

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 exacerbării 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 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 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. Anticorpilor 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 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).

Bovine 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 și 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-VPPC 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-VPPC 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-VPPC.

Primul subcapitol prezintă pe larg o anchetă seroepidemiologică pentru a determina prevalența anticorpilor specifici anti-VPPC 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-VPPC în anul 2007 relevă prezența seroconversiei față de virusul pestei porcine clasice în județele Iași, Suceava și Vaslui.

În perioada 2008-2012 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-VPPC 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-VPPC 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 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 împotriva pestei porcine clasice (mistreții fiind considerați sursă rezorvor de infecție pentru porcii domestici).

Capitolul VI, intitulat „**Cercetări privind detecția virusului pestei porcine clasice**” a avut ca obiectiv investigații privind detecția virusului pestei porcine clasice utilizând reacția de imunofluorescență directă și tehnici de biologie moleculară. Cercetarile 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 pestei porcine clasice.

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

Tehnicile PCR folosite pentru diagnosticul pestei 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^{rns} negative) de cele infectate (E^{rns} 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^{rns} 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^{rns} 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.