreți în estul României

Când virusul pestei porcine clasice circulă într-o populație de mistreți probabilitatea detectării animalelor infectate este destul de scăzută, deoarece la o anumită perioadă de timp o mică proporție de animale este infectată acut și virusul nu poate fi detectat pentru mai mult de câteva săptămâni după infecție (EU - Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 1999). Dimpotrivă,

seroprevalența este detectabilă la niveluri scăzute de incidență, deoarece anticorpii pot fi detectați pe întreaga durată de viață a animalului infectat (von Ruden et al, 2008). În cadrul studiului au fost prelevate probe de la toți mistreții morți și vânați, care ulterior au fost supuse testării serologice. Astfel a putut fi evaluată situația epidemiologică și monitorizarea rezultatelor campaniilor de vaccinare.

5.2.1. Material și metodă

Au fost recoltate probe de sânge de la mistreți din județele Vaslui, Suceava și Iași în perioada 2007-2012. Au fost recoltate un număr de 672 probe din județul Vaslui, 1692 probe din județul Suceava și 751 probe din județul Iași.

Metoda utilizată pentru detecția de anticorpi este aceeași ca la probele analizate de la suine domestice prezentate anterior. În timpul programului de vaccinare cu vaccin marker, pentru diagnosticul serologic a fost folosit un kit ELISA pentru detectarea anticorpilor împotriva proteinei E^{ms}. Când vaccinarea a fost oprită a fost utilizat un kit ELISA pentru detectarea anticorpilor împotriva proteinei E2.

5.2.2. Rezultate și discuții

Investigațiile seroepidemiologice au fost realizate în intervalul 2007-2012 în județe din zona de est a Moldovei în județele Vaslui, Suceava și Iași. Probele au provenit de la suine sălbatice. Investigațiile seroepidemiologice pentru pesta porcină clasică au constatat în recoltarea de probe de sânge cu scopul evidențierii anticorpilor specifici pestei porcine clasice.

În 2002, mistreții au fost vaccinați pe cale orală, în majoritatea județelor, folosind ouă de găină în care era inoculată o doză de tulpină de virus viu atenuat. Teoretic, s-a distribuit o momelă pentru fiecare mistreț. Momelile vaccinale au fost utilizate de două ori în timpul campaniilor de revaccinare, în sezonul rece, doar dacă exista zăpadă.

În anii 2007-2008, până în luna noiembrie, vaccinarea împotriva PPC la porcii mistreți a fost compromisă datorită deficiențelor în achiziționarea momelilor.

Pentru anul 2008, s-a realizat numai o vaccinare (o administrare cu rapel) din cele 6 planificate, în 24 de județe. Vaccinarea s-a efectuat în perioada noiembrie –decembrie, în numai 1577 fonduri de vânătoare, la 43112 mistreți din 24 județe, aplicându-se 131794 de momeli vaccinale, din care 3451 momeli au fost recuperate și distruse ca nefolosite. Evaluarea imunității postvaccinale s-a făcut în 16 județe, pe un număr de 1267 mistreți (adulți și tineret) vaccinați.

Pentru anul 2009 s-au realizat 3 campanii de vaccinare în 33 de județe, fiind vaccinați 47938 mistreți.

În anul 2010 s-a efectuat vaccinarea în 3 campanii la 6757 mistreți (adulți și tineret) în 8 județe aplicând o politică de vaccinare de urgență a mistreților din zonele cu risc epidemiologic la granița cu țările terțe vecine, pe un cordon de 20 Km (buffer zone), unde situația epidemiologică nu era cunoscută, luând în considerare densitatea mistreților și circulația acestora.

În anul 2011 s-a efectuat vaccinarea în 3 campanii la 4489 mistreți (adulți și tineret) în 8 județe aplicând o politică de vaccinare de urgență a mistreților în zonele cu risc epidemiologic la granița cu țările terțe vecine unde situația epidemiologică nu era cunoscută (Ucraina, Moldova), pe cordon de 20 Km (buffer zone), luând în considerare densitatea mistreților și circulația acestora.

În anul 2012 nu s-a efectuat vaccinarea în populația de mistreți pe întreg teritoriul României.

Rezultatele diagnosticului pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Vaslui în perioada 2007-2012

În anul 2007 toate seruri testate, provenite de la 90 mistreți au fost identificate ca fiind seronegative. În anul 2008 prin examen serologic folosind metoda ELISA au fost testate 121 seruri provenite de la mistreți, toate animalele fiind identificate ca seronegative.

Tabel 5.10

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți
în județul Vaslui în anii 2007-2008

Table 5.10

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Vaslui County during 2007-2008

TEST	Specificație	Total 2007	Total 2008	Vârsta Mistreți 2008		
				<1	1-2	>2
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	90	121	34	32	55
	Probe pozitive	-	-	-	-	-
	Probe negative	90	121	34	32	55

În anul 2009 investigațiile serologice la mistreți au constatat în testarea unui număr de 112 seruri, dintre care 6 au fost identificate ca fiind pozitive, reprezentând o seroprevalență de 5,35%. Animalele identificate ca fiind pozitive pentru Atc anti-PPC au avut vârsta mai mare de un an. Această valoare redusă

de seropozitivitate se datorează numărului mic de suine sălbatice vaccinate împotriva peștei porcine clasice folosind momeli vaccinale.

Tabel 5.11

Dianosticul peștei porcine clasice prin examen serologic la mistreți
în județul Vaslui în anii 2009-2010

Table 5.11

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Vaslui County during 2009-2010

TEST	Specificație	Total 2009	Vârsta Mistreți 2009			Total 2010	Vârsta Mistreți 2010		
			<1	1-2	>2		<1	1-2	>2
Elisa E2	Nr. de probe	112	36	31	45	116	49	37	30
	Probe pozitive	6	-	1	5	7	4	1	2
	Probe negative	106	36	30	40	109	45	36	28

În urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 116 probe recoltate de la mistreți, 7 probe au fost identificate ca seropozitive și 109 probe au fost identificate ca fiind negative, acestea din urmă provenind de la animale nevaccinate.

Tabel 5.12

Dianosticul peștei porcine clasice prin examen serologic la mistreți
în județul Vaslui în anii 2011-2012

Table 5.12

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Vaslui County during 2011-2012

TEST	Specificație	Total mistreți 2011	Vârsta Mistreți 2011			Total mistreți 2012	Vârsta Mistreți 2012		
			<1	1-2	>2		<1	1-2	>2
Elisa E2	Nr.de probe	138	36	51	51	95	6	38	51
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	138	36	51	51	95	6	38	51

Din analiza datelor prezentate în tabelul nr. 5.12. se pot observa rezultatele testării prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică a 138 probe recoltate de la mistreți în anul 2011 și 95 probe recoltate de la mistreți în anul 2012, toate au fost identificate ca fiind negative.

Rezultatele diagnosticului pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți în județul Suceava în perioada 2007-2012

Investigațiile serologice privind infecția cu virusul pestei porcine clasice la mistreții de pe teritoriul județului Suceava au constatat în testarea unui număr de 1662 seruri prelevate în perioada 2007-2012. Probele prelevate au fost testate prin metoda imunoenzimatică utilizând un kit comercial ce detectează anticorpul împotriva gpE2 a VPPC.

Pentru fiecare an luat în studiu serurile testate au fost încadrate în funcția de vârstă animalelor în trei categorii : mistreți cu vârsta sub 1 an, mistreți cu vârsta între 1 și 2 ani, mistreți cu vârsta mai mare de 2 ani. Investigațiile serologice efectuate în perioada 2009-2012, au pus în evidență prezența de animale seropozitive cât și seronegative, ponderea rezultatelor pozitive fiind la mistreți cu vârsta mai mare de 2 ani.

Tabel 5.13

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți
în județul Suceava în anii 2007-2008

Table 5.13

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Suceava County during 2007-2008

TEST	Specificație	Total mistreți 2007	Total mistreți 2008	Vârsta Mistreți 2008		
				<1	1-2	>2
Serologic ELISA E2	Nr. de probe	241	295	10	48	237
	Probe pozitive	-	-	-	-	-
	Probe negative	241	295	10	48	237

Testarea serologică a fost realizată pe 241 probe recoltate de la mistreți . În urma testării toate probele au fost identificate ca fiind seronegative.

Pe parcursul anului 2008 în județul Suceava, în urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 295 de seruri provenite de la mistreți toate au fost identificate ca fiind seronegative.

Tabel 5.14

Dianosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți
în județul Suceava în anii 2009-2010

Table 5.14

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Suceava County during 2009-2010

TEST	Specificație	Total mistreți 2009	Vârsta Mistreți 2009			Total mistreți 2010	Vârsta Mistreți 2010		
			<1	1-2	>2		<1	1-2	>2
Elisa E2	Nr.de probe	324	10	107	207	330	32	95	203
	Probe pozitive	10	-	3	7	9	2	-	7
	Probe negative	314	10	104	200	321	30	95	196

Din cele 324 de seruri testate în 2009 provenite de la mistreți, au fost identificate ca fiind seronegative 314 reprezentând un procent de 96,91% și 10 au fost identificate ca fiind pozitive.

În anul 2010 din cele 330 de seruri testate provenite de la mistreți au fost identificate ca fiind seronegative 321, reprezentând un procent de 92,27% și 9 animale au fost identificate ca fiind pozitive (provin din efective vaccinate).

Tabel 5.15

Dianosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți
în județul Suceava în anii 2011-2012

Table 5.15

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Suceava County during 2011-2012

TEST	Specificație	Total mistreți 2011	Vârsta Mistreți 2011			Total mistreți 2012	Vârsta Mistreți 2012		
			<1	1-2	>2		<1	1-2	>2
Elisa E2	Nr.de probe	332	160	78	94	170	34	77	59
	Probe pozitive	28	9	1	18	5	-	-	5
	Probe negative	304	151	77	76	165	34	77	54

În urma testării prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 332 probe recoltate de la mistreți în anul 2011, 304 probe au fost identificate

ca fiind seronegative, reprezentând o seroprevalență de 91,56%, și 28 probe au fost seropozitive (provin din efective vaccinate).

Din cele 170 de seruri testate în anul 2012 provenite de la mistreți, au fost identificate ca fiind seronegative 165 reprezentând un procent de 97,05% și 5 animale au fost identificate ca fiind pozitive (provin din efective vaccinate).

Rezultatele diagnosticului pestei porcine clasice prin examen serologic la
mistreți în județul Iași în perioada 2007-2012

Investigațiile serologice privind infecția cu virusul pestei porcine clasice la mistreții de pe teritoriul județului Iași au constatat în testarea unui număr de 751 seruri prelevate în perioada 2007-2012. Probele prelevate au fost testate prin metoda imunoenzimatică utilizând un test ELISA comercial ce detectează anticorpii împotriva gpE2 a virusului pestei porcine clasice.

Pentru fiecare an luat în studiu serurile testate au fost încadrate în funcția de vârstă animalelor în trei categorii: mistreți cu vârstă sub 1 an, mistreți cu vârstă între 1 și 2 ani, mistreți cu vârstă mai mare de 2 ani. Investigațiile serologice efectuate în perioada 2007-2008 au pus în evidență absența animalelor seropozitive, însă în perioada 2009-2012 au fost detectați mistreți seropozitivi și seronegativi. Din analiza datelor obținute în perioada 2009-2012 se constată că ponderea animalelor seropozitive (vaccinate) este mult mai redusă decât a celor seronegative.

Tabel 5.16

Dianosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți

Table

în județul Iași în anii 2007-2008

5.16

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Iași County during 2007-2008

TEST	Specificație	Total mistreți 2007	Vârsta Mistreți 2007			Total mistreți 2008	Vârsta Mistreți 2008		
			<1	1-2	>2		<1	1-2	>2
Elisa E2	Nr. de probe	36	8	14	14	188	38	53	97
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	36	8	14	14	188	38	53	97

Din analiza datelor prezentate în tabelul nr. 5.16. toate serurile testate în anii 2007-2008 provenite de la mistreți din județul Iași au fost identificate ca fiind seronegative.

Tabel 5.17

Dianosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți
în județul Iași în anii 2009-2010

Table 5.17

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Iași County during 2009-2010

TEST	Specificație	Total mistreți 2009	Vârsta Mistreți 2009			Total mistreți 2010	Vârsta Mistreți 2010		
			<1	1-2	>2		<1	1-2	>2
Elisa E2	Nr. de probe	168	49	52	67	109	25	47	37
	Probe pozitive	16	6	-	10	13	4	5	4
	Probe negative	152	43	52	57	96	21	42	33

Din analiza datelor prezentate în tabelul nr. 5.17. se pot observa rezultatele serurilor testate provenite de la mistreții din județul Iași. Din cele 168 de seruri testate în anul 2009 au fost identificate ca fiind seronegative 152 reprezentând un procent de 90,47% și 16 au fost identificate ca fiind pozitive.

În anul 2010 din cele 109 de seruri testate provenite de la mistreți au fost identificate ca fiind seronegative 96 reprezentând un procent de 88,07% și 13 animale au fost identificate ca fiind pozitive (provin din efective vaccinate).

Tabel 5.18

Dianosticul pestei porcine clasice prin examen serologic la mistreți
în județul Iași în anii 2011-2012

Table 5.18

The serological diagnosis of classical swine fever on wild boars
in Iași County during 2011-2012

TEST	Specificație	Total mistreți 2011	Vârsta Mistreți 2011			Total mistreți 2012	Vârsta Mistreți 2012		
			<1	1-2	>2		<1	1-2	>2
Elisa E2	Nr. de probe	151	57	44	50	99	34	35	30
	Probe pozitive	23	7	3	13	11	3	4	4
	Probe negative	128	50	41	37	88	31	31	26

În urma testării prin examen serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 151 probe recoltate de la mistreți în anul 2011, 128 probe au fost identificate ca fiind seronegative, reprezentând o seroprevalență de 84,76%, și 23 probe au fost seropozitive (provin din efective vaccinate).

În urma efectuării examenului serologic folosind tehnica imunoenzimatică pe 99 probe recoltate de la mistreți în anul 2012, 11 probe au fost identificate ca seropozitive și 88 probe au fost identificate ca fiind negative, acestea din urmă provenind de la animale nevaccinate.

5.2.3. Concluzii parțiale

Ca urmare a faptului că în anul 2006 în România au fost tipizate 45 de tulpini de virusul pestei porcine clasice, iar în anul 2007 au fost tipizate alte 39 de tulpini (tulpinile identificate aparțin genotipului 2.3- *Rostock*) în zonele endemice s-a inițiat vaccinarea de urgență este un instrument important în eradicarea bolii.

Investigațiile serologice efectuate la mistreți în cele trei județe din estul României (Vaslui, Iași și Suceava) reprezintă o metodă sensibilă și specifică pentru a detecta indirect infecția cu virusul pestei porcine clasice.

Ca urmare a aplicării vaccinărilor contra pestei porcine la porcii domestici începând cu anul 2007 până în 2010 se constată o reducere a circulației virusului și lipsa focarelor din anul 2008 până în prezent.

În anul 2010 s-a continuat vaccinarea suinelor sălbatice contra pestei porcine clasice (mistreții fiind considerați sursă rezervor de infecție a porcilor domestici cu virusul PPC).

CAPITOLUL VI. CERCETĂRI PRIVIND DETECȚIA VIRUSULUI PESTEI PORCINE CLASICE

CHAPTER VI. RESEARCHES ON CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS DETECTION

6.1. Investigații privind detecția virusului pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suine domestice și mistreți

Deși eradicată din majoritatea statelor membre ale Uniunii Europene (UE), PPC a provocat probleme grave în diferite părți ale lumii, inclusiv țările sud-est europene. O caracteristică generală în această regiune este un procent scăzut de ferme comerciale de porcine. Un număr mare de suine sunt crescute în proprietăți familiale sau microferme pentru autoconsum sau comerțul local. Deoarece aceste exploatații sunt foarte dificil de înregistrat, sunt mai dificil de controlat. În plus, biosecuritatea în aceste sisteme de creștere a suinelor este adesea redusă, iar proprietarii nu dispun de educație în ceea ce privește prevenirea și controlul bolilor la animale. Pentru a studia epidemiologia virusului PPC în populațiile de suine domestice și sălbatice în zona de est a României s-au întreprins investigații virusologice utilizând reacția de imunofluorescență directă ce vizează identificarea antigenelor virusului PPC în preparate din țesuturi (măduva sternală). Celulele infectate cu virusul pestei porcine clasice sunt puse în evidență prin examen microscopic cu spectru U.V.

6.1.1 Material și metode

Au fost recoltate probe de țesuturi (stern) de la porcii domestici și mistreți din județele Vaslui, Suceava și Iași în perioada 2007-2012. Din exploatațiile nonprofesionale au fost recoltate un număr de 470 probe din județul Vaslui, 150 probe din județul Suceava și 1891 probe din județul Iași. Din exploatațiile profesionale au fost recoltate un număr de 148 probe din județul Vaslui, 1215 probe din județul Suceava și 3318 probe din județul Iași. De la mistreți au fost

recoltate un număr de 721 probe din județul Vaslui, 1784 probe din județul Suceava și 1316 probe din județul Iași.

Probele pentru detecția virusului pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă nu se congelează, deoarece prin congelare și decongelare celulele care conțin antigenelor virale se sparg.

• **Protocolul de lucru privind identificarea antigenelor VPPC din măduva sternală folosind kiturile Gamarom și Ceditest.** Prezența virusului în țesuturi este pusă în evidență prin examen microscopic cu spectru U.V. în citoplasma celulelor infectate.

• **Trusa de detecție are următoarea componență:**

- conjugat fluorescent format din IgG obținut dintr-un antiser pentru virus pestos porcine cu un fluorocrom (cel mai utilizat fiind FITC)
- martori pozitivi - frotiuri ce conțin celule infectate
- martori negativi- frotiuri ce nu conțin celule infectate preparate din probe cert negative
- soluție de Albastru Evans ,
- glicerină neutră.
- diluant (colorant Evans-Blau + PBS la trusa Gamarom)
- TFS (tampon fosfat salin)

• **Modul de lucru**

- s-a verificat identitatea probelor și s-a notat numerele de identificare pe lamele de sticlă care au fost degresate cu un amestec de alcool și apă distilată în părți egale
- s-a secționat cu satîrul a doua sau a treia sternebra în plan transversal;
- s-a îndepărtat cu bisturiul musculatura intercostală învecinată cu porțiunea de sternebra secționată
- s-a presat cu cleștele patent sternebra secționată, până s-a exprimat măduva roșie, de culoare roșu-cenușie și cu o consistență păstoasă
- prin presarea sternului, s-a recoltat măduva sternală exprimată cu vârful unei lame obișnuite de sticlă și s-au tras câteva frotiuri (2-4) în sens longitudinal și în unghi de 45° pe toată lungimea lamelor, frotiurile bine făcute având aspectul unor dungii fine paralele
- s-au uscat frotiurile astfel realizate 20-30 de minute la temperatura camerei;
- frotiurile uscate s-au introdus pentru 20 de minute în pahare Berzelius ce conțin acetonă la temperatura camerei.
- s-a efectuat cu creionul de scris pe sticlă marcaje cu un diametru de aproximativ 1,5 cm atât pe frotiuri din probe cât și pe frotiul martor pozitiv și martor negativ, ce au fost păstrate la congelator.

- lamele marcate, au fost introduse în cuva unei băi umede;
- conjugatele în diluții se alicotează în tuburi și se păstrează în congelator fără pierderi importante de titru timp de mai mulți ani. S-a decongelat unul sau mai multe tuburi ce conțin cantități mici de conjugat .
- s-a diluat conjugatul în soluția TFS de lucru (sau cu diluantul în care este inclus și Evans Blau în concentrația corespunzătoare în cazul setului Gamarom).
- S-au repartizat câte 100-150 microlitri de conjugat diluat pe marcajul fiecărui frotiu, inclusiv pe frotiurile martor. S-a acoperit baia umedă și s-a incubat la 37°C timp de 30-40 de minute
- Ulterior frotiurile au fost scuturate și au fost introduse într-o baie de spălare ce conține soluție TFS de lucru, pe un agitator magnetic, timp de 30 de minute;
- frotiurile au fost scoase din baia de spălare și depuse cu fața în sus, pe hârtie de filtru;
- s-au montat lamele degresate pe fiecare marcaj, după ce s-a depus pe acesta o picătură de glicerină tamponată. S-au apăsât lamelele și apoi s-au scuturat pe cant, pentru a îndepărta excesul de glicerină și eventuale bule de aer ;
- examinarea s-a făcut inițial cu un obiectiv x20 pentru a încadra zonele de interes din porțiunea de frotiu colorată, apoi cu obiective x40 sau x50;
- pentru validarea testului s-a început cu examinarea frotiurilor martor pozitiv și negativ

Interpretarea rezultatelor

- la probelor pozitive, se observă celule mari cu nucleu rotund ce reprezintă aproximativ 80% din suprafața celulei, celule blastice într-un număr foarte mare, care prezintă în citoplasmă fluorescență în nuanța specifică fluorocromului (în cazul FITC verde gălbui sau verde crud), intensitatea culorii diferă, în funcție de cantitatea de antigen viral existentă în fiecare celulă infectată. Pe lângă celulele infectate, sunt prezente și celule fără fluorescență, asemănătoare celor de pe frotiuri martor negativ
- În cazul probelor negative, nu sunt evidențiate celule de tip blastic, aspectul fiind la fel cu frotiul martor negativ
- Când apar aspecte de fluorescență nespecifică, trebuie să se facă compararea cu cei doi martori
- În cazul unor situații dubioase, se repetă recolorarea frotiurilor din aceeași probă cu conjugat mai concentrat sau mai diluat, cu alți martori pozitivi și negativi.

- Eventuale aspecte de fals pozitivitate, ce nu depășesc 2% din cazuri, se pot întâlni la animale ce au evoluții de boală subclinică sau abortată. Aceste aspecte au fost confirmate ulterior prin utilizarea metodelor de biologie moleculară rt-PCR .

6.1.2. Rezultate și discuții

În cadrul investigațiilor virusologice au fost prelevate țesuturi (stern) de la animalele sacrificate sau moarte cu scopul evidențierii virusului pestei porcine clasice folosind reacția de imunofluorescență directă. Studiul virusologic s-a desfășurat în perioada 2007-2012 pe probe recoltate de la suine domestice și mistreți de pe teritoriul a trei județe din estul României (Vaslui, Suceava și Iași).

Rezultatele diagnosticului pestei porcine clasice utilizând reacția de imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Vaslui în perioada 2007-2012

Investigațiile virusologice utilizând tehnica de imunofluorescență directă efectuate pe probe de țesuturi recoltate de la suinele domestice și sălbatice de pe teritoriul județului Vaslui s-au desfășurat în perioada 2007-2012. Acest studiu a constatat în testarea a 608 probe recoltate de la suine domestice provenite din exploatații profesionale și non-profesionale, precum și a 715 probe recoltate de la mistreți. Pe parcursul investigațiilor au fost identificate doar 5 probe pozitive în anul 2007, toate provenind de la suine domestice crescute în sistem gospodăresc.

Tabel 6.1

Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Vaslui în anii 2007-2008

Table 6.1

The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and feral pigs from Vaslui County during 2007-2008

TEST	Specificație	2007		2008		
		Porci din exploatații non-profesionale	Mistreți	Mistreți (categ.de vârstă)		
IFD	Nr.de probe	47	107	<1	1-2	>2
	Probe pozitive	5	-	-	-	-
	Probe negative	42	107	34	32	56
	Probe dubioase	2	-	-	-	-

Din analiza datelor prezentate în tabelul 6.1., în urma realizării examenului virusologic folosind reacția de imunofluorescență directă pe probe recoltate în anul 2007 din exploatații non-profesionale provenite de la 47 animale au fost identificate 5 suine infectate, reprezentând un procent de 10,63%. În urma testării prin examen virusologic a 107 mistreți, toți au fost identificați ca indemni de boală.

În anul 2008 în urma realizării examenului virusologic folosind reacția de imunofluorescență directă pe probe recoltate de la mistreți provenite de la 122 animale nu au fost identificate porcine infectate.

Tabel 6.2

Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Vaslui în perioada 2009-2010

Table 6.2

The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Vaslui County during 2009-2010

Anul	Specificație	Porci din exploatații profesionale	Porci din exploatații non-profesionale (GP)	Mistreți (categ. de vârstă)		
				<1	1-2	>2
2009	Nr.de probe	-	35	40	35	46
	Probe pozitive	-	-	-	-	-
	Probe negative	-	35	40	35	46
2010	Nr.de probe	16	171	49	38	34
	Probe pozitive	-	-	-	-	-
	Probe negative	16	171	49	38	34

În anul 2009 au fost testate prin imunofluorescență directă 35 probe recoltate de la suine domestice din exploatații non-profesionale și 121 mistreți. Toate animalele testate prin examen virusologic-metoda de imunofluorescență directă au fost identificate ca fiind negative pentru VPPC.

În urma testării prin examen virusologic a 171 probe recoltate de la porcii domestici din exploatațiile non-profesionale folosind reacția de imunofluorescență directă acestea au fost identificate ca fiind negative pentru VPPC.

Testarea prin examen virusologic a 16 probe recoltate din exploatațiile profesionale și 121 probe recoltate de la mistreți au arătat că animalele nu sunt infectate cu virusul pestei porcine clasice

Tabel 6.3

Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Vaslui în perioada 2011-2012

Table 6.3

The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Vaslui County during 2011 -2012

Anul	Specificație	Exploatații profesionale	Exploatații non-profesionale (GP)	Total mistreți	Mistreți		
					<1	1-2	>2
2011	Nr.de probe	132	112	125	36	40	49
	Probe pozitive	-	-		-	-	-
	Probe negative	132	112	125	36	40	49
2012	Nr.de probe	-	105	125	35	39	51
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	-	105	125	35	39	51

Din analiza datelor prezentate în tabelul 6.3., în anul 2011 în urma realizării examenului virusologic folosind reacția de imunofluorescență directă pe probe recoltate de la 125 mistreți nu au fost identificate rezultate pozitive. În urma testării prin examen virusologic a 112 probe recoltate din exploatații non-profesionale folosind reacția de imunofluorescență directă toate au fost identificate negative.

Pe parcursul anului 2012 în urma realizării examenului virusologic folosind reacția de imunofluorescență directă pe probe recoltate de la mistreți provenite de la 125 animale nu au fost identificate animale infectate. În urma testării prin examen virusologic a 105 probe recoltate din exploatații non-profesionale folosind reacția de imunofluorescență directă toate au fost identificate ca fiind negative pentru VPPC.

Rezultatele diagnosticului pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Suceava în perioada 2007-2012

În cadrul investigațiilor virusologice utilizând tehnica de imunofluorescență directă în județul Suceava au fost recoltate probe de la suinele domestice din

exploatații profesionale și non-profesionale precum și de la suinele sălbatice. În perioada luată în studiu, 2007-2012, au fost testate un număr de 1215 probe de țesut provenite de la suine domestice din exploatații profesionale, 150 probe provenite de la suine domestice din sistem gospodăresc și 1784 probe recoltate de la mistreți.

Tabel 6.4

Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Suceava în perioada 2007-2009

Table 6.4

The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Suceava County during 2007-2009

Anul	Specificație	Porci din exploatații profesionale	Porci din exploatații non-profesionale	Total Mistreți	Mistreți (categ. de vârstă)		
					<1	1-2	>2
2007	Nr.de probe	-	13	236	8	66	162
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	-	13	236	8	66	162
2008	Nr.de probe	3	1	279	10	47	222
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	3	1	279	10	47	222
2009	Nr.de probe	52	4	334	10	106	218
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	52	4	334	10	106	218

În urma realizării examenului virusologic folosind reacția de imunofluorescență directă în perioada 2007-2009 nu au fost identificate suine domestice sau mistreți pozitivi pentru VPPC.

Deasemenea în perioada 2010-2012 în urma realizării examenului virusologic folosind reacția de imunofluorescență directă, nu au fost identificate suine domestice sau mistreți infectați cu virusul pestei porcine clasice.

Tabel 6.5

Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Suceava în perioada 2010-2012

Table 6.5

The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Suceava County during 2010-2012

Anul	Specificație	Porci din exploatații profesionale	Porci din exploatații non-profesionale	Total Mistreți	Mistreți (categ. de vârstă)		
					<1	1-2	>2
2010	Nr.de probe	898	18	317	30	92	195
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	898	18	317	30	92	195
2011	Nr.de probe	250	58	339	185	75	79
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	250	58	339	185	75	79
2012	Nr.de probe	12	56	279	79	134	66
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	12	56	279	79	134	66

Majoritatea cazurilor de pestă porcină clasică apărute până în anul 2007 au fost diagnosticate în exploatațiile mici din gospodăriile populației din sudul României sau la porcii domestici crescuți temporar liber din județul Brăila. În luna august 2007, boala a evoluat în trei exploatații comerciale mari din partea de vest a României afectând mai mult de 50.000 porcine domestice.

Din luna octombrie 2007 până în prezent nu a fost mai fost diagnosticată prezența virusului pestei porcine clasice nici la porcinele domestice, nici la mistreți. Până în anul 2010, mistreții au fost vaccinați oral, prin utilizarea momelilor vaccinale (ou de găină în care se inocula vaccin viu atenuat cu tulpina de virus C). Pentru fiecare mistreț s-a distribuit o momeală vaccinală, vaccinarea profilactică efectuându-se doar când pământul era acoperit de zăpadă. În acea perioadă, nu au existat programe de monitorizare serologică a mistreților vaccinați neexistând date disponibile pentru a demonstra eficiența vaccinării orale.

Rezultate privind diagnosticul pestei porcine clasice prin
imunofluorescență directă suinele domestice și sălbatice în județul
Iași în perioada 2007-2012

Investigațiile virusologice utilizând metoda de imunofluorescență directă au constatat în testarea unui număr de 3318 probe provenite de la suine din exploatații profesionale, 861 probe provenite de la porci crescuți în sistem gospodăresc și 1316 probe provenite de la mistreți, perioada de studiu fiind 2007-2012.

Tabel 6.6

Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele
domestice și sălbatice în județul Iași în perioada 2007-2009

Table 6.6

The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Iași
County during 2007-2009

Anul	Specificație	Porci din exploatații profesionale	Porci din exploatații non- profesionale	Total Mistreți	Mistreți (categ. de vârstă)		
					<1	1-2	>2
2007	Nr.de probe	38	158	188	54	78	56
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	38	158	188	54	78	56
2008	Nr.de probe	9	76	225	41	64	120
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	9	76	225	41	64	120
2009	Nr.de probe	52	4	251	53	92	106
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	52	4	251	10	106	218

În urma realizării examenului virusologic folosind reacția de imunofluorescență directă pe probe recoltate în perioada 2007-2009 de la suine domestice din exploatații profesionale și non-profesionale și de la mistreți nu au fost identificate animale infectate cu virusul pestei porcine clasice.

Tabel 6.7

Diagnosticul pestei porcine clasice prin imunofluorescență directă la suinele domestice și sălbatice în județul Iași în perioada 2010-2012

Table 6.7

The diagnosis of classical swine fever by FAT in domestic and ferral pigs from Iași County during 2010-2012

Anul	Specificație	Porci din exploatații profesionale	Porci din exploatații non-profesionale	Total Mistreți	Mistreți (categ. de vârstă)		
					<1	1-2	>2
2010	Nr.de probe	1533	43	249	53	69	127
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	1533	43	249	53	69	127
2011	Nr.de probe	1619	510	220	68	59	93
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	1619	510	220	68	59	93
2012	Nr.de probe	67	100	183	56	86	41
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	67	100	183	56	86	41

În perioada 2010-2012 probele recoltate de la suinele domestice și sălbatice și testate prin reacția de imunofluorescență directă în vederea detecției antigenelor virale ale virusului pestei porcine clasice au evidențiat absența animalelor infectate sau purtătoare de VPPC. Aceste rezultate se explică prin faptul că în lunile noiembrie și decembrie din anul 2008 a fost efectuată vaccinarea de urgență în 22 de județe. În anul 2009 vaccinarea a fost realizată în două campanii pe teritoriul a 33 de județe. În anul 2010 și 2011 vaccinarea a fost efectuată în 8 județe ale României într-o zonă tampon la granița de nord - est cu Ucraina și Republica Moldova.

6.1.3. Concluzii parțiale

În urma testării prin examen virusologic a probelor recoltate din exploatații non-profesionale, exploatații profesionale și de la mistreți din județele Vaslui, Suceava și Iași în perioada anilor 2007-2012 folosind reacția de

imunofluorescență directă în vederea detecției antigenelor virusului pestei porcine clasice, toate probele din județele Iași și Suceava au fost încadrate ca negative.

În cadrul investigațiilor efectuate în anul 2007 pe probe provenite de la suine de pe teritoriul județului Vaslui au fost identificate 5 probe pozitive și 2 dubioase recoltate de la porci din exploatații non-profesionale.

6.2. Investigații privind detecția virusului pestei porcine clasice prin tehnici de biologie moleculară la suinele domestice și mistreți

6.2.1 Material și metode

Pentru efectuarea testelor PCR au fost prelevate următoarele probe : probe de sânge pe anticoagulant (EDTA) și probe de organe: splină, rinichi, tonsile, limfonoduri limfatice, precum cele retrofaringiene, parotidiene, mandibulare sau mezenterice.

Probele de sânge au fost prelevate în eprubete cu EDTA de tip vacutainer omogenizându-se foarte bine sângele cu EDTA, pentru a preveni coagularea totală sau parțială.

Probele de organe prelevate au fost ambalate în tuburi Falcon, Eppendorf etanșe, câte un tub separat pentru fiecare organ, s-au etichetat pentru identificarea organului, animalului și proprietarului (se atribuie un număr pentru fiecare animal).

Tehnicile PCR folosite pentru diagnosticul pestei porcine clasice au fost: tehnica One Step RT-PCR clasic și tehnica One Step RT-PCR Real Time.

În comparație cu testul RT-PCR clasic, în Real-Time RT-PCR (RRT-PCR) se folosesc și sonde marcate, a căror fluorescență emisă în timpul reacției se vizualizează on-line pe monitorul sistemului de amplificare.

Protocolul de lucru pentru identificarea genomului specific virusului pestei porcine clasice utilizând tehnici de biologie moleculară

Materialele folosite au fost:

- Kit pentru extracție acizi nucleici – „RNeasy Mini kit” (Qiagen)
- Kit amplificare acizi nucleici One StepRT-PCR (Qiagen);
- Tampon 10 x PBS (se diluează 1x PBS soluție de lucru cu apă Milli-Q);
- RNasin 40 U/μl ;
- standardele pozitive de lucru ;
- primeri specifici pentru VPPC :
 - Primer sens „a” (50μM) zona 5' NTR a genomului viral

-5' - CAG CTT CAR YGT TGA TTG T - 3' ;

- Primer antisens „b” (50μM) zona 5' NTR a genomului viral

-5' – CTA GCC ATG CCC WYA GTA GG - 3' ;

- Primer sens „HOFF 1” (10μM) zona 5' NTR a genomului viral.

-3' – ATGCCCCATAGTAGGACTAGCA-5'

- Prime- antisens „HOFF 3” (10μM) zona 5' NTR a genomului viral

-3' – TCAACTCCATGTGCCATGTAC-5'

- Sonda HOFF (10μM) zona 5' NTR a genomului viral, 3' – FAM-TGGCGAGCTCCCTGGGTGGTCTAAGT-TAMRA-5'

-agaroză;

-tampon TAE/TBE

-Tampon de încărcare (bromphenol blue)

-colorant de geluri - Bromura de etidiu 10 mg/ml

-marker de masa moleculara de 100 pb

Extractia ARN-ului din probe biologice utilizând „RNeasy Mini kit”

S-au parcurs următoarele etape:

Reagentul	μl/probă
Proba biologica	200 μl
RLT de lucru	350 μl
Centrifugare 3 min la ≥13000 rpm	
Pipetare supernatant în tub Eppendorf de 1,5 ml	
Etanol 70% (1ml apa +3 ml etanol absolut)	350 μl
Mixare prin pipetare (NU SE CENTRIFUGHEAZĂ)	
Transfer în minicoloană	
Centrifugare 15 sec la ≥13000 rpm	
Îndepărtare eluat	
Tampon RW 1	700 μl
Centrifugare 15 sec la ≥13000 rpm	
Îndepărtare eluat	
Tampon RPE de lucru (11 ml RPE conc. + 44 ml etanol)	500 μl
Centrifugare 15 sec la ≥13000 rpm	
Îndepărtare eluat	
Tampon RPE de lucru	500 μl
Centrifugare 3 min la ≥13000 rpm	
Inserarea filtrului într-un tub Ependorff de 1,5 ml	
RNase-free water	50 μl
Centrifugare 1 min la ≥13000 rpm	

Odată cu probele de testat s-au introdus în lucru (în extracție), un martor pozitiv de extracție (tulpină vaccinală PPC) și un martor negativ de extracție (apa). Martorii de extracție (pozitiv și negativ) au fost supuse extracției în aceleași condiții ca și probele de lucru;

După terminarea lucrului, hota s-a decontaminat cu virkon 1%, apoi cu etanol absolut și se lasă lampa UV să funcționeze minim 15 minute. Tot cu etanol absolut se decontaminează pipetele .

ARN-urile extrase sunt păstrate în frigiderul din camera de extracție dacă se lucrează în aceeași zi sau pot fi stocate pentru o perioadă mai lungă de timp la congelator.

Testul „RT-PCR”clasic

Testul „RT-PCR” clasic a fost realizat în mai multe etape și în condiții de lucru specifice.

Prepararea Master – mixului

- s-a utilizat kitul „OneStep RT-PCR” (Qiagen), primerii specifici (Tib MolBiol) și RNasin 40 U/μl;
- primerii s-au reconstituit conform fișei tehnice, s-au alicotează în tuburi de 0,2 ml pentru a fi păstrați la congelator un timp mai lung.
- toți reagenții au fost scoși din congelator și depozitați pe gheață până la utilizare . Mix enzime One Step RT-PCR a fost scos din congelator în momentul utilizării centrifugat tip spin la ≥ 7000 rot/min, înainte de utilizare;
- toți reagenții au fost vortexați (cu excepția Mix enzime), apoi centrifugați tip spin.
- s-au amestecat pe gheață următoarele componente, în ordinea următoare:

Reagenți	μl/proba
Apa (RNase free) (Qiagen)	14,8
Tampon OneStep RT-PCR 5x (Qiagen)	5,1
dNTP 10 mM (Qiagen)	1,1
Primer CSFV a 50 pmol/μl	0,4
Primer CSFV b 50 pmol/μl	0,4
RNasin 40 U/μl	0,1
Mix enzime OneStep RT-PCR (Qiagen)	1,1
TOTAL	23

- master-mixul obținut s-a omogenizat prin pipetare.

Cuplarea ARN-ului extras cu mixul

- S-au pipetat în tuburi de 0,2ml, 23μl amestec de reacție și 3μl ARN extras omogenizându-se bine cu pipeta. Pipetare s-a făcut pe gheață;
- În etapa de cuplare s-a introdus un martor pozitiv de control al mixului (o probă de ARN cert pozitiv, extras anterior dintr-un standard de extracție pozitiv) și un martor negativ de control al mixului (apă)
- Realizarea amplificării în thermocycler
- Tubulețele cu amestecul de reacție s-au introdus apoi în ICycler (BioRad) și s-a derulat programul de amplificare.
- S-au setat parametrii de amplificare la următoarele valori:
 - 50°C - 30' 1x; 95°C - 15' 1x;
 - 94°C - 1', 54°C - 1', 72°C - 1' 45x ;
 - 72°C - 7' 1x; 4°C - ∞

Electroforeza în gel de agaroză

a) Prepararea gelului de agaroză (1.5% agaroză în TBE)

Intr-un pahar Erlenmayer s-au cântăresc pentru un gel mare 1.35 g agaroză în 90 ml TBE 1 X.

- s-a introdus paharul în cuptorul cu microunde pentru dizolvarea agarozei, la fierbere, timp de 2 min.;
- S-a răcit soluția astfel obținută sub jet de apă rece, până la aprox. 50-60°C și s-a adăugat EtBr 10mg/ml - 7.5 μl, turnându-se imediat în tăvița de electroforeză, inserată în suportul „casting gel” în care este fixat pieptenul sau pieptenii în funcție de numărul de probe analizate.
- s-au eliminat eventualele bule de aer cu ajutorul unui tips;
- s-a lasat gelul să polimerizeze (răcirea gelului și întărirea sa - aprox. 20 min.);
- după polimerizarea totală a gelului s-a scos tăvița din suportul „casting gel”, s-a îndepărtat pieptenul fixat și s-a fixat tăvița în cuva de electroforeză ce conține TBE 1X.
- urmează încărcarea probelor. Pe o folie de parafilm s-au pus câte 3 μl tampon de încărcare peste care s-au adăugat câte 10 μl de probă și s-au omogenizat;
- s-au încărcat 10 μl din amestecul omogenizat în godeurile gelului de agaroză din cuva de electroforeză. În primul godeu s-a încărcat markerul molecular de 100 bp.
- la sfârșitul încărcării gelului, în tancul de electroforeză se adaugă EtBr 10mg/ml - 12 μl în tamponul de migrare, în zona anodului (migrarea bromurii de etidiu se face de la + la -)

- s-a fixat capacul aparatului de electroforeza astfel încât firul negru (catodul) să fie la „-”, iar firul roșu (anodul) să fie la „+”; (migrarea acizilor nucleici se face de la „-” la „+”);
- s-au fixat parametrii sursei la 100 V, 1,5A, timp de 30 min.

După terminarea electroforezei gelul s-a analizat în sistemul de videodocumentare (GelDoc). Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului virusului PPC au o dimensiune așteptată de 420 pb.

Pentru testul RT-PCR convențional, rezultatele de „pozitiv” sau „negativ” s-a stabilit în urma analizei benzilor specifice obținute prin electroforeză. Testul s-a considerat validat dacă martorii pozitivi de extracție și pentru mix s-au obținut pozitivi, iar martorii negativi de extracție și pentru mix s-au obținut negativi.

Testul „Real Time RT - PCR

Prepararea Master – mixului

- s-a utilizat kitul „OneStep RT-PCR” (Qiagen), primerii și sonda specifici (Tib MolBiol) și RNasin 40 U/μl;
- toți reagenții au fost scoși din congelator și depozitați pe gheață până la utilizare. Mix enzime One Step RT-PCR a fost scos din congelator în momentul utilizării centrifugat tip spin la ≥ 7000 rot/min, înainte de utilizare;
- toți reagenții au fost vortexați (cu excepția Mix enzime), apoi centrifugați tip spin.
- reagenții astfel pregătiți au fost utilizați pentru prepararea pe gheață a Master-mixului conform protocolului de lucru:

Reagenți	μl/proba
Apa (RNase free) (Qiagen)	6,3
Tampon OneStep RT-PCR 5x (Qiagen)	3,9
dNTP 10 mM (Qiagen)	0,8
Primer HOFF 1 (10 μM)	0,8
Primer HOFF 3 (10 μM)	0,8
Sonda HOFF (10 μM)	0,6
MgCl ₂ (25 Mm)	1
RNasin 40 U/μl	0,1
Mix enzime OneStep RT-PCR (Qiagen)	0,7
TOTAL	15

Master-mixul obținut se omogenizează prin pipetare.

Cuplarea Master-mixului cu ARN viral

Cuplarea master-mixului, în cantitate de 15 µl cu proba de ARN extras în cantitate de 5 µl, s-a făcut pe gheață în incinta de lucru PCR în capilare de sticlă specifice aparatului Light Cycler 2.0.(Roche). Amestecul obținut s-a omogenizat prin pipetare.

Realizarea amplificării în Light Cycler 2.0.(Roche).

S-au setat parametrii de amplificare la următoarele valori:

Programul	Număr cicluri	Temperatură	Durată	Mod de achiziție
Reacția RT	1	50°C	30 minunte	none
Denaturare	1	95 °C	15 minunte	none
Amplificare	50	95 °C	15 secunde	none
		57 °C	30 secunde	single
		72 °C	30 secunde	none
			30 secunde	
Răcire	1	40 °C	30 secunde	none

Pentru testul Real Time RT-PCR, rezultatele de „pozitiv” sau „negativ” s-au stabilit în urma analizei curbelor de amplificare. Testul a fost validat prin utilizarea de martori pozitivi și negativi pentru toate etapele protocolului: extracție și amplificare.

6.2.2. Rezultate și discuții

Diagnosticul peștei porcine clasice prin examen RT-PCR a fost efectuat pe probe recoltate de la suine domestice și mistreți de pe teritoriul județului Iași în perioada 2010-2012

În vederea efectuării testul RT-PCR pentru detecția genomului virusului peștei porcine clasice au fost recoltate probe de sânge pe EDTA (de la animalele bolnave cu semne clinice ce puteau fi atribuite peștei porcine clasice) și seturi de organe de la animalele sacrificate sau moarte.

Tabel 6.8

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT- PCR la suinele domestice și mistreți în județul Iași în anul 2010

Table 6.8

The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR in domestic swine and wild boars from Iasi County in 2010

TEST	Specificație	Firme comerciale	Expl. necom. (GP)	Total mistreți	Mistreți		
					<1	1-2	>2
RT-PCR pe probe de sange	Nr. de probe	79	1	-	-	-	-
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	79	1	-	-	-	-
RT-PCR pe probe de organe	Nr. de probe	27	6	13	12	-	1
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	27	6	13	12	-	1

Testarea prin examen RT-PCR a 106 probe recoltate din fermele comerciale și 7 probe provenite din exploatațiile necomerciale precum și a 13 probe organe provenite de la mistreți au arătat că animalele nu sunt infectate sau nu sunt purtătoare de virusul pestei porcine clasice.

Tabel 6.9

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR la suinele domestice și mistreți în județul Iași în anul 2011

Table 6.9

The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR in domestic swine and wild boars from Iasi County in 2011

TEST	Specificație	Firme comerciale	Expl. necom. (GP)	Total mistreți	Mistreți		
					<1	1-2	>2
RT-PCR pe probe de sange	Nr. de probe	2	87	-	-	-	-
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	2	87	-	-	-	-
RT-PCR pe probe de organe	Nr. de probe	10	5	101	61	32	8
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	10	5	101	61	32	8

Din analiza datelor prezentate în tabelul 6.9. se poate observa rezultatul testării prin examen RT-PCR a 101 probe organe provenite de la mistreți, 12 probe recoltate de la porcii domestici din exploatațiile comerciale și 92 probe recoltate de la porcii domestici din exploatațiile necomerciale. În nici una din probele testate nu a fost detectat ARN-ul virusului pestei porcine clasice.

Tabel 6.10

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR la suinele domestice și mistreți în județul Iași în anul 2012

Table 6.10

The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR in domestic swine and wild boars from Iasi County in 2012

TEST	Specificație	Firme comerciale	Expl. necom. (GP)	Total mistreți	Mistreți		
					<1	1-2	>2
RT-PCR pe probe de sange	Nr. de probe	-	340	-	-	-	-
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	-	340	-	-	-	-
RT-PCR pe probe de organe	Nr. de probe	76	85	144	52	56	36
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	76	85	144	52	56	36

În urma testării printr-un examen RT-PCR care să detecteze genomul virusului pestei porcine clasice s-au analizat 144 probe organe de la mistreți, 76 probe organe recoltate de la porcii domestici din exploatațiile comerciale, 85 probe organe recoltate de la porcii domestici din exploatațiile necomerciale și 340 probe sânge pe EDTA de la porcii domestici din exploatațiile necomerciale, toate fiind încadrate ca negative.

Diagnosticul pestei porcine clasice prin RT-PCR în județul Vaslui în perioada 2010-2012

În cadrul investigațiilor virusologice utilizând tehnicile de biologie moleculară (RT-PCR) în vederea detecției specifice a genomului virusului pestei porcine clasice în perioada 2010-2012 au fost recoltate și testate un număr total de 187 probe de organe de mistreți, 177 probe de la porci crescuți în sistem gospodăresc și 2 probe de la porci din ferme comerciale.

Probele patologice utilizate în diagnosticul PPC au fost reprezentate de probe de organe pentru investigațiile efectuate în perioada 2010-2012 și probe de sânge pe EDTA recoltate de la porci domestici în anul 2012.

Tabel 6.11

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR pe probe de organe la suinele domestice și mistreți în județul Vaslui în perioada 2010 – 2012

Table 6.11

The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR on organ samples from domestic pigs and wild boars in Vaslui County during 2010 -2012

Anul	Specificație	Firme comerciale	Expl. necom. (GP)	Total mistreți	Mistreți (categ. de vârstă)		
					<1	1-2	>2
2010	Nr. de probe	-	-	60	58	1	1
	Probe pozitive	-	-		-	-	-
	Probe negative	-	-	60	58	1	1
2011	Nr. de probe	-	-	32	-	-	-
	Probe pozitive	-	-		-	-	-
	Probe negative	-	-	32	32	-	-
2012	Nr. de probe	-	90	95	6	38	51
	Probe pozitive	-	-		-	-	-
	Probe negative	-	90	95	6	38	51

În cadrul investigațiilor virusologie prin examen RT-PCR în vederea detecției genomul virusului pestei porcine clasice pe probe de organe au fost testați 187 mistreți și 90 de porci proveniți din sistem gospodăresc, toate probele fiind încadrate ca negative pentru VPPC.

Tabel 6.12

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR pe probe de sânge de la suinele domestice din județul Vaslui în anul 2012

Table 6.12.

The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR on blood samples from domestic pigs from Vaslui County in 2012

TEST	Specificație	Firme comerciale	Expl. necom. (GP)
RT-PCR pe probe de sânge	Nr. de probe	2	87
	Probe pozitive	-	-
	Probe negative	2	87

Testarea prin examen RT-PCR a 87 probe de sânge pe EDTA recoltate din exploatațiile necomerciale și 2 probe provenite din fermele comerciale au evidențiat că animalele nu sunt infectate.

Diagnosticul pestei porcine clasice prin RT-PCR la suinele domestice și mistreți în județul Suceava în perioada 2010-2012

În cadrul investigațiilor virusologice utilizând tehnicile de biologie moleculară (RT-PCR) în vederea detecției specifice a genomului virusului pestei porcine clasice în perioada 2010-2012 în județul Suceava au fost recoltate și testate un număr total de 670 probe de organe (520 probe mistreți, 99 probe de la porci crescuți în sistem gospodăresc și 51 probe de la porci din ferme comerciale).

Probele patologice utilizate în diagnosticul PPC au fost reprezentate și de probe de sânge pe EDTA recoltate de la 89 porci domestici crescuți în exploatații non-profesionale în anul 2012.

Tabel 6.13

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR pe probe de organe la suinele domestice și mistreți în județul Suceava în perioada 2010 – 2012

Table 6.13

The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR on organ samples from domestic pigs and wild boars in Suceava County during 2010 -2012

Anul	Specificație	Ferme comerciale	Expl. necom. (GP)	Total mistreți	Mistreți		
					<1	1-2	>2
2010	Nr. de probe	32	6	33	33	-	-
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	32	6	33	33	-	-
2011	Nr. de probe	2	22	186	145	25	16
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	2	22	186	145	25	16
2012	Nr. de probe	17	71	301	99	113	89
	Probe pozitive	-	-	-	-	-	-
	Probe negative	17	71	301	99	113	89

Investigațiile de biologie moleculară efectuate în județul Suceava, în perioada 2010-2012, pe probe de organe recoltate de la suine domestice și sălbatice au evidențiat abstența detecției genomului virusului pestei porcine

clasice, toate animalele testate fiind încadrate ca neinfectate sau nepurtătoare ale VPPC.

Tabel 6.14

Diagnosticul pestei porcine clasice prin examen RT-PCR pe probe de sânge de la suinele domestice din județul Suceava în anul 2012

Table 6.14

The diagnosis of classical swine fever by RT-PCR on blood samples from domestic pigs from Suceava County in 2012

TEST	Specificație	Ferme comerciale	Exploatații necomerciale (GP)
RT-PCR pe probe de sânge	Nr.total de probe	-	89
	Probe pozitive	-	-
	Probe negative	-	89

Testarea prin examen RT-PCR a 89 probe de sânge pe EDTA recoltate din exploatații necomerciale au arătat că animalele nu sunt infectate.

Obținerea acestor rezultate se explică prin faptul că în 2007, 2008 și 2009 vaccinarea împotriva PPC s-a efectuat pe teritoriul României, la toate categoriile de porcine domestice din exploatațiile non-profesionale, cu vaccin viu atenuat. Porcinele din exploatațiile comerciale industriale au fost vaccinate cu vaccin marker până în 15 aprilie 2008. Din 2010 a fost sistată vaccinarea porcilor domestici atât din exploatațiile non-profesionale, cât și din exploatațiile comerciale industriale dar s-a continuat cu vaccinarea mistreților.

Controlul transmiterii infecției cu virusul PPC de animal la animal este un concept cheie în epidemiologia bolii. Pentru a reduce presiunea virală este necesar controlul mișcării și transportului suinelor sub rezerva legislației (Fevre și colab., 2006). Vaccinare profilactică a fost și este efectuată în multe părți ale lumii (Paton și Greiser-Wilke, 2003). Boala poate fi controlată efectiv prin vaccinarea cu vaccin marcat care să permită diferențierea animalelor vaccinate de cele infectate natural sau purtătoare de virus.

Vânarea unui procent ridicat de adulți, păstrează populația tânără de mistreți, făcând să crească numărul de animale sensibile și oferind condiții ideale pentru răspândirea în continuare a virusului PPC. Grupurile de mistreți sunt în mod normal controlate de scoafe adulte, dar dacă în cadrul unui grup femelele adulte sau tineretul au fost vâdate, mistreții mai tineri se pot deplasa până la 50

km, permițând diseminarea virusului pe distanțe mari. Imunizarea orală a mistreților a fost introdusă ca un instrument suplimentar pentru a îmbunătăți imunitatea grupurilor (Kramer-Schadt și colab. 2007). Vaccinarea orală a mistreților a contribuit la reducerea incidenței peștei porcine clasice și, în consecință diminuarea amenințării de introducere a virusului în populațiile de porci domestici (von Ruden S. și colab., 2008).

6.2.3. Concluzii parțiale

În zonele endemice pentru pestă porcină clasică în care exploatațiile non-profesionale sunt principalul sistem de creștere a suinelor, vaccinarea de urgență este un instrument important în eradicarea PPC. Acest lucru poate scurta perioada necesară pentru eradicarea bolii.

Prin urmare, diagnosticul peștei porcine clasice s-a concentrat pe studii epidemiologice prin examene virusologice (IFD și RT-PCR) în zonele în care au fost identificate animalele pozitive serologic.

Testările prin examen RT-PCR efectuate în perioada 2010-2012 pe probe de sânge pe EDTA și țesuturi recoltate de la suine domestice și sălbatic de pe teritoriul județelor Iași, Vaslui și Suceava a evidențiat absența detecției genomului virusului peștei porcine clasice, încadrând animalele testate ca fiind neinfectate sau nepurtătoare ale VPPC.

6.3. Teste de diferențiere în cazul vaccinării de urgență împotriva peștei porcine clasice

În prezent, există un test serologic de diferențiere, pentru a diferenția porcii care au fost vaccinați cu vaccinuri marker de porcii care au fost infectați cu tipul sălbatic al virusului pestos. Prin acest test se detectează anticorpii produși împotriva glicoproteinei E_{ns} a virusului peștei porcine clasice. Principiul de bază al acestui test este că animalele vaccinate, neinfectate, produc anticorpi numai împotriva glicoproteinei E₂, în timp ce animalele infectate cu tipul sălbatic al virusului peștei porcine clasice produc anticorpi inclusiv împotriva altor antigene virale.

Deasemenea porcii care au fost infectați cu pestivirusuri cum ar fi virusul diareea bovine BVD sau a bolii de graniță BD, altele decât virusul peștei porcine clasice, vor reacționa de asemenea E_{ns} pozitiv. Atât timp cât unele animale vaccinate cu vaccin marker și infectate după vaccinare pot să nu reacționeze pozitiv, sensibilitatea acestui test nu este ideală. Din datele cunoscute, se

sugerează ca acest test de diferențiere nu poate fi folosit cu succes la probele de ser provenite de la porcii sălbatici.

Testul de diferențiere este folosit pentru a se verifica prezența sau absența circulației virusului pestos într-o populație de porci vaccinați cu vaccin marker. Acesta poate fi folosit cu succes la loturi de animale, dar nu exclude cu certitudine infecția cu virusul pestei porcine clasice la nivel de individ. Specificitatea testului de diferențiere, poate să nu fie suficientă în cazul vaccinării porcilor adulți pentru a deosebi cert porcii vaccinați cu vaccin marker de porcii infectați.

Diferențierea animalelor vaccinate cu subunitatea virală E2 (E^{rms} negative) de cele infectate (E^{rms} pozitive) s-a realizat utilizând kitul CHEKIT – CSF- MARKER. CHEKIT – CSF- MARKER (IDEXX Laboratories) este un kit imunoenzimatic simplu, specific, sensibil și rapid, pentru detecția anticorpilor față de glicoproteina E^{rms} ale pestivirusurilor (virusul pestei clasice porcine, virusul diareei bovine BVD și virusul bolii de frontieră BD). Plăcile de microtitrare sunt precăpușite cu anticorpi monoclonali anti- gp E^{rms} .

Serurile diluate ce urmează a fi testate sunt incubate în godeurile acestor microplaci împreună cu o cantitate definită de E^{rms} . Orice anticorp specific pentru E^{rms} se leagă de o cantitate definită de antigen E^{rms} prezentă în soluția dată și formează complexe antigen-anticorp ce nu se vor lega de anticorpii ce căpușesc suprafața godeurilor (proba pozitivă).

Legarea E^{rms} de placa nu este influențată de serurile negative sau de probele provenite de la animale vaccinate cu fracțiunea E2.

6.4. Principiile, utilizarea testelor serologice și evaluarea rezultatelor acestora

La porcii infectați cu virusul pestei porcine clasice, anticorpii sunt detectați în probe de ser după a doua - a treia săptămână de la infecție. La porcii vindecați, anticorpii de neutralizare protectori pot fi detectați câțiva ani sau chiar pe toată viața. La animalelor bolnave anticorpii pot fi detectați în mod sporadic în stadiul terminal al bolii.

Purcii infectați intrauterin anticorpi de origine maternală pot fi detectați în timpul primelor zile de viață. La purcii mai mari de trei luni dacă se găsesc anticorpi ai pestei porcine clasice, este puțin probabil ca aceștia să fie de origine maternală.

Detectarea anticorpilor împotriva virusului pestei porcine clasice în probe de ser sau plasmă sangvină este efectuată pentru stabilirea perioadei de infectare în cazul existenței focarelor de pestă porcină clasică. Testele serologice

au valoare limitată pentru detectarea unei infecții recente cu virusul pestei porcine clasice.

Poziționarea porcilor seropozitivi într-o exploatație poate furniza informații importante privind introducerea virusului pestei porcine clasice în exploatație. Mulți porci cu titru de neutralizare mare pot indica intrarea virusului în exploatație cu mai mult de o lună înainte.

Câțiva porci seropozitivi cu un titru de neutralizare scăzut pot indica o infecție recentă (până la patru săptămâni). Au fost perfectate câteva tehnici ELISA ce folosesc anticorpi monoclonali specifici, care sunt bazate pe două variante: ELISA competitiv sau de blocare și ELISA necompetitiv.

ELISA competitiv sau de blocare este, de obicei, bazat pe anticorpi monoclonali. Dacă proba de ser conține anticorpi ai virusului clasic, legătura unui anticorp monoclonal selectat conjugat cu peroxidază la antigenul viral va fi inhibată, rezultând un semnal redus.

În testul ELISA necompetitiv legătura anticorpilor din ser cu antigenul viral este măsurată direct utilizând anticorpi anti IgG de porc conjugați cu peroxidază..

Testul ELISA utilizat pentru diagnosticul serologic al pestei porcine clasice, trebuie să recunoască toate serurile de referință de la porcii în convalescență. rezultatele obținute cu seruri de la porci în faza inițială a infecției indică sensibilitatea testului ELISA.

Sensibilitatea testului ELISA mai mică decât a testului de virus neutralizare, se recomandă ca test screening aplicat la un lot de porcine. ELISA este mai ușor și mult mai rapid de realizat decât testul de virus neutralizare, datorită sistemului automat.

Protocolul de lucru al kitului CHEKIT – CSF- MARKER (IDEXX)

- toți reagentii au fost lăsați să ajungă la temperatura camerei (20-22°C)
- s-au determinat cantitățile necesare de soluție de spălare și diluare CHEKIT pentru a spăla plăcile de microtitrare și pentru a prepara conjugatul
- s-au pus 125 μ l de diluant pentru probe în fiecare godeu al plăci de microtitrare.
- s-au adăugat 50 μ l de seruri de testat respectiv de seruri de control nediluate în fiecare godeu.
- s-au omogenizat toate componentele prin agitare ușoară, agitând placa ușor (un agitator de microplaci poate fi utilizat).
- s-au adăugat 25 μ l CHEKIT –CSF- E^{rms} (gata de utilizare) în fiecare godeu al plăcii.
- diluția de lucru finală a probelor și a serurilor de control este 1:4.
- s-au omogenizat prin agitare ușoară utilizând un agitator de microplaci.

- s-a acoperit placa și s-a incubat la 37⁰C pentru 60 de minute într-o incintă umedă.
- după incubare s-a spălat placa de cel puțin doua ori cu cel puțin 300 μl de soluție de spălare- diluare CHEKIT evitând să se formeze bule de aer și apoi s-a scuturat placa pe o hârtie de filtru.
- s-a diluat CHEKIT Anti PO Conjugat 1:200 utilizand diluantul pentru conjugat și s-a distribuit câte 20 μl din această soluție in fiecare godeuri, s-a acoperit placa și s-a incubat la temperatura de 37 ⁰C in atmosferă umedă , timp de 60 de minute.
- s-a spălat placa la fel ca după prima incubare.
- s-a adăugat 200μl cromogen CHEKIT preîncălzit la 25 ⁰C in fiecare godeu și s-a incubat la temperatura camerei (18- 25 C).
- citirea densităților optice se face la o lungime de unda de 405nm (lungimea de unda referențiale = 492 nm). După adăugarea cromogenului, în 30 de minute (+/- 10 minute)) reacția poate fi stopata prin adăugarea de soluție de stopare CHEKIT 50μl , preîncălzita la temperatura camerei (18-25). Analizarea probelor se face in raport cu serurile de referință negativ respectiv pozitiv și se face după formula :
- Valoarea (%) = $\frac{DO \text{ neg.} - DO \text{ proba}}{DO \text{ neg.} - DO \text{ poz.}} \times 100\%$

Valoare	< 40%	40 - 50%	>50%
Interpretare	Negativ	Dubios	Pozitiv

Rezultate privind diagnosticul pestei porcine clasice prin teste serologice de diferențiere în județul Iași în perioada 2008-2009

În cadrul investigațiilor serologice pentru diferențierea animalelor vaccinate cu vaccinul marcat (subunitatea E2 a virusului pestei porcine clasice) au fost prelevate în perioada 2008-2009 un număr de 343 probe de sânge de la suine domestice provenite din ferme comerciale și 456 probe provenite de la porci domestici crescuți în sistem gospodăresc.

Toate probele au fost testate kitul comercial IDEXX CSFV Marker în scopul diferențierii animalelor vaccinate cu vaccinul subunitar și cele infectate cu virusul sălbatic circulant, respectiv suine vaccinate cu vaccinuri convenționale (vii atenuate).

Tabel 6.15

Diagnosticul pestei porcine clasice la suinele domestice în județul Iași în anul 2008 utilizând teste serologice de diferențiere

Table 6.15

The diagnosis of classical swine fever in domestic pigs in Iași County in 2008 using IDEXX CSFV Marker Test

TEST	Specificație	2008	
		Exploatații profesionale	Exploatații Non-profesionale
ELISA Erns	Nr. de probe	301	456
	Probe pozitive	10	-
	Probe negative	291	456

Din analiza datelor prezentate în tabelul 6.27. se poate observa că în anul 2008 în urma testării a 301 animale pentru detectarea anticorpilor produși împotriva glicoproteinei E^{ms} a virusului pestei porcine clasice, 291 au fost identificate ca fiind seronegative și 10 seropozitive. Probele pozitive proveneau de la scroafe de reproducție vaccinate cu vaccin convențional.

În urma testării printr-un examen serologic care să detecteze anticorpi împotriva glicoproteinei E^{ms} a virusului pestei porcine clasice s-au analizat 456 probe toate fiind încadrate ca fiind negative pentru VPPC.

Tabel 6.16

Diagnosticul pestei porcine clasice la suinele domestice în județul Iași în anul 2009 utilizând teste serologice de diferențiere

Table 6.16

The diagnosis of classical swine fever in domestic pigs in Iași County in 2009 using IDEXX CSFV Marker Test

TEST	Specificație	2009	
		Exploatații profesional e	Exploatații non-profesionale
ELISA Erns	Nr. de probe	42	-
	Probe pozitive	13	-
	Probe negative	29	-

În anul 2009 în urma testării printr-un examen serologic care să detecteze anticorpi împotriva glicoproteinei E_{ns} a virusului pestei porcine clasice s-au analizat 42 probe din care 29 au fost negative și 13 seropozitive (scroafe vaccinate cu vaccin viu atenuat).

6.5. Principiile, utilizarea testelor virusologice și evaluarea rezultatelor acestora

Testul de imunoperoxidază cu anticorpi monoclonali este folosit pentru confirmarea diagnosticului de pestă porcină clasică prin diferențierea de alte pestivirusuri sau tulpini vaccinale de virus pestos.

Pentru a stabili dacă un rezultat pozitiv la testul de imunofluorescență directă este determinat de un virus sălbatic al pestei porcine clasice, de un virus vaccinal, de virusul BVD sau virusul BD, se folosește diferențierea cu anticorpi monoclonali specifici pentru tulpini sălbatice sau vaccinale ale virusului pestei porcine clasice.

Testul se bazează pe proprietatea anticorpilor monoclonali de a se lega de anumite situsuri ale antigenelor virale specifice anumitor virusuri. O condiție esențială este ca anticorpul monoclonal pentru virusul pestei porcine sălbatice să recunoască toate tulpinile sălbatice ale virusului iar anticorpul monoclonal pentru tulpinile vaccinale să recunoască toate tulpinile vacinale folosite în țară. Poate fi folosit ca martor pozitiv și un anticorp policlonal anti-virus al pestei porcine conjugat cu peroxidază.

CAPITOLUL VII. CERCETĂRI PRIVIND INFECȚIA SUINELOR DOMESTICE ȘI SĂLBATICE CU PESTIVIRUSURI DE LA RUMEGĂTOARE

CHAPTER VII. RESEARCH ON DOMESTIC PIGS AND WILD BOAR INFECTION WITH RUMINANT PESTIVIRUSES

7.1. Investigațiile privind infecția suinelor domestice și sălbatică cu pestivirusuri de la rumegătoare în estul României.

Pestivirusurile au fost clasificate inițial în trei specii în funcție de receptivitatea de gazdă: virusul bolii de graniță (VBD) la ovine și caprine, virusul diareei virale bovine bolii mucoaselor (VBVD) la bovine și virusul pestei porcine clasice (PPCV) la suine. Însă în urma cercetărilor s-a demonstrat că atât BVDV și BDV nu sunt limitate la o singură gazdă. De aceea, un pestivirus izolat de la suine poate aparține uneia din cele trei specii.

7.1.1. Material și metode

S-au prelevat următoarele organe de interes: splina, rinichii, tonsilele, limfonoduri (retrofaringiene, parotidiene, mandibulare sau mezenterice).

Prelevarea s-a făcut cu instrumentar steril destinat recoltării probelor biologice, (bisturiu, pense, foarfece), sau cu instrumentar de unică folosință, folosind echipament de protecție (mănuși de unică folosință, halat).

Probele prelevate au fost ambalate în recipiente etanșe, pentru a se evita scurgerile de lichide. Probele s-au transportat în lăzi izoterme, care asigură o temperatură aproape de refrigerare.

După prelevare, probele au fost păstrate în condiții de refrigerare, la o temperatură cuprinsă între 4-8⁰C, pentru maximum 12 ore până la procesarea acestora. Dacă intervalul de timp a fost mai mare de 12 ore, probele s-au păstrat la temperaturi de congelare de -80⁰C, până la procesarea lor.

Tehnica PCR folosită pentru diagnosticul infecțiilor cu pestivirusuri la suine a fost metoda One Step rt-PCR convențional.

- **Protocolul de lucru pentru detecția infecțiilor cu pestivirusuri la suinele domestice și sălbatice.**

Materialele necesare:

- Kit pentru extracție acizi nucleici – „RNeasy Mini kit” (Qiagen) care se păstrează la temperatura camerei, iar componentele sale se reconstituie și se utilizează conform instrucțiunilor din prospect.
- Kit amplificare acizi nucleici One StepRT-PCR (Qiagen);

Primeri pentru identificare a genomului pestivirusurilor

- Primer sens „a” zona 5' NTR a genomului viral
5'- ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA - 3'
- Primer antisens „b” zona 5' NTR a genomului viral
5'- TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC - 3'

Primeri pentru identificare a genomului virusului pestei porcine clasice

- Primer sens „a” (50μM) zona 5' NTR a genomului viral
5' - CAG CTT CAR YGT TGA TTG T - 3' ;
- Primer antisens „b” (50μM) zona 5' NTR a genomului viral
5' – CTA GCC ATG CCC WYA GTA GG - 3';

Primeri pentru identificarea genomului virusului BVDV1

(Diareea virală – Boala mucoaselor)

- Primer sens „a” zona 5' NTR a genomului viral
5' – GGT AGC AAC AGT GGT GAG-3'
- Primer antisens „b” zona 5' NTR a genomului viral
5' – GTA GCA ATA CAG TGG GCC-3'

Primeri pentru identificarea genomului virusului BVDV2

(Diareea virală – Boala mucoaselor)

- Primer sens „a” zona 5' NTR a genomului viral
5' - CGA CAC TCC ATT AGT TGA GG -3'
- Primer antisens „b” zona 5' NTR a genomului viral
5' – GTC CAT AAC GCC ACG AAT AG -3'

- RNasin 40 U/μl
- Tampon 10 x PBS
- agaroza;

- tampon de încărcare (bromphenol blue)
- marker de masa moleculara (100 pb)
- Bromura de etidiu 10 mg/ml

Pregătirea probelor de organe

Probele de organe congelate s-au lăsat să se decongeleze treptat. Organele refrigerate s-au putut prelucra imediat. După identificare, probele s-au scos individual din ambalaje și din fiecare organ s-a prelevat o porțiune de aproximativ 1 cm³ care s-a plasat într-o placă Petri. Aceleași instrumente (pensă și lamă de bisturiu de unică folosință) s-au folosit și pentru restul de organe care au aparținut aceluiași animal.

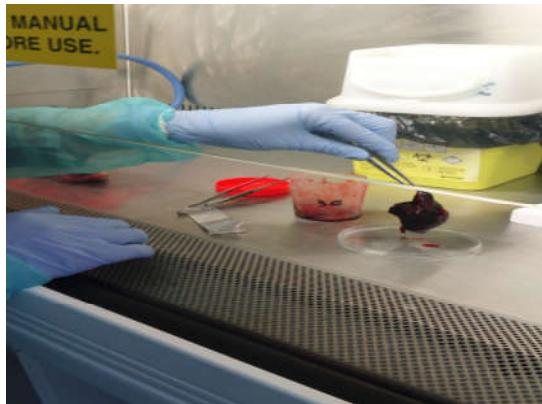


Fig.7.1. Pregătirea probelor de țesut în vederea extracției de ARN

Fig.7.1 Tissue sample preparation for RNA extraction

Într-o placă Petri fragmentele de organe s-au triturat (mărunțit) cu lama de bisturiu și s-a facut un amestec de organe.



Fig. 7.2. Mărunțirea probelor de țesut în vederea triturării

Fig. 7.2. Grinding the tissue samples

Din acesta, s-a transferat cu ajutorul unei lame de unică folosință, într-un tub MagNa Lyser cu bile ceramice o cantitate de 100 mg ce s-a cântărit la balanța analitică, peste care s-a adăugat PBS de lucru de concentrație de 1X, în raport de 1:10 (100 mg probă și 900 μ l PBS de lucru de concentrație 1X). Tuburile s-au identificat în mod corespunzător cu un criomarker .

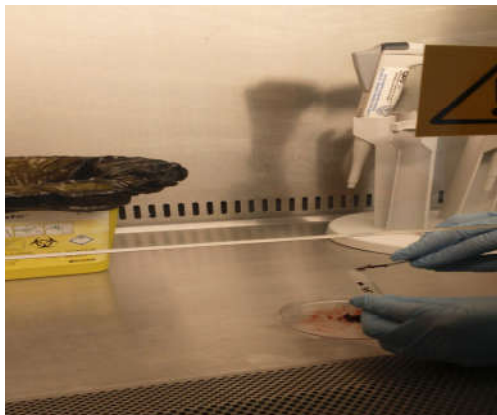


Fig 7.3. Încărcarea probelor de țesut în tuburi "Magna lyser green beads"

Fig 7.3. Charging tissue samples in "Magna lyser green beads" tubes

S-au introdus tuburile în centrifuga MagNa Lyser și s-a rulat programul prestabilit de 30 de secunde la aproximativ 7000 de rpm, apoi tuburile s-au omogenizat bine pe vortex, și s-au centrifugat timp de 3 min. la ≥ 13000 rpm. Din supernatant s-a luat apoi o cantitate de 200 μ l, din care s-a realizat extracția de acizi nucleici.



Fig. 7.4. Triturarea probelor de țesut utilizând MagNA Lyser Roche

Fig. 7.4. Trituration of tissue samples using Roche MagNA Lyser

Extracția ARN din probe biologice utilizând „RNeasy Mini kit”(Qiagen)

În cadrul protocolului de extracție se parcurg următoarele etape:

Reagentul	μl/probă
Proba biologica	200 μl
Tampon RLT	350 μl



Fig. 7.5. Extracția de ARN din țesuturi recoltate de la suine.

Adăugarea tamponului de liză RLT

Fig. 7.5. RNA extraction from swine tissue. The addition of the lysis buffer RLT

Centrifugare 3 min la ≥ 13000 rpm

Pipetare supernatant în tub Eppendorf de 1,5 ml

Etanol 70% (1ml apa +3 ml etanol absolut) 350 μl

Mixare prin pipetare

Transvazare in minicoloana pana la nivelul buzei superioare a tubului exterior

Centrifugare 15 sec la ≥ 13000 rpm

Îndepărtare eluat

Tampon RW 1 700 μl

Centrifugare 15 sec la ≥ 13000 rpm

Îndepărtare eluat

Tampon RPE de lucru (11 ml RPE conc. + 44 ml etanol) 500 μl



Fig. 7.6. Adăugarea tamponului de spălare RPE

Fig. 7.6. The addition of RPE wash buffer

Centrifugare 15 sec la ≥ 13000 rpm

Îndepărtare eluat

Tampon RPE de lucru

500 μ l

Centrifugare 3 min la ≥ 13000 rpm

Inserarea filtrului într-un tub Eppendorf de 1,5 ml

RNase-free water

50 μ l

Centrifugare 1 min la ≥ 13000 rpm

Odată cu probele de testat s-au introdus în lucru un martor pozitiv de extracție (o tulpină vaccinală de PPC sau o tulpină vaccinală de BVDV) și un martor negativ de extracție (apa).

Martorii de extracție (pozitiv și negativ) s-au supus extracției în aceleași condiții ca și probele de lucru.

După terminarea lucrului hota s-a decontaminat cu Termi-DNA-Tor (prin pulverizare), apoi s-a lasat lampa UV să funcționeze minim 30 minute. La fel s-au decontaminat și pipetele.

ARN-urile extrase s-au păstrat în frigider, dacă s-au lucrat a doua zi sau sunt stocate la congelator pentru o perioada mai lungă de timp, când nu pot fi lucrate a doua zi.

Testul „rt-PCR”

Testul „rt-PCR” s-a realizat în mai multe etape în condiții de lucru specifice și care necesită o mare rigurozitate.

1. S-a utilizat kitul „OneStep rt-PCR” (Qiagen), primerii specifici și RNasin 40 U/μl;
2. Reagenții necesari pregătirii Master-mixului au fost depozitați în congelator.
3. Primerii s-au reconstituit conform fișei tehnice, s-au alicotat și s-au păstrat la congelator.
4. În momentul pregătirii Master-mixului toți reagenții s-au scot din congelator și s-au decongelat treptat pe gheață până la utilizare. Mix enzime One Step rt-PCR s-a menținut la congelator până în momentul utilizării și s-a centrifugat scurt la ≥ 7000 rot/min, înainte de utilizare;
5. Toți reagenții au fost vortexați (cu excepția Mix enzime), apoi centrifugați scurt.
6. S-au amestecat pe gheață următoarele componente, conform protocolului de lucru stabilit.

Prepararea Master – mixului folosind primeri specifici pentru detecția pestivirusurilor

Reagenți	μl/proba
Apa (RNase free) (Qiagen)	22,75
Tampon OneStep RT-PCR 5x (Qiagen)	10
dNTP 10 mM (Qiagen)	2
Primer 324 20 pmol/μl	1,5
Primer 326 20 pmol/μl	1,5
RNasin 40 U/μl	0,25
Mix enzime OneStep RT-PCR (Qiagen)	2
TOTAL	40

Master-mixul obținut s-a omogenizat prin pipetare.

Cuplarea ARN-ului extras cu mixul

S-a pipetat în tuburi de 0,2ml: 40μl amestec de reacție și 10μl ARN extras. Pipetare s-a făcut pe gheață în hota de cuplare ;

Amestecul s-a omogenizat bine cu ajutorul pipetei.

În etapa de cuplare se introduc martorii de control al mixului: un martor pozitiv de control al mixului (o probă de ARN cert pozitiv, extras anterior dintr-un standard de extracție pozitiv) și un martor negativ de control al mixului (apă)

Realizarea amplificării în thermocycler

Tubulețele cu amestecul de reacție s-au introdus apoi în termocycler (ICycler - BioRad) și s-a derulat programul de amplificare prestabilit. S-au setat parametrii de amplificare la următoarele valori:

50°C - 30' 1x; 95°C - 15' 1x;
94°C - 45"; 56°C - 45"; 72°C - 45" 45x ;
72°C - 7' 1x; 4°C - ∞

Protocolul specific de detecție al genomului virusului PPC a fost descris la cap.VI "Investigații privind detecția virusului peștei porcine clasice prin tehnici de biologie moleculară la suinele domestice și mistreți"

Prepararea Master – mixului folosind primeri specifici detecția genomului virusului BVDV1

Reagenți	μl/proba
Apa (RNase free) (Qiagen)	14,8
Tampon OneStep RT-PCR 5x (Qiagen)	5,1
dNTP 10 mM (Qiagen)	1,1
Primer BVDV 1 F 20 pmol/μl	0,4
Primer BVDV 1 R 20 pmol/μl	0.4
RNasin 40 U/μl	0,1
Mix enzime OneStep RT-PCR (Qiagen)	1,1
TOTAL	23μl

Master-mixul obținut s-a omogenizat prin pipetare.

Cuplarea ARN-ului extras cu mixul

S-a realizat în hota de cuplare, pe gheață.

S-a pipetat pe gheață în tuburi de 0,2ml, 23μl amestec de reacție și 2μl ARN extras.

Amestecul s-a omogenizat bine cu ajutorul pipetei.

În etapa de cuplare se introduc martorii de control al mixului: un martor pozitiv de control al mixului (o probă de ARN cert pozitiv, extras anterior dintr-un standard de extracție pozitiv) și un martor negativ de control al mixului (apă).

Realizarea amplificării în thermocycler

Tubulețele cu amestecul de reacție s-a introdus apoi în ICycler și s-a derulat programul.

S-au setat parametrii de amplificare la următoarele valori:

50°C - 30' 1x; 95°C - 15' 1x;
 94°C - 45'', 58°C - 45'', 72°C - 45'', 45x ;
 72°C - 7' 1x; 4°C - ∞

Prepararea Master – mixului folosind primeri specifici detecția genomului virusului BVDV2

Reagenți	μl/proba
Apa (RNase free) (Qiagen)	14,8
Tampon OneStep RT-PCR 5x (Qiagen)	5,1
dNTP 10 mM (Qiagen)	1,1
Primer BVDV 2 F 50 pmol/μl	0,4
Primer BVDV 2 R 50 pmol/μl	0.4
RNasin 40 U/μl	0,1
Mix enzime OneStep RT-PCR (Qiagen)	1,1
TOTAL	23 μl

Master-mixul obținut s-a omogenizat prin pipetare.

Cuplarea ARN-ului extras cu mixul

S-a pipetat pe gheață în tuburi de 0,2ml, 23μl amestec de reacție și 3μl ARN extras. Amestecul s-a omogenizat bine cu ajutorul pipetei.

În etapa de cuplare se introduc martorii de control al mixului: un martor pozitiv de control al mixului (o probă de ARN cert pozitiv, extras anterior dintr-un standard de extracție pozitiv) și un martor negativ de control al mixului (apă).

Realizarea amplificării în thermocycler

Tubulețele cu amestecul de reacție s-au introdus apoi în ICycler (BioRad) și s-a derulat programul de amplificare prestabilit.

S-au setat parametrii de amplificare la următoarele valori:

50°C - 30' 1x; 95°C - 15' 1x;
 94°C - 1', 54°C - 1', 72°C - 1', 45x ;
 72°C - 7' 1x; 4°C - ∞

Electroforeza în gel de agaroză

a) Prepararea gelului de agaroză (1.5% TBE)

Intr-un pahar Erlenmayer s-au cântărit 0,9 g agaroză care se dizolvă în 60ml TBE 1 X (pentru gelul mic) sau pentru gelul mare se cântăresc 1.35 g agaroză în 90 ml TBE 1 X

S-a introdus paharul în cuptorul cu microunde unde a avut loc dizolvarea agarozei, la fierbere, timp de 2 min.;

S-a răcit soluția astfel obținută sub jet de apă rece, până la aprox. 60°C, s-a adăugat 5 µl EtBr 10mg/ml (gel mic) sau 7.5 µl EtBr 10mg/ml (gel mare) turnându-se imediat în tăvița de electroforeză, inserată în suportul „casting gel” și cu pieptenul fixat, în funcție de numărul de probe de analizat;

S-a lasat gelul să polimerizeze (aprox. 20 min.);

După polimerizarea totală (răcirea gelului și întărirea sa) s-a scos tăvița din suportul „casting gel”, s-a îndepărtat pieptenul fixat și s-a fixat tăvița în cuva de electroforeză ce conține TBE 1X.

Încărcarea probelor: Pe o folie de parafilm s-au pus câte 3 µl tampon de încărcare (loading buffer) peste care s-a adăugat câte 10 µl de probă;

S-a încărcat 10 µl din amestecul omogenizat în godeurile gelului de agaroză; În primul godeu s-a încărcat markerul molecular de migrare de 100 bp. În tancul de electroforeză s-a adăugat 12 µl EtBr 10mg/ml în tamponul de migrare, în zona anodului (EtBr migrează de la + la -)

Electroforeza: S-a fixat capacul aparatului de electroforeza astfel încât catodul (firul negru) să fie la „-”, iar anodul (firul roșu) să fie la „+”; (migrarea acizilor nucleici se face de la „-” la „+”);

S-au fixat parametrii sursei la 100 V, 1,5A, pentru o durată de 30 min.

După terminarea electroforezei gelul s-a analizat în sistemul de videodocumentare (GelDoc- BioRad).

Evaluarea rezultatelor amplificării prin rt-PCR

Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului viral al pestivirusurilor au o dimensiune de 288 pb.

Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului viral PPC au o dimensiune de 420 pb.

Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului viral BVDV 2 au o dimensiune de 117 pb.

Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului viral BVDV 1 au o dimensiune de 211 pb.

7.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Genul Pestivirus cuprinde trei specii de virus recunoscute: virusul peștei porcine, virusul bolii border și virusul ce determină boala mucoaselor. La cele patru tipuri de pestivirusuri clasice se mai adaugă încă cinci virusuri descoperite recent: virusul bolii mucoaselor de tip 3 (VBVD3-pestivirus bovin atipic, HoBi

virus), pestivirusul girafei, virusul peștei porcine clasice (VPPC), virusul bolii de graniță (VBD), virusul ovin Tunisian (TSV), virusul izolat de la antilope și virusul Bungowannah.

Cu toate că atât genetic cât și antigenic, VPPC diferă de VBVD și al VBD, acestea au și unele asemănări. Diferența apare mai ales pe proteina E2, deoarece majoritatea anticorpilor monoclonali care diferențiază VPPC de celelalte două pestivirusuri (VBVD și VBD), sunt direcționați față de această proteină. Dimpotrivă, relația antigenică strânsă dintre virusul PPC și celelalte două pestivirusuri este evidențiată prin reacții încrucișate de imunodifuzie, imunofluorescență și mai puțin prin teste de seroneutralizare. Anumite tulpini de VPPC pot determina formarea de anticorpi neutralizanți față de VBVD sau, invers, porcii pot fi parțial imunizați față de VPPC dacă sunt contaminați cu VBVD.

Infecțiile cu pestivirusurile rumegătoarelor la porci au o distribuție mondială. Prevalența este variată și depinde, în principal, de (I) contactul cu bovinele, (II) vârsta porcilor și (III) gradul de omologie între tulpina de virus folosită în testul serologic și tulpina sălbatică ce infectează (VBVD sau VBD) porcul. Anticorpii monoclonali disponibili fac diferența între VPPC și pestivirusurile rumegătoarelor. Studiile experimentale au explicat în mare măsură receptivitatea suinelor la infecția cu alte pestivirusuri.

Investigațiile epidemiologice au fost realizate în intervalul 2014-2015 în județe din zona de est a României: Vaslui, Bacău și Iași. Pentru realizarea examenelor de laborator a fost utilizat testul rt-PCR clasic. Probele au provenit de la suine domestice din exploatații non-profesionale precum și de la suine sălbatice.

Rezultatele privind testarea probelor de organe de la porcii domestici și mistreți pentru detectarea infecțiilor cu pestivirusuri prin examen rt-PCR clasic în județul Iași în perioada 2014-2015

Tabel 7.1

Detectia prin examen rt-PCR clasic a infecțiilor cu pestivirusuri
la suine din județul Iași

Table 7.1

Detection through rt-PCR of pestivirus infections in
swine from Iași County

TEST	Specificație	Mistreți	Porci domestici
RT-PCR clasic pe probe de organe	Nr. de probe	150	25
	Probe pozitive	6	5
	Probe negative	144	20

Investigațiile realizate în vederea detecției pestivirusurilor prin examen rt PCR clasic s-au efectuat pe probe de țesuturi prelevate de la suine domestice și sălbatice moarte sau sacrificate.

Utilizând tehnica rt-PCR clasic care să detecteze prezența genomului pestivirusurilor s-au analizat 150 probe organe de la mistreți și 25 probe organe recoltate de la porcii domestici din exploatațiile necomerciale. În urma reacțiilor de biologie moleculară au fost identificate ca fiind pozitive pentru secvența de genom 5'UTR comună pestivirusurilor 6 probe recoltate de la mistreți și 5 probe recoltate de la porci domestici. Amplificarea acestei regiuni s-a bazat pe descrierile din literatura de specialitate care certifică faptul că asemănarea pestivirusurilor apare în regiunea 5' UTR și diferențierea lor între nucleotidele 208 și 223.

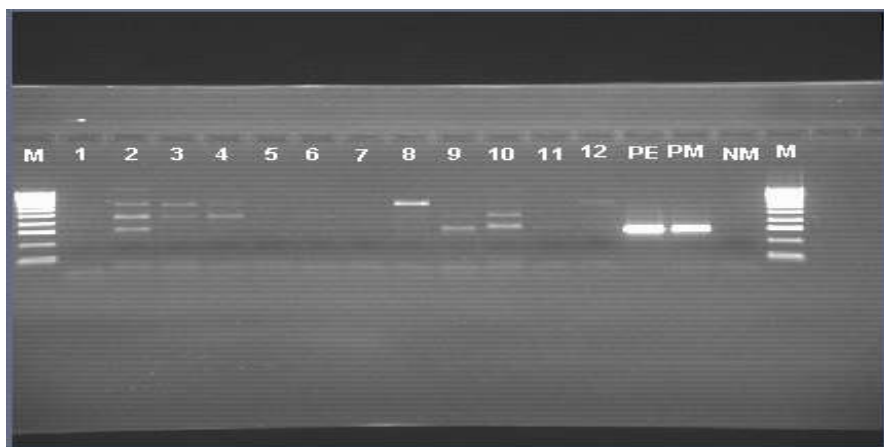


Fig.7.7. Rezultatele testării prin rt- PCR utilizând primeri panpestivirus a probelor de origine suină (porc domestic și mistreț) recoltate de pe teritoriul județului Iași

Fig.7.7. Results of rt-PCR using panpestivirus primers of swine samples (domestic swine and wild boar) collected from Iași County

Legenda: M - Marker molecular de 100 bp, 2 – probă porc domestic, 9- probă mistreț, 10 - probă mistreț, PE (T.V. dil 10-1, control pozitiv extracție), PM (ARN pozitiv- dil 10-4, control pozitiv mix), NM (apa – control negativ mix).

Pentru testul rt-PCR convențional, rezultatele de „pozitiv” sau „negativ” s-au stabilit în urma analizei benzilor specifice obținute prin electroforeză orizontală în gel de agaroză. Estimarea dimensiunii ampliconului s-a realizat cu ajutorul markerului de masa moleculară (M) în sistemul de videodocumentare (GelDoc). Probele pozitive pentru prezența genomului pestivirusurilor reprezintă ampliconi ce au migrat sub formă de benzi specifice cu talia de 288 pb.

Investigațiile de biologie moleculară au fost extinse prin testarea de probe de țesuturi recoltate de la porci domestici din exploatații necomerciale și mistreți de pe teritoriul a încă două județe din zona de est a României: Vaslui și Bacău.

Studiul a constatat în testarea a 100 probe de țesuturi recoltate de la suidee de pe teritoriul județului Vaslui și 252 probe de țesuturi recoltate de la suine domestice și sălbatice de pe teritoriul județului Bacău. Acest studiu s-a desfășurat în perioada 2014-2015.

Tabel 7.2

Detecția prin examen rt-PCR clasic a infecțiilor cu pestivirusuri
la suine din județul Vaslui

Table 7.2

Detection through rt-PCR of pestivirus infections in
swine from Vaslui County

TEST	Specificație	Mistreți	Porci domestici
RT-PCR clasic pe probe de organe	Nr. de probe	85	15
	Probe pozitive	-	-
	Probe negative	85	15

Din analiza datelor prezentate în tabelul 7.2 se pot observa rezultatele testelor de depistare a infecțiilor cu pestivirusuri în perioada 2014-2015 în județul Vaslui. În urma efectuării examenului rt-PCR clasic în vederea detecției pestivirusurilor toate probele testate au fost identificate ca fiind negative.

Tabel 7.3

Detecția prin examen rt-PCR clasic a infecțiilor cu pestivirusuri
la suine din județul Bacău

Table 7.3

Detection through rt-PCR of pestivirus infections in
swine from Bacău County

TEST	Specificație	Mistreți	Porci domestici
RT-PCR clasic pe probe de organe	Nr. de probe	200	52
	Probe pozitive	6	6
	Probe negative	199	50

În urma testării prin examen rt-PCR clasic a 52 probe provenite din exploatațiile necomerciale și 200 probe organe provenite de la mistreți au fost identificate 12 probe pozitive pentru prezența genomului pestivirusurilor: 6 probe recoltate de la mistreți și de la 6 porci domestici.



Fig.7.8. Rezultatele testării prin rt- PCR utilizând primeri panpestivirus a probelor de origine suină (porc domestic și mistreț) recoltate de pe teritoriul județului Bacău

Fig.7.8. Results of rt-PCR using panpestivirus primers of swine samples (domestic swine and wild boar) collected from Bacău County

Legenda: M - marker molecular de 100 bp, 1 – probă porc domestic, 2 – probă porc domestic, 6 - probă mistreț, 10 - probă porc domestic, 11 - probă mistreț, 12 - probă mistreț, PE (T.V. dil 10-1, control pozitiv extracție), NM (apa – control negativ mix), PM (ARN pozitiv- dil 10-4, control pozitiv mix).

Probele identificate ca fiind pozitive în urma examenului rt-PCR utilizând primerii panpestivirus au fost ulterior selectate și retestate utilizând primeri specifici pentru virusul peștei porcine clasice.

Virusul peștei porcine clasice măsoară 40-50 nm în diametru și are o nucleocapsidă de aproximativ 29 nm. Este un virus anvelopat cu simetrie icozaedrică și ARN monocatenar. ARN-ul monocatenar al virusului are polaritate pozitivă și lungimea de 12,3 kb. Genomul a fost complet secvențializat prezentând un ORF ce codifică o poliproteină de aproximativ 3900 aminoacizi. ORF-ul este flancat de o regiune 5' non-codantă cu lungimea de 150 nucleotide și de o altă regiune, 3' non-codantă care are aproximativ 200 de nucleotide.

Print examen rt-PCR clasic în vederea detecției genomul virusului peștei porcine clasice au fost analizate 6 probe organe de la mistreți și 5 probe organe recoltate de la porcii domestici din exploatațiile necomerciale identificate anterior ca fiind pozitive pentru prezența genomului panpestivirusurilor. În urma reacției rt-PCR cu primeri specifici pentru VPPC toate probele au fost încadrate ca fiind negative.

Tabel 7.4

Detecția VPPC prin examen rt-PCR în probe identificate pozitive pentru pestivirusuri recoltate de la suine din județul Iași

Table 7.4

CSFV detection through rt-PCR on pestivirus positive samples collected from pigs in Iași County

TEST	Specificație	Mistreți	Porci domestici
RT-PCR clasic pe probe de organe	Nr. de probe	6	5
	Probe pozitive	-	-
	Probe negative	6	5

Pentru testul RT-PCR convențional, rezultatele de „pozitiv” sau „negativ” se stabilesc în urma analizei benzilor specifice obținute prin electroforeză. Estimarea dimensiunii ampliconului s-a realizat cu ajutorul markerului de masa moleculara în sistemul de videodocumentare GelDoc (BioRad). Probele pozitive reprezintă benzi specifice cu dimensiune de 420 pb.



Fig. 7.9. Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri specifici pentru VPPC a probelor pozitive pentru pestivirusuri

Fig. 7.9. Results of rt-PCR using specific primers for CFSV on positive samples for pestiviruses

Legenda: M - Marker molecular de 100 bp, 1- 6 probe mistreți, PE (T.V.PPC dil 10-1, control pozitiv extracție), NE (control negativ extracție), PM (ARN pozitiv - dil 10-4, control pozitiv mix), NM (apa – control negativ mix).

În urma testării prin examen rt-PCR clasic care să detecteze genomul virusului pestei porcine clasice cele 12 probe anterior identificate ca pozitive pentru genomul pestivirusurilor au fost încadrate ca negative pentru virusul pestei porcine clasice.

Tabel 7.5

Detecția VPPC prin examen rt-PCR în probe identificate pozitive pentru pestivirusuri recoltate de la suine din județul Bacău

Table 7.5

CSFV detection through rt-PCR on pestivirus positive samples collected from pigs in Bacău County

TEST	Specificație	Mistreți	Porci domestici
RT-PCR clasic pe probe de organe	Nr. de probe	6	6
	Probe pozitive	-	-
	Probe negative	6	6

Din analiza rezultatelor testării identificării genomului VPPC a probelor pozitive pentru pestivirusuri se poate concluziona că infecția mistreților și a porcilor domestici din județele Bacău și Iași este produsă de un alt tip de pestivirus. În acest caz cercetările vor continua cu testarea probelor în vederea detecției prin reacția RT-PCR a virusului diareei virale bovine-boala mucoaselor.

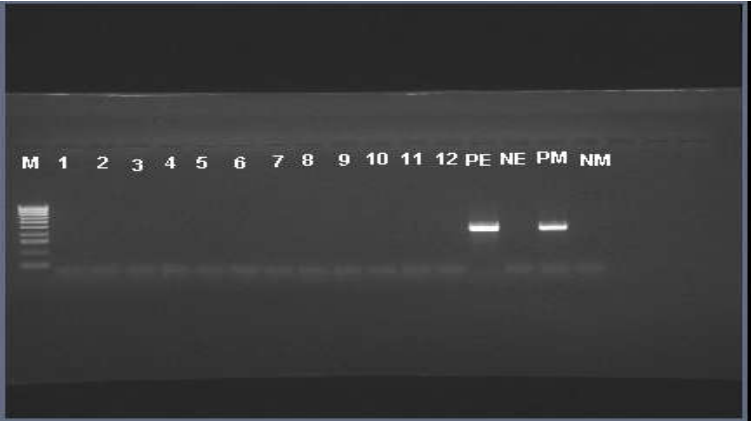


Fig. 7.10. Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri specifici pentru VPPC a probelor pozitive pentru pestivirusuri

Fig. 7.10. Results of rt-PCR using specific primers for CFSV on positive samples for pestiviruses

Legendă: M - Marker molecular de 100 bp, 1 – 6 probe porc domestic, 7 – 12 probe mistreți, PE (T.V.PPC dil 10-1, control pozitiv extracție), NE (control negativ extracție), PM (ARN pozitiv - dil 10-4, control pozitiv mix), NM (apa – control negativ mix).

În vederea identificării tipului viral de pestivirus cele 23 probe pozitive la amplificarea cu primeri panpestivirus (11 probe provenite de la suine de pe teritoriul județului Iași și 12 probe provenite de la suine de pe teritoriul județului Bacău) au fost supuse testării prin reacția rt-PCR în vederea detecției genomului virusului diareei virale bovine-boala mucoaselor. În acest scop extractele ARN au fost testate folosind două protocoale diferite cu primeri specifici pentru VBVD1, respectiv VBVD2. Validarea reacției s-a realizat utilizand martor pozitiv un extract de ARN provenit din tulpinile vaccinale *Bovela* (Boehringer Ingelheim): VBVD-1 tulpina non-citopatică KE și VBVD-2 tulpina non-citopatică NY.

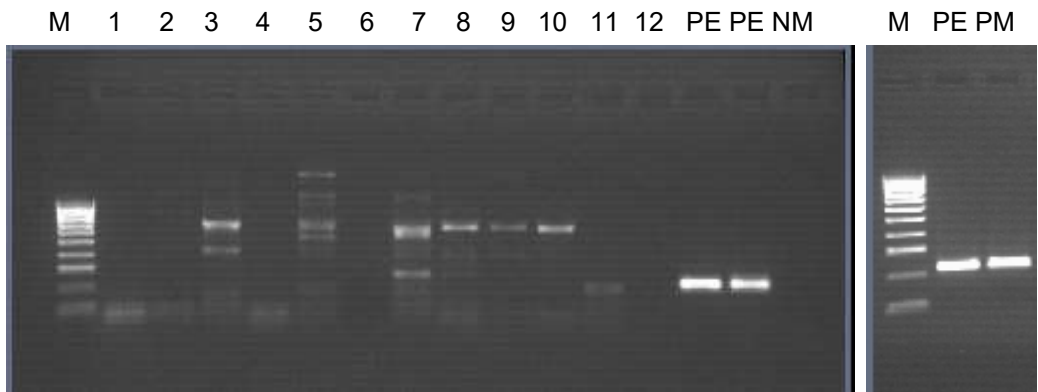


Fig. 7.11. Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri specifici pentru VBVD1 a probelor pozitive pentru pestivirusuri

Fig. 7.11. Results of rt-PCR using specific primers for BVDV1 on positive samples for pestiviruses

Legendă: M - Marker molecular de 100 bp, 1 – 6 probe porc domestic, 7 – 11 probe mistreți, 12 TV PPC, 13-14 PE (T.V. BVD dil 10-1, 10-2 control pozitiv extracție), NM (control negativ mix), PM (ARN pozitiv , control pozitiv mix),

În urma amplificării celor 23 extracte ARN pozitive pentru genomul pestivirusurilor, utilizând reacția rt-PCR cu primeri specifici pentru VBDB1 au fost detectate cinci produși PCR pozitivi cu talia așteptată de 211 pb.

Aceleași 23 extracte ARN au fost supuse amplificării rt-PCR utilizând primerii specifici pentru VBVD2. În urma testării nu a fost identificat nici un produs PCR pozitiv (tală așteptată fiind de 117 pb).

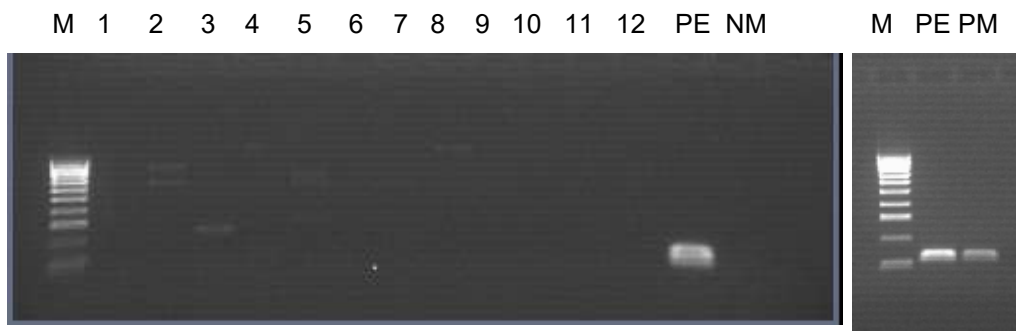


Fig. 7.12. Rezultatele testării prin rt-PCR utilizând primeri specifici pentru VBVD2 a probelor pozitive pentru pestivirusuri

Fig. 7.12. Results of rt-PCR using specific primers for BVDV2 on positive samples for pestiviruses

Legendă: M - Marker molecular de 100 bp, 1 – 6 probe porc domestic, 7 – 11 probe mistreți, 12 TV PPC, PE (T.V BVD. dil 10-1, control pozitiv extracție), NM (control negativ mix), PM (ARN pozitiv , control pozitiv mix),

Până în prezent în literatura de specialitate a fost descrisă posibilitatea de infecție naturală a suinelor cu pestivirusuri de la rumegătoare. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că pestivirusurile sunt strâns înrudite în ceea ce privește structura genomului și organizarea acestuia, au similaritate semnificativă a secvențelor de nucleotide și de aminoacizi și prezintă reactivitate antigenică încrucișată.

Aceste virusuri prezintă gazde comparabile, tropism pentru aceleași celule in vivo, tropism pentru celule echivalente in vitro și un mecanism comun de internalizare în celule (Flores și colab., 1996). În plus moleculele implicate în medierea interacțiunii inițiale ale virionilor pestivirusuri cu mediatorii de pe suprafața celulei receptive prezintă similaritate structurală (Weiland și col., 1990). Prin urmare este posibil ca pestivirusurile să poată utiliza un mecanism comun, probabil molecule omoloage de suprafață celulelor sau ale compartimentului endosomal, pentru a interacționa și să livreze genomul viral către citosol.

În scopul stabilirii gradului de distribuție la nivel mondial a infecțiilor cu pestivirusurile rumegătoarelor la porci, studii serologice și de biologie moleculară au fost efectuate în diferite țări. Numărul/procentul de seruri pozitive pentru anticorpi anti-VBVD variază foarte mult. Una dintre primele anchete a fost realizată folosind probe de ser colectate de la porci abatorizați în trei state australiene. La 115 porci mai mari de douăsprezece luni, aproximativ 50%, s-au

detectat anticorpi pentru ambele virusuri: VBVD și VPPC, comparativ cu doar 2,8% la porcii mai tineri (Snowdon W.A, French E.L, 1976).

Prezența anticorpilor anti - VBVD și VBD la porci în momentul unei infecții VPPC poate afecta transmiterea virusului pestei porcine clasice și între efectivele infectate (Wieringa-Jelsma T. și colab., 2006). Transmiterea de VPPC într-un efectiv poate fi redusă, până la un nivel de focar foarte mic și auto-limitare. Un astfel de focar poate trece neobservat și nu prezintă în mod necesar o amenințare pentru alt efectiv. În această situație infecția cu VPPC va duce la simptome clinice mai puțin vizibile (Wieringa-Jelsma T. și colab, 2006).

7.1.3. Concluzii parțiale

Pestivirusurile afectează un număr mare de specii, atât domestice cât și sălbatice, libere sau în captivitate, producând pierderi economice însemnate.

În vederea detecției infecției cu pestivirusuri la suinele domestice și sălbatice au fost prelevate următoarele probe de organe: splina, rinichii, tonsilele, limfonoduri limfatice, precum cele retrofaringiene, parotidiene, mandibulare sau mezenterice. Investigațiile s-au realizat pe un număr de 435 probe recoltate de la mistreți și 92 probe recoltate de la suinele domestice de pe teritoriul a trei județe din estul României: Iași, Vaslui și Bacău.

În urma testării probelor prin reacția rt-PCR cu primeri specifici pentru detecția tuturor pestivirusurilor au fost identificate ca pozitive un număr de 23 de probe, din care 12 recoltate de la mistreț și 11 recoltate de la porci domestici din exploatații neprofesionale.

În urma testării celor 23 de probe pozitive pentru pestivirus prin reacția rt-PCR cu primeri specifici pentru detecția virusului pestei porcine clasice toate probele au fost identificate ca fiind negative.

Investigațiile ulterioare având ca scop testarea probelor pozitive pentru pestivirusuri prin reacția rt-PCR utilizând primeri specifici pentru virusul diareei virale bovine – boala mucoaselor au pus în evidență detecția a 5 probe pozitive pentru VBDV1.

7.2. Caracterizarea genetică și analiza filogenetică a tulpinilor de pestivirus identificate

Pentru confirmarea produșilor PCR obținuți s-a realizat secvențierea fragmentelor amplificate. Secvențializarea necesită inițial o purificare a produsului

PCR, secvențializarea propriu-zisă, analiza rezultatelor secvențializării și în final analiza filogenetică.

7.2.1. Material și metode

S-au testat probele de origine suină (porc domestic și mistreț) pozitive, rezultate în urma testării prin PCR utilizând primeri comuni tuturor pestivirusurilor, recoltate de pe teritoriul județului Bacău și Iași.

Purificarea și cuantificarea produșilor PCR

Procesul de purificare directă a produsului PCR obținut s-a realizat cu ajutorul kitului Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). (fig 7.13.) Acest kit se utilizează în cazul în care produsul PCR este o bandă unică lipsită de apariția de benzi nespecifice.



Fig. 7.13. Kitul de purificare a produșilor PCR

Fig 7.13. PCR clean-up system

Metoda de lucru:

- dizolvarea gelului . După migrarea produșilor de amplificare (obținuți în urma testului PCR cu primeri specifici tuturor pestivirusurilor) la electroforeză, s-au excizat benzile de ADN cu ajutorul unei lame de unică folosință și s-au plasat în tuburi eppendorf de 1,5 ml și s-au cântărit la o balanță analitică.
- s-a adăugat 10 μ l Membrane Binding solution la 10 mg de gel cântărit. S-a adăugat un volum egal de Membrane Binding solution cu cantitatea de produs PCR cântărit.

- s-a vortexat și incubat la 50°C timp de 10 minute până la dizolvare completă.



Fig. 7.14. Termomixerul Eppendorf folosit pentru incubarea produșilor PCR
Fig. 7.14. Thermomixer Eppendorf used for incubating PCR products

- se introduce minicoloana (membrana) SV într-un tub colector, se depune produsul PCR pe membrană și se lasă la incubat timp de 1 minut la temperatura camerei.
- se centrifughează minicoloana SV la 14000 rpm timp de 1 minut, iar apoi filtratul se aruncă.
- se depun 700 μ l Soluție de spălare a membranei (diluată în prealabil cu etanol 95%) pe coloană, se centrifughează 1 minut la 14000 rpm, iar apoi filtratul se aruncă se aruncă filtratul.



Fig. 7.15. Adăugarea soluției de spălare
Fig. 7.15 The addition of wash solution

- se depun 500 μ l Soluție de spălare și se centrifughează coloana 5 minute la 14000 rpm, se aruncă filtratul și se centrifughează din nou 1 min la 14000 rpm.
- se transferă cu grijă minicoloana SV într-un tub steril de 1,5 ml. Se depun în centrul membranei 50 μ l apă lipsită de nucleaze, fără ca vârful pipetei să atingă coloana. Se lasă la incubat timp de 1 minut la temperatura camerei și apoi se centrifughează 1 minut la 14000 rpm.
- eluatul din tubul de 1,5 ml reprezintă ADN-ul purificat și se poate conserva la -20°C .

După purificare s-a calculat cantitatea de ADN ce urmează a fi folosită pentru secvențializare în funcție de lungimea secvenței de nucleotide. S-a realizat cuantificat concentrația de ADN cu ajutorul spectofotometrului (fig. 7.16.) și s-a realizat diluția cu apă DEPC pentru a se putea ajunge la concentrația specificată în protocolul kitului de secvențializare.



Fig. 7.16. Spectofotometru pentru cuantificarea concentrației de ADN

Fig. 7.16. Spectrophotometer for measuring DNA concentration

Secvențializarea produșilor PCR

Secvențializarea celor două catene complementare a produșilor PCR obținuți s-a realizat utilizând kitul GenomLab™ Methods Developing Kit - Dye Terminator Cycle sequencing (Beckman Coulter) (fig. 7.17.).



Fig 7.17. Kitul utilizat la secvențializarea produșilor PCR
Fig 7.17. PCR product sequencing kit used

Metoda de lucru:

- Prepararea premixului într-un tub steril de 1,5 ml (pentru o probă)
 - Tampon 10x 2 μ l
 - dNTP mix 1 μ l
 - ddUTP 2 μ l
 - ddGTP 1 μ l
 - ddCTP 2 μ l
 - ddATP 2 μ l
 - Polimeraza 1 μ l
- Pentru fiecare probă de ADN se depun într-un tub steril de 0,2 ml:
 - Premix 11 μ l
 - Primer specific 2 μ l
 - ADN 0,5 - 7 μ l (în funcție de concentrație)
 - H₂O până la 20 μ l
- Programarea pentru amplificare cu nucleotide marcate:

96°C	20 sec.	}	30 cicluri
50°C	20 sec.		
60°C	4 min.		
- Precipitarea cu etanol
- Într-un tub steril de 0,5 ml se depun 5 μ l soluție Stop/Glicogen peste care se adaugă cei 20 μ l produs de secvențializare și se agită viguros.

- Se adaugă 60 μ l etanol 95%/apă (v/v) rece, păstrat la -20°C , și se amestecă foarte bine. Se centrifughează imediat la 14000 rpm la 4°C timp de 15 minute. Se îndepărtează cu grijă supernatantul.
- Depozitul format se spală de două ori cu câte 200 μ l etanol 70%/apă (v/v) rece, păstrat la -20°C . Pentru fiecare spălare se centrifughează imediat la 14000 rpm la 4°C timp de 2 minute. După fiecare centrifugare se îndepărtează cu grijă supernatantul.
- Depozitul rămas se usucă în vacuum timp de 10 min.
- Proba se resuspendă în 40 μ l soluție de încărcare probă (Sample loading solution).
- Analiza secvențelor
 - Analiza rezultatelor produșilor PCR secvențializați s-a realizat cu un secvențializator automat CEQ™ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter).
 - Proba resuspendată se transferă în două godeuri alăturate din placa din polipropilenă a aparatului (fig. 7.18.)



Fig. 7.18. Secvențializatorul Beckman Coulter

Fig. 7.18. Beckman Coulter sequencing machine

- Peste probă se depune o picătură de ulei mineral (din kit)
- Se introduce placa cu probe în aparat
- Se selectează metoda dITP chemistry.

Analiza filogenetică a secvențelor obținute în urma secvențializării

Secvențele obținute sunt comparate cu cele existente în GenBank și EMBL utilizând programul BLAST de la NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

7.2.2. Rezultate și discuții

În vederea secvențierii dintre cele 23 ARN-uri pozitive la amplificarea prin reacția rt-PCR cu primeri panpestivirus au fost selectate șapte probe în vederea secvențierii. Criteriile de alegere a probelor au fost: specificitatea amplificării (existența a câtor mai puține benzi suplimentare la amplificare) și intensitatea benzii la migrare (repectiv concentrația de ADN a ampliconului). Din cei șapte ampliconi PCR selectați trei dintre ei fuseseră încadrați ca pozitivi la reacția rt-PCR cu primeri panpestivirus și cu primeri pentru VBVD1. Patru dintre produșii PCR selectați pentru secvențiere au fost doar pozitivi pentru genomul pestivirusurilor (pozitivi în reacția cu primeri panpestivirus).

Probele pozitive de origine suină (porc domestic și mistreț), rezultate în urma testării prin PCR utilizând primeri comuni tuturor pestivirusurilor, au fost încărcate într-un gel pentru migrarea produșilor de amplificare obținuți în vederea purificării acestora.

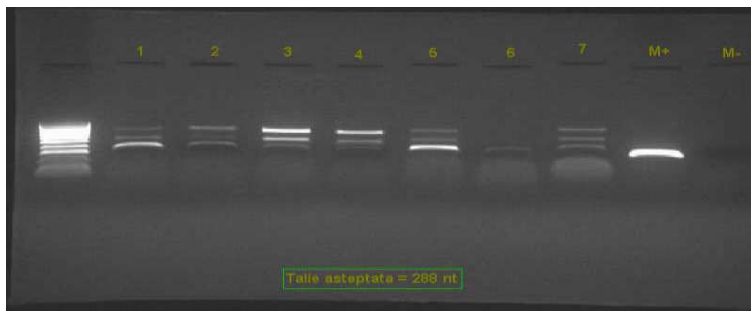


Fig. 7. 19. Probele pozitive selectate pentru secvențiere
(înainte de excizarea benzilor de ADN pentru procesul de purificare)

Fig. 7. 19. Positive samples selected for sequencing
(before excising bands for DNA purification)

Legendă: M - marker molecular de 100 bp, 1 – probă mistreț, 2 – probă porc domestic, 3 - probă mistreț, 4 - probă mistreț, 5 - probă mistreț, 6 – probă porc domestic, 7 – probă porc domestic, M+ (T.V. PPC dil 10-4, control pozitiv mix, M- (apa – control negativ mix),

După migrarea prin electroforeză orizontală a produșilor PCR selectați (obținuți în urma testului PCR cu primeri specifici tuturor pestivirusurilor) în gel de agaroză 1,5%, au fost excizate benzile de ADN caracteristice (cu talia așteptată de 288 pb) urmând procesul de purificare al acestora.

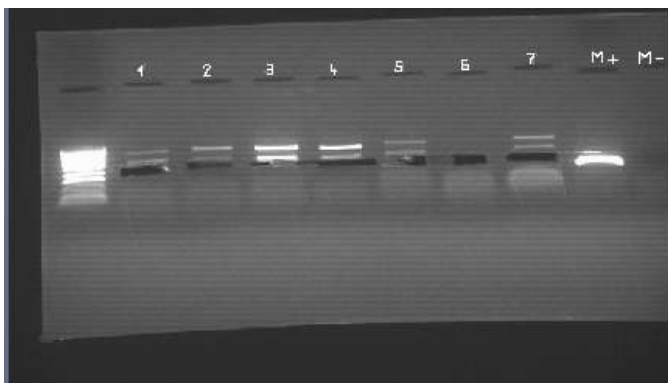


Fig. 7. 20. Probele pozitive selectate pentru secvențiere
(după excizarea benzilor de ADN pentru procesul de purificare)

Fig. 7. 20. Positive samples selected for sequencing
(after excising bands for DNA purification)

Legenda: M - marker molecular de 100 bp, 1 – probă mistret, 2 – probă porc domestic, 3 - probă mistret, 4 - probă mistret, 5 - probă mistret, 6– probă porc domestic, 7 – probă porc domestic, M+ (T.V. PPC dil 10-4, control pozitiv mix, M- (apa – control negativ mix)

Pentru probele purificate s-a realizat cuantificarea ADN-ului și reamplificarea în vederea secvențierii de tip Sanger. Secvențierea de tip Sanger a fost realizată pentru fiecare catenă în parte atât cu primerul panpestivirus forward 324 cât și cu primerul panpestivirus reverse 326.

	Project : Default	System : GenomeLab System	Operator : Manual analysis
	Sample : 2_F.B04_161206160Q	Instrument : GenomeLab System (Ver. 10.0.29)	
	Result : 2_F(USAMV)		

Base Sequence: 2_F(USAMV)

```

1  TGATCCCTGGTACCTCCCTTCTGTGGGTTAAGTGATCTGGTCATTAGCTGTGAACGTGTAGTAGTGTGCACAGACATA
81  GGACTTAGCAATCGCAGCGCATAGCCTGCTGATGAGCTGTGGTGTATGGCCAGCAGCTACAGCTGCTCATGTGCCTGGGA
161  ACTTGCTCATATGCCAGCGGCCCTAGAAAAGACAAAAGACAAAGAATAAATAAAAAATAAAATTAATAAAAA
241  CAGGGATGCATTACTCGCAATCCTGGACAGTACATGGCACATGGAGT

```

	Project : Default	System : GenomeLab System	Operator : Manual analysis
	Sample : 2_R.B05_16120617CL	Instrument : GenomeLab System (Ver. 10.0.29)	
	Result : 2_R(USAMV)		

Base Sequence: 2_R(USAMV)

```

1  ATGTCATGATCTGTAGAGTAATGAACCTAGTCTTCTTATTCTTTAATTTATTCTTCATTATATTTTGTGCTTT
81  TTGCTTTGTCTAGTGGCCGCTGGCATAATGGAAGCTTCCAGGCACATGGAGCTGTAGCTGCTGGCCTACACCACAGCCAC
161  AGCAGGCAATGCGGGATATCAAGCCATGTCTGTGACCTACACCACAGTTCACATGCAATGCCAGGTATCCTTAACCGCAT
241  CAGAGGGAGGCCAGTGGATCGAAACCATGTCTCTATGATGCTAGTCTCTACT

```

Fig. 7.21. Secvența 3'-5' și 5'-3' a produsului PCR 2 (probă porc domestic)

Fig. 7.21. Forward și reverse sequence of PCR product 2 (pig sample)

	Project : Default	System : GenomeLab System	Operator : Manual analysis
	Sample : 5_F.E04_161206160Q	Instrument : GenomeLab System (Ver. 10.0.29)	
	Result : 5_F(USAMV)		

Base Sequence: 5_F(USAMV)

```

1  TGCCCTATCTAGTAGGGTTAAGTGATCTAGGCATTAGCTCGTGAACGTAGTGTAGTAGCGTTCACAGACATGGACTTAGA
81  ATCGCACGCATTGCGCTGCTGTGAGCTGTGGTGTATGGCCAGCAGCATACAGCGTCCATGTGCCGTGGGAATCTGCGCAT
161  ATGCCAGCGGCCCTATGAAAGACAAAAGACAAAGAATATATAAATAAAAAATAAATTTATAAATAAAAAACAGG

```

	Project : Default	System : GenomeLab System	Operator : Manual analysis
	Sample : 5_R.E05_16120617CL	Instrument : GenomeLab System (Ver. 10.0.29)	
	Result : 5_R(USAMV)		

Base Sequence: 5_R(USAMV)

```

1  TTCITCAATTTTCATTCTTTCATATCTTATTTATTTATTTGTTCTTATTTTCGCTTTTCTAGTGGCCGCTGGCATATGGAA
81  GCTTACCCAGGCACATGGAAGCTGTAGCTGCTGGCCTACACCACAGCCACAGCAGGCAATGCGGGATTCAGCCATGTC
161  TGTGACCTACCCACAGTTCACAGCAATGCCAGTATCCTTAACCGCATCAGATGGGAGCCAGTGGATCGAAACCATGTC
241  CTCATGATGCTAGTCTCT

```

Fig. 7.22. Secvența 3'-5' și 5'-3' a produsului PCR 5 (probă mistreț)

Fig. 7.22. Forward și reverse sequence of PCR product 5 (wild boar sample)

Prin suprapunerea secvențelor 3'-5' și 5'-3' pentru fiecare produs PCR și introducerea secvențelor în programul de aliniere Clustal W alături de tulpini de VBVD1, au fost confirmate rezultatele reacției rt-PCR cu primeri specifici pentru VBVD1, în urma căreia produșii PCR 2 și 5 au format o ramură comună împreună cu tulpini de referință din Genbank.

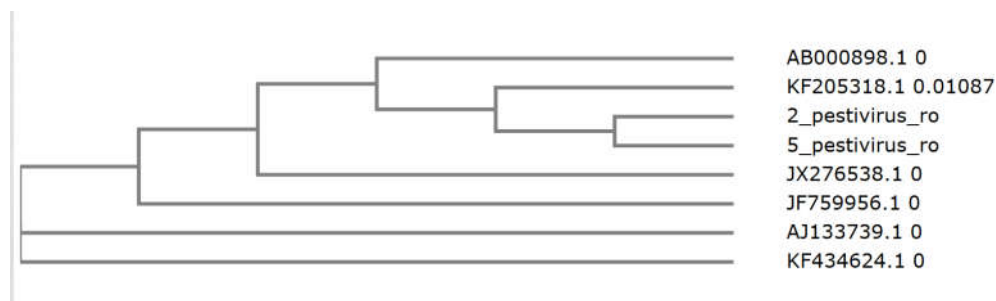


Fig. 7.23. Înrudirea tulpinilor de pestivirus izolate de la suidee și separarea într-o cladă separată a tulpinilor de VBVD1

Fig. 7.23. Filogeny of pestiviruses strains isolated from suidae and clade separation of BVDV1 strains

Prima raportare privind izolarea unui pestivirus necitopatogen al rumegătoarelor a fost descrisă de la o scroafă și la unii dintre purceii ei obținuți prin histerectomie și privați de colostru, neavând semne clinice de boală. Investigațiile au fost efectuate într-o fermă de suine unde, prin examen serologic fuseseră detectați anticorpi anti-VBVD. (Fernelius A.L. și colab., 1973)

Studii privind capacitatea de infecție a tulpinilor de VBVD au fost realizate prin infecții pe linii celulare cu diferite origini. Astfel, virusul diareei virale bovine-boala mucoaselor a fost capabil de a infecta celule de origine porcină și celule de bovine, în condiții naturale adecvate acest proces de adaptare este probabil să apară și *in vivo*. În cadrul investigațiilor Moening și colab. (1989) au cultivat un număr de 35 de tulpini de VBVD pe culturi celulare de origine bovină (rinichi), ovină (rinichi) și porcină (PK 15). Nici una dintre tulpinile de VBVD luate în studiu nu fuseseră anterior pasate în culturi celulare de origine porcină. Patru dintre tulpini de VBVD s-au dovedit a fi "specializate" doar pentru celulele de bovine, în timp ce restul s-au replicat cu o eficiență comparabilă atât pe celulele de origine bovină cât și ovină. În plus două dintre tulpinile de VBVD s-au replicat pe linia de celule PK15. Studii privind infecțiile cu pestivirusurile rumegătoarelor la suine au mai fost efectuate de Paton DJ și colab. (1992) în Anglia și de Frey HR și colab. (1995) în Germania. În 1997, Terpstra C. și Wensvoort G. descriu posibilitatea

infecției persistente congenitale cu tulpini non-citopatogene ale virusului diareei virale bovine-boala mucoaselor la porci. În cadrul acestui studiu este raportată infecția congenitală cu VBVD la porci, caracterizată prin viremie persistentă, excreția continuă a virusului, imunotoleranță pentru VBVD și absența oricăror semne clinice. Pestivirusurile rumegătoarelor sunt patogene pentru feteșii de porc, dar sunt în general considerate a fi relativ nepatogene pentru porci tineri sau adulți. (Le Potier MF și colab., 2006).

7.2.3. Concluzii parțiale

În vederea secvențierii, dintre cele 23 ARN-uri pozitive la amplificarea prin reacția rt-PCR cu primeri panpestivirus au fost selectați șapte ampliconi pozitivi: trei trei încadrați ca pozitivi la reacția rt-PCR cu primeri panpestivirus și cu primeri pentru VBVD1 iar doar patru produși PCR au fost pozitivi pentru genomul pestivirusurilor.

Secvențierea de tip Sanger a fost realizată pentru fiecare catenă în parte, atât cu primerul panpestivirus forward 324 cât și cu primerul panpestivirus reverse 326. În urma secvențierii, au fost obținute două secvențe valide: pentru ampliconii pozitivi 2 și 5.

Prin introducerea secvențelor în programul de aliniere Clustal W alături de tulpini de VBVD1, au fost confirmate rezultatele reacției rt-PCR cu primeri specifici pentru VBVD1, în urma căreia produșii PCR 2 și 5 au format o ramură comună împreună cu tulpini de referință din Genbank

Având în vedere datele precizate mai sus, rezultatele prezentate în acest studiu cu privire la investigațiile etiologice ale infecției cu pestivirusuri de la rumegătoare la suine domestice și mistreț susțin datele prezentate în literatura de specialitate și generează noi informații cu privire la prezența virusului în regiunea de est a României.

CAPITOLUL VIII

CONCLUZII FINALE

Rezultatele obținute în urma cercetărilor efectuate privind infecțiile cu pestivirusuri în zona de est a României, au permis formularea următoarelor concluzii finale:

- a. Investigațiile serologice privind pesta porcină clasică au fost efectuate în perioada 2007-2012 pe probe recoltate de la suine domestice provenite din exploatații profesionale și non-profesionale.
- b. Porcinele identificate ca fiind pozitive pentru Atc anti-VPPC relevă prezența seroconversiei față de virusul pestei porcine clasice în județele Iași, Suceava și Vaslui.
- c. În perioada 2007-2012, seropozitivitatea suinelor domestice este justificată prin inițierea campaniilor de vaccinare de urgență reglementate prin programul național de control al pestei porcine clasice pe teritoriul României.
- d. Ca urmare a faptului că în anul 2006 în România au fost tipizate 45 de tulpini de virusul pestei porcine clasice iar în anul 2007 au fost tipizate alte 39 de tulpini (tulpinile identificate aparțin genotipului 2.3- *Rostock*), în zonele endemice s-a inițiat vaccinarea de urgență ca un instrument important în eradicarea bolii. Investigațiile serologice efectuate la mitreți în cele trei județe din estul României (Vaslui, Iași și Suceava) reprezintă o metodă sensibilă și specifică pentru a detecta indirect infecția cu virusul pestei porcine clasice.
- e. Ca urmare a aplicării vaccinărilor contra pestei porcine la porcii domestici, începând cu anul 2007 până în 2010, se constată o reducere a circulației virusului și lipsa focarelor din anul 2008 până în prezent.
- f. În anul 2010 s-a continuat vaccinarea suinelor sălbatice contra pestei porcine clasice (mistreții fiind considerați sursă rezervor de infecție a porcilor domestici cu virusul PPC).
- g. În urma testării prin examen virusologic a probelor recoltate din exploatații non-profesionale, exploatații profesionale și de la mistreți din județele Vaslui, Suceava și Iași în perioada anilor 2007-2012 folosind reacția de imunofluorescență directă în vederea

- detecriei antigenelor virusului peștei porcine clasice, toate probele din județele Iași și Suceava au fost încadrate ca negative.
- h. În cadrul investigațiilor efectuate în anul 2007 pe probe provenite de la suine de pe teritoriul județului Vaslui, au fost identificate 5 probe pozitive și 2 dubioase recoltate de la porci din exploatații non-profesionale.
 - i. În zonele endemice pentru pestă porcină clasică în care exploatațiile non-profesionale sunt principalul sistem de creștere a suinelor, vaccinarea de urgență este un instrument important în eradicarea PPC. Acest lucru poate scurta perioada necesară pentru eradicarea bolii.
 - j. Prin urmare, diagnosticul peștei porcine clasice s-a concentrat pe studii epidemiologice prin examene virusologice (IFD și RT-PCR) în zonele în care au fost identificate animalele pozitive serologic.
 - k. Testările prin examen RT-PCR efectuate în perioada 2010-2012 pe probe de sânge pe EDTA și țesuturi recoltate de la suine domestice și sălbatice de pe teritoriul județelor Iași, Vaslui și Suceava a evidențiat absența decriei genomului virusului peștei porcine clasice, încadrând animalele testate ca fiind neinfectate sau nepurtătoare ale VPPC.
 - l. Pestivirusurile afectează un număr mare de specii, atât domestice cât și sălbatice, libere sau în captivitate, producând pierderi economice însemnate.
 - m. În vederea decriei infecției cu pestivirusuri la suinele domestice și sălbatice au fost prelevate următoarele probe de organe: splina, rinichii, tonsilele, limfonoduri limfatice, precum cele retrofaringiene, parotidiene, mandibulare sau mezenterice. Investigațiile s-au realizat pe un număr de 435 probe recoltate de la mistreți și 92 probe recoltate de la suinele domestice de pe teritoriul a trei județe din estul României: Iași, Vaslui și Bacău.
 - n. În urma testării probelor prin reacția rt-PCR cu primeri specifici pentru decria tuturor pestivirusurilor au fost identificate ca pozitive un număr de 23 de probe, din care 12 recoltate de la mistreț și 11 recoltate de la porci domestici din exploatații neprofesionale.
 - o. În urma testării celor 23 de probe pozitive pentru pestivirus prin reacția rt-PCR cu primeri specifici pentru decria virusului peștei porcine clasice toate probele au fost identificate ca fiind negative.

- p. Investigațiile ulterioare având ca scop testarea probelor pozitive pentru pestivirusuri prin reacția rt-PCR, utilizând primeri specifici pentru virusul diareei virale bovine – boala mucoaselor, au pus în evidență detecția a 5 probe pozitive pentru VBDV1
- q. În vederea secvențierii, dintre cele 23 ARN-uri pozitive la amplificarea prin reacția rt-PCR cu primeri panpestivirus au fost selectați șapte ampliconi pozitivi: trei încadrați ca pozitivi la reacția rt-PCR cu primeri panpestivirus și cu primeri pentru VBVD1, iar patru produși PCR au fost pozitivi doar pentru genomul (pan)pestivirusurilor, ceea ce sugerează posibilitatea infecției cu un alt pestivirus (ex. BD).
- r. Secvențierea de tip Sanger a fost realizată pentru fiecare catenă în parte, atât cu primerul panpestivirus forward 324 cât și cu primerul panpestivirus reverse 326. În urma secvențierii au fost obținute două secvențe valide: pentru ampliconii pozitivi 2 și 5.
- s. Prin introducerea secvențelor în programul de aliniere Clustal W alături de tulpini de VBVD1, au fost confirmate rezultatele reacției rt-PCR cu primeri specifici pentru VBVD1, în urma căreia produșii PCR 2 și 5 au format o ramură comună împreună cu tulpini de referință din Genbank.
- t. Având în vedere datele precizate mai sus, rezultatele prezentate în acest studiu cu privire la investigațiile etiologice ale infecției cu pestivirusuri de la rumegătoare la suine domestice și mistreț susțin datele prezentate în literatura de specialitate și generează noi informații cu privire la prezența pestivirusurilor în regiunea de est a României.

CHAPTER VIII

FINAL CONCLUSIONS

The results obtained after carrying out research regarding infections with pestiviruses in eastern Romania, allowed the formulation of the following final conclusions:

- a. Serological investigations for classical swine fever were carried out during 2007-2012 on gathered samples from domestic swine originated from professional and non-professional exploitations.
- b. The positive pigs for antibodies against-VPNC registered seroconversion with classical swine fever virus in the counties of Iași, Suceava and Vaslui.
- c. During 2007-2012 the seropositivity of domestic swine is justified through the initiation of campaigns of emergency vaccination regulated through the national program of control for the classical swine fever throughout Romania.
- d. As a consequence of the fact that in 2006 in Romania were classified 45 strains of the classical swine fever virus, and in 2007 another 39 strains (the identified strains belong to the genotype 2.3- *Rostock*), emergency vaccination was initiated in the endemic areas being an important instrument in the eradication of the disease. The serological investigations that were carried out in boars in 3 counties from eastern Romania (Vaslui, Iași and Suceava) represent a sensitive and specific method in order to indirectly detect the infection with the classical swine fever virus.
- e. As a consequence of the vaccination of domestic pigs against swine fever starting with 2007 until 2010, it was noticed a reduction of the virus circulation and the lack of focal points from 2008 up to now.
- f. In 2010 vaccination against classical swine fever of wild swine continued (the boars being considered a reservoir source of infection for the domestic pigs with PPC virus).
- g. After testing through virological exam of the samples gathered from non-professional exploitations, professional exploitations and from

boars from Suceava and Iași counties, during 2007-2012, by direct immunofluorescence (for the detection of the virus's antigens of classical swine fever), all the samples from Iași and Suceava counties were framed as negative.

- h. The investigations carried out in 2007 on samples gathered from swine throughout Vaslui county lead to the identification of 5 positive samples and 2 questionable ones gathered from pigs from non-professional exploitations.
- i. In the endemic areas for the classical swine fever in which the non-professional exploitations are the main system of swine growing, the emergency vaccination is an important instrument in the eradication of PPC. This approach can shorten the necessary period for the disease eradication.
- j. Thus, the classical swine fever diagnostic was focused on epidemiological studies through virological exams (IFD and RT-PCR) in the areas in which serologically positive animals were identified.
- k. RT-PCR test carried out between 2010 and 2012 on blood samples on EDTA and tissues gathered from domestic and wild swine highlighted the absence of virus's genome of the classical swine fever, framing the tested animals as being non-infected or non-carriers of VPPC in Iași, Vaslui and Suceava counties.
- l. Pestiviruses affect a great number of species, not only domestic but also wild, free or in captivity, producing great economic losses.
- m. For the detection of pestiviruses infection in domestic and wild swine, the following organs are sampled: spleen, kidneys, tonsils, lymphatic lymph nodes, as the retro pharynx ones, parotid ones, mandibular or mesenteric. The investigations were carried out on 435 samples collected from boars and 92 samples collected from domestic swine from 3 counties: Iași, Vaslui and Bacau.
- n. After testing the samples by rt-PCR with specific primers for the detection of all pestiviruses, there were identified 23 positive samples, out of which 12 collected from boar and 11 from domestic pigs from non-professional exploitations.
- o. After testing the 23 positive samples for the Pestivirus through rt-PCR, using specific primers for the detection of classical swine fever virus, all samples were negative.
- p. The subsequent investigations of the positive samples for pestiviruses through rt-PCR for viral bovine diarrhoea– the mucous

disease virus, highlighted the detection of 5 positive samples for VBDV1.

- q. Among the 23 samples tested positive after the rt-PCR reaction using pan-Pestivirus primers, 7 amplicons were sequenced: 3 tested as positive after rt-PCR reaction with pan-Pestivirus primers and with primers for VBVD1, and 4 PCR products were positive only for the pestiviruses genome.
- r. Sanger sequencing was carried out for each chain in part, not only with the pan-Pestivirus primer forward 324 but also with pan-Pestivirus reverse primer 326. After sequencing there were obtained 2 valid sequences: for positive amplicons 2 & 5.
- s. The alignment of sequences in Clustal W program together with strains of VBVD1, confirmed the rt-PCR results with specific primers for VBVD1, observing that PCR products 2 and 5 formed a common branch together with reference strains from Genbank.
- t. Taking into consideration the above mentioned data, the etiological investigations of the infection with pestiviruses in ruminants, domestic swine and boar presented in this study, sustain the existent data from the scientific literature and generate new information in relation with the presence of the virus in eastern Romania.

BIBLIOGRAFIE REFERENCES

1. Arnal M., Fernandez-de-Luco D., Riba L., Maley M., Gilray J., Willoughby K., Vilcek S., Nettleton P.F. 2004. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). J Gen Virol 85: 3653-3657.
2. Aoki H. Aoki, K. Ishikawa, Y. Sakoda, H. Sekiguchi, M. Kodama, S. Suzuki, A. Fukusho (2001). Characterization of classical swine fever virus associated with defective interfering particles containing a cytopathogenic subgenomic RNA isolated from wild boar. J. Vet. Med. Sci., 63, pp. 751–758
3. Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.J., Becher P. 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. Virology, 286: 446-456.
4. Bartak P., I. Greiser-Wilke (2000). Genetic typing of classical swine fever virus isolates from the territory of the Czech Republic. Vet. Microbiol., 77, pp. 59–70.
5. Baxi M., McRae D., Baxi S., Greiser-Wilke I., Vilcek S., Amoako K., Deregts D. (2006). A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. Vet Microbiol 116, 37-44.
6. Becher P., R. Avalos Ramirez, M. Orlich, S. Cedillo Rosales, M. König, M. Schweizer, H. Stalder, H. Schirmer, H.J. Thiel. 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. Virology, 311: 96–104.
7. Becher P., Orlich M., Kosmidou A., König M., Baroth M., Thiel H.J. 1999. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. Virology 262: 64-71
8. Beer M, Goller KV, Staubach C, Blome S. 2015. Genetic variability and distribution of Classical swine fever virus. Anim Health Res Rev. 16(1):33-39.
9. Biagetti M., I. Greiser-Wilke, D. Rutigliano (2001). Molecular epidemiology of classical swine fever in Italy. Vet. Microbiol., 83, pp. 205–215.
10. Bolin SR, McClurkin AW, Cutlip RC, Coria MF. (1985). Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. Am J Vet Res 46:573-576.

11. Brackenbury L.S., Carr B.V., Charleston B. (2003). Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV, *Vet. Microbiol.* 96:337–344.
12. Carlsson U. 1991. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *The Veterinary Record*, 128: 145-147.
13. Chase C.C.L., Elmowalid G., Yousif A.A.A. (2004). The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20:95–114.
14. Cranwell MP, Otter A, Errington J, Hogg RA, Wakeley P, Sandvik T 2007. Detection of border disease virus in cattle. *Vet. Record*, 161: 211-212.
Collett M S et al (1988) Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: The genomic organisation of a pestivirus. *Virology*, 165(1), 200-208.
15. Dahle J, Liess B. 1992. A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp Immun Microbiol Infect Dis.*15:3:203–211.
16. De Smit A.J., Eble P.L., Kluijver de E.P., Bloemraad M., Bouma A. 2000. Laboratory experience during the classical swine fever virus epizootic in the Netherlands in 1997–1998. *Vet Microbiol.* 73: 197–208.
17. Dubois E., Russo P., Prigent M., Thiéry R. 2008. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet Microbiol* 130: 69-79.
18. Edwards S., Fukusho A., Lefe PC, Lipowski A., , Pejsak Z., Roehe P., Westergaard J., 2000. Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol*, 73(2-3):103-19.
19. Elbers A.R.W., Vos J.H., Bouma A., van Exel A. C.A., Stegeman A., 2003: Assessment of the use of gross lesions at post-mortem to detect outbreaks of classical swine fever. *Vet. Microbiol.* 96:, 345-356.
20. Entrican G, Dand A, Nettleton PF. 1994. A double monoclonal-antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet Microbiol* 43: 65-74.
21. Evermann JF , 2006. Pestiviral infection of llamas and alpacas. *Small Ruminant Res.* 61: 201-206.
22. Ferrer L.M, García de Jalón J., De las Heras M., 2002, *Atlas de Patología Ovina*, ISBN:978-84-932921-1-9.
23. Fernández-Sainz I., Holinka L.G., Gladue D., O'Donnell V., Lu Z., Gavrillov B.K.,

- Risatti G.R., Borca M.V. 2011. Substitution of specific cysteine residues in the E1 glycoprotein of classical swine fever virus strain Brescia affects formation of E1-E2 heterodimers and alters virulence in swine. *J. Virol.* 85: 7264–7272.
24. Fernandez-Sainz I., Holinka L.G., Gavrilov B.K., Prarat M.V., Gladue D., Lu Z., Jia W., Risatti G.R., Borca M.V. 2009. Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of classical swine fever virus strain Brescia alters virulence in swine. *Virology* 386: 210–216.
25. Fernelius A.L., Amtower W.C., Lambert G., McClurkin A.W. & Matthews P.J. 1973, Bovine viral diarrhea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Can. J. comp. Med.*, 37, 13-20.
26. Fevre E.M., Bronsvoort B.M.C., Hamilton K.A., Cleaveland S. 2006. Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends in microbiology (Regular ed.)* 14, no. 3: 125-31.
27. Floegel, G., A. Wehrend, K.R. Depner, J. Fritzemeier, D. Waberski, V. Moennig, 2000. Detection of classical swine fever virus in semen of infected boars. *Vet Microbiol.* 77(1-2): 109-16.
28. Flores EF, Kreutz LC, Donis RO (1996). *Journal of General Virology*, 77, 1295-1303.
29. Frey H.R., Roder B., Depner K., Liess B., 1995. Epidemiological characterization of a pestivirus isolate from a viremic pig out of a mixed pig cattle herd. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 102, 181–183.
30. Fritzemeier, J. et al., 2000. Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol.* 77(1-2): 29-41.
31. Fulton RW, Saliki JT, Confer AW et al (2000). Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest* 12:33-38.
32. Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT et al. (2002) Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can J Vet Res* 66:181- 190.
33. Gatto I.R.H., Almeida H.M.S., Leite A.I., Silva G.C.P., Medeiros A.S.R., Oliveira M.E.F., Dutra I.S., Samara S.I., Oliveira L.G. 2014. Occurrence of ruminant pestivirus infection in pigs from small farms of the Mossoró city - Rio Grande do Norte, Brazil. In: *Proceedings of 23rd IPVS Congress, Cancun, Mexico*: 329.
34. van Gennip H.G.P, Hesselink T., Moormann J.M., Hulst M. 2005. Dimerisation of glycoprotein Erns of classical swine fever virus is not

- essential for viral replication and infection. *Archives of Virology*, 150(11): 2271–2286.
35. Giammarioli M, La Rocca SA, Steinbach F, Casciari C, De Mia GM. 2011. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Vet Microbiology*, 147: 231-236.
 36. Goyal SM, 2005. Diagnosis. In: *Bovine viral diarrhea virus: diagnosis, management, and control*, ed. Goyal SM, Ridpath JF, 1st ed., pp. 197–208. Blackwell, Ames, IA
 37. Greiser-Wilke I., Depner K., Fritzemeier J., Haas L., Moennig V. 1998. Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany. *J Virol Methods* 75: 141–150.
 38. Greiser-Wilke I., Zimmermann B., Fritzemeier J., Floegel G., Moennig, V. 2000. Structure and presentation of a World Wide Web database of CSF virus isolates held at the EU reference laboratory. *Vet Microbiol* 73:131–136.
 39. Greiser-Wilke I., Dreier S., Haas L., Zimmermann B. 2006. Genetic typing of classical swine fever viruses – a review. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 113:134–138.
 40. Grøndahl C, Uttenthal Å, Houe H, Rasmussen TB, Hoyer MJ, Larsen LE. 2003. Characterisation of a pestivirus isolated from persistently infected mousedeer (*Tragulus javanicus*). *Archives of Virology*, 148(8):1455-1463.
 41. Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Schirrmeier H., Depner K. (2005). Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 130, 36-44.
 42. Hughes L.E., Kershaw G.F. (1959): "B" or Border disease, an undescribed disease of sheep. *Veterinary Record*, 71, 313–317.
 43. Hulst M.M., Himes G., Newbiggin E., Moormann, R.J. 1994. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: Expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, 200: 558–565.
 44. Jemersic L. Jemersic, I. Greiser-Wilke, D. Barlic-Maganja, M. Lojkic, J. Madic, S. Terzic, J. Grom (2003). Genetic typing of recent classical swine fever virus isolates from Croatia. *Vet. Microbiol.*, 96, pp. 25–33.
 45. Ji W., Guo Z., Ding N., He C., 2015. Studying classical swine fever virus: Making the best of a bad virus. *Virus Res.* 197: 35–47.
 46. Kaden V., Lange E., Polster U., Klopffleisch R., Teifke J. P. 2004. Studies on the virulence of two field isolates of the classical swine fever virus genotype 2.3 Rostock in wild boars of different age groups. *J Vet*

- Med B Infect Dis Vet Public Health 51: 202–208.
47. Kirkland P.D., Frost M.J., Finlaison D.S., King K.R., Ridpath J.F., Gu X. 2007. Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: A possible new species of pestivirus. *Virus Res* 129: 26-34.
48. Kramer-Schadt S., N. Fernandez and H.H. Thulke 2007. Potential ecological and epidemiological factors affecting the persistence of classical swine fever in wild boar *Sus scrofa* populations. *Mammal rev.* 37:1-20.
49. Laddomada A. (2000). Incidence and control of CSFV in wild boar in Europe *Vet. Microbiol.*, 73, pp. 121–130.
50. Lackner, T., et al., 2005. Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol.*, 79(15): 9746-55.
51. Lenihan P., Collery P. 1976. Bovine viral diarrhoea infection in pigs in Ireland: A serological survey and an epidemiological study. In: CEC/FAO Seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever, edited by B. Liess, Hannover, 314–332.
52. Leifer I., Ruggli N., Blome S. 2013 Approaches to define the viral genetic basis of classical swine fever virus virulence. *Virology* , 438: 51–55.
53. Letellier C, Kerkhofs P. 2003. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. *J Virol Methods.* 114:21–27.
54. Liess B., Moennig V. 1990. Ruminant pestivirus infection in pigs. *Rev Sci Tech* 9, 151-161.
55. Lin M., McRae H., Dan H., Tangorra E., Laverdiere A., Pasick J. 2010. High-resolution epitope mapping for monoclonal antibodies to the structural protein E^{rns} of classical swine fever virus using peptide array and random peptide phage display approaches. *J. Gen. Virol.*, 91: 2928–2940.
56. Lindenbach BD, et al. 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication, p 1101–1152 In Knipe DM, Howley PM, Fields virology, ed. 5, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
57. Liu L, Xia H, Wahlberg N, Belák S, C. Baule, 2009. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology.* Mar 15;385(2):351-357.
58. Liu L., Widén F., Baule C., Belák S. 2007. A one-step, gel-based RT-PCR assay with comparable performance to real-time RT-PCR for detection of classical swine fever virus. *J Virol Methods* 139: 203-207.

59. Lipowski A. (2014). Serological study on bovine viral diarrhoea virus infection in pig population in Poland between 2008 and 2011. *Bull Vet Inst Pulawy* 58, 363-368.
60. Loeffen W.L.A., Beuningen van A., Quak S., Elbers A.R.W. 2009. Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population. *Vet Microbiol*, 136: 240–245.
61. Loneragan GH, Thomson DU, Montgomery DL et al: 2005, Prevalence, outcome, and health consequences associated with persistent infection with bovine viral diarrhea virus in feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 226:595-601.
62. Moennig V. 1989. Pestiviruses — a new group. First Congress of the Eur Soc. for Vet. Virology, Liège, Belgium, *Vet. Microbiol*.
63. Moennig V., P.G. Plagemann, 1992, The pestiviruses. *Adv Virus Res*, 41: 53-98.
64. Moennig V., Bolin S. R., Mateo A., Kelso-Gourley N., Grieserwilke I. Liess B. 1988. Identification of a single receptor for bovine viral diarrhea virus (BVDV) on the surface of cultured cells. Annual Meeting of the American Society of Microbiology, Miami Beach, Florida, USA, no. 326
65. Moennig V. 2000. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet Microbiol* 73: 93-102.
66. Moennig V., Floegel-Niesmann G., Greiser-Wilke I., 2003. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J*, 165(1): 11-20.
67. de las Mulas, J.M., et al. 1997. Immunohistochemical detection of hog cholera viral glycoprotein 55 in paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest*. 9(1): 10-16.
68. Nettleton P.F., Gilray J.A., Russo P., Dlissi E. 1998) Border disease of sheep and goats. *Veterinary Research*, 29: 327–340.
69. Oguzoglu TC, Floegel-Niesmann G, Frey H-R, Moennig V. 2001. Zur differentialdiagnostik klassische schweinepest/border disease: seroepidemiologische untersuchung einer pestivirusinfektion auf einem schaf- und schweinehaltenden. betrieb. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108, 5: 210-213.
70. Oguzoglu T.C., Tan M.T., Toplu N., Demir A.B., Bilge-Dagalp S., Karaoglu T., Ozkul A., Alkan F., Burgu I., Haas L., Greiser-Wilke I. (2009). Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup? *Vet Microbiol*, 135(3-4):374-9.
71. Ophuis R.J., Morrissy C.J., Boyle, D.B. (2006). Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a

- real time RT-PCR assay. *J Virol Methods* 131, 78-85.
72. Passler T, Walz PH. 2010. Bovine viral diarrhea virus infections in heterologous species. *Anim. Health Res. Rev.*, 11: 191-205.
 73. Paton D.J., Simpson V., Done S.H., 1992. Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Vet. Rec.* 131, 185–188.
 74. Paton D.J. 2002. The reappearance of classical swine fever in England in 2000, *Trends in Emerging viral Infections of Swine*
 75. Paton D.J., Greiser -Wilke, I. 2003. Classical swine fever -an update. *Research in Veterinary Science* 75,. 3: 169.
 76. Pauly, T., et al., 1998. Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J Gen Virol*, 79 (Pt 1): 31-40.
 77. Pellerin C., van den Hurk J., Lecomte J. Tussen P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*,203:260-268.
 78. Perianu T. și col. 2012. *Tratat de Boli Infecțioase ale Animalelor*, vol II *Viroze și Boli prionice*, Ed. Universitas XXI, Iași, ISBN: 978-606-538-084-4.
 79. Pol F., Rossi S., Mesplede A., Kuntz-Simon G., Le Potier M. F. 2008. Two outbreaks of classical swine fever in wild boar in France. *Vet Rec* 162: 811–816.
 80. Le Potier M.F., Mesplède AVannier., P. 2006. Classical swine fever and other Pestiviruses B.E. Straw, J.E. Zimmerman, S. D'Allaire, D.J. Taylor (Ed), *Diseases of Swine*, Blackwell Publishing Ames, Iowa, USA. 309–322.
 81. Rasmussen TB, Reimann I, Uttenthal A, Leifer I, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. 2010. Generation of recombinant pestiviruses using a full-genome amplification strategy. *Veterinary Microbiology*, 142: 13-17.
 82. Răpunțean G., Răpunțean S. 2014. *Virusologie veterinară specială*. Ed Colorama, Cluj-Napoca, ISBN 606936847-9.
 83. Ridpath J.F., Bolin S.R., Dubovi E.J. 1994 Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*, 205: 66-74.
 84. Ridpath J.F. (2015). Emerging pestiviruses infecting domestic and wildlife hosts. *Animal Health Research Reviews* 16(1); 55–59.
 85. van G.J Rijn P.A., Wellenberg., Hakze-van der Honing R., Jacobs L., Moonen P.L., Feitsma H. (2004). Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative RealTime PCR technology. *J Virol Methods* 120, 151-160.

86. Risatti G.R., Callahan J.D., Nelson W.M., Borca M.V. (2003). Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 41, 500-505.
87. Risatti G., Holinka L., Lu Z., Kutish G., Tulman E., French R., Sur J., Rock D., Borca M., 2005. Mutation of E1 glycoprotein of classical swine fever virus affects viral virulence in swine. *Virology*, 343:116–127.
88. von Ruden S, Staubach C., Kaden V., RG Hess, Julia Blincke, Sabine Kuhne, Jana Sonnenburg, A. Frohlich, J. Teuffert, V. Moening 2008. Retrospective analysis of oral immunisation of wild boar populatrion against classical swine fever virus in region Eifel of Rhineland-Palatinate. *Vet Microbiol.* 25;132(1-2):29-38.
89. Rush D. M., Thurmond M. C., Munoz-Zanzi C.A., Hietala S. K. 2001. Descriptive epidemiology of postnatal bovine viral diarrhea virus infection in intensively managed dairy heifers. *J Am Vet Med Assoc* 219: 1426-31.
90. Sainz I.F., Holinka L.G., Lu Z., Risatti G.R., Borca M.V. 2008. Removal of a N-linked glycosylation site of classical swine fever virus strain Brescia E glycoprotein affects virulence in swine. *Virology* 370:122–129.
91. Savuța G. 2007. Epidemiologie veterinară generală, Ed. PIM, Iași.
92. Schirrmeier H, Strebelow G, Depner K, Hoffmann B, Beer M, 2004. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J Gen Virol.*85(12): 3647-3652.
93. Schirrmeier H, Depner K, Strebelow G, Buettner M . 1999. Border disease antibodies in German pig herds. In: Report of the Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories, Ploufragan, Commission of the European Community, Brussels, 60–62.
94. Schweizer M, Peterhans E. (2014) Pestiviruses. *Annu Rev Anim Biosci.* Feb;2:141-63.
95. Shannon AD, Richards SG, Kirkland PD, Moyle A. 1991. An antigen capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J Virol Methods*;34:1–12.
96. Snowdon W.A . French E.L. (1976). The role of mucosal disease virus in the epizootiology and control of swine fever. In *Diagnosis and epizootiology of classical swine fever* (J.G. van Bakkum, ed.). Seminar, Amsterdam, 30 April-2 May 1975. EEC Publ., Luxemburg, 159-183.
97. Ståhl K., Kampa J., Alenius S., Persson Wadman A., Baule C., Aiumlamai S., Belák S. 2007. Natural infection of cattle with an atypical

- 'HoBi'-like pestivirus—implications for BVD control and for the safety of biological products. *Vet Res* 38:517-523.
98. Stalder H.P., Meier P., Pfaffen G., Wageck-Canal C., Rüfenacht J., Schaller P., Bachofen C., Marti S., Vogt H.R., Peterhans E. 2005. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev Vet Med* 72: 37-41.
 99. Tarradas J, de la Torre ME, Rosell R, Perez LJ, Pujols J, Muñoz M, Muñoz I, Muñoz S, Abad X, Domingo M, Fraile L, Ganges L., 2014. The impact of CSFV on the immune response to control infection. *Virus Res* 185:82–91.
 100. Terpstra C., Wensvoort G. 1988. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. vet. Sci.*, 45: 137-142.
 101. Terpstra C., Wensvoort G. 1997. A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: clinical, virological and immunological observations. *Vet Quart*; 19: 97-101.
 102. Tews B.A., Schürmann E.M., Meyers G. 2009. Mutation of cysteine 171 of pestivirus E RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus. *J. Virol.* 83: 4823–4834.
 103. Thabti F., Letellier C., Hammami S., Pépin M., Ribièrè M., Mesplède A., Kerkhofs P., Russo P. 2005. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch Virol* 150: 215-229.
 104. Thiel H-J, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, Purcell RH and Rice CM 2005. Flaviviridae. In: virus taxonomy. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., ed. Elsevier Academic Press, 981-998.
 105. Vilcek S, Belák S. 1996. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods.* 60(1):103-8.
 106. Vilcek S., Nettleton P.F. 2006. Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol* 116:1-12.
 107. Vilcek S., Paton D.J., Durkovic B., Strojny L., Ibata G., Moussa A., Loitsch A., Rossmanith W., Vega S., Scicluna M.T., Palfi V. 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.*, 146: 99–115.
 108. Vilcek S., Ridpath J.F., Van Campen H., Cavender J.L., Warg J. 2005. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res* 108: 187-193.
 109. Wang X., Tu C., Li H., Jin K., Xuan H., Chang G., Sun H., Zhu W., Fei

- E., Yin Z. 1996. Detection and isolation of bovine viral diarrhea virus from classical swine fever suspected pigs. *Chin J Vet Sci* 16, 341–345.
110. Weiland E., Stark R., Haas, B., Rümenapf, T., Meyers, G., Thiel, H.J. 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disul de-linked heterodimer. *J. Virol.*, 64: 3563–3569.
111. Wensvoort G., Terpstra C., de Kluyver E.P. 1989. Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization. *Vet. Microbiol.*, 20: 291–306.
112. Wieringa-Jelsma T., Quak S., Loeffen W.L. (2006). Limited BVDV transmission and full protection against CSFV transmission in pigs experimentally infected with BVDV type 1b. *Vet. Microbiol.*, 118, pp. 26–36.
113. Willoughby K., Valdazo-González B., Maley M., Gilray J., Nettleton P.F. (2006). Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J Virol Methods* 132, 187-194.
114. Zhao J.J., Cheng D., Li N., Sun Y., Shi Z., Zhu Q.H., Tu C., Tong G.Z., Qiu H.J. (2008). Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 126, 1-10.

- <http://www.cfsph.iastate.edu>
- [http://www.expasy.ch/viralzone/all by protein/39.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all%20by%20protein/39.html)
- <http://www.oie.int>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ANEXA 1. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

În calitate de prim autor:

1. **Emilia ION (POPA)**, Adriana ANIȚĂ, Gheorghe SAVUȚA, 2013 – *Epidemiological investigations on classical swine fever evolution in pigs and wild boars in Iași county*, Lucrări Științifice Medicină veterinară Iași, vol. 56 p:442-446.
2. **Emilia ION (POPA)**, Adriana ANIȚĂ, Gheorghe SAVUȚA, 2013 - *Classical swine fever virological surveillance on wild boars in Suceava county*, Lucrări Științifice Medicină veterinară Iași, vol. 56 p:447-450.
3. **Emilia ION (POPA)**, Adriana ANIȚĂ, Gheorghe SAVUȚA, 2015 - *Epidemiologic study on bluetongue virus circulation among domestic ruminants during 2014-2015 in Romania*, Lucrări Științifice Medicină veterinară Iași, vol. 58 p:566-568.
4. **Emilia ION (POPA)**, Elena IȘAN, 2015 – *The incidence of GMO soy and corn feed and food*, Lucrări Științifice Medicină veterinară Iași, vol. 58 p:374-379.

