

**CONTRACTOR**

**Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară  
"Ion Ionescu de la Brad" Iași**

Programul:	<b>RESURSE UMANE</b>
Tipul proiectului:	<b>Proiecte de cercetare postdoctorala</b>
Cod proiect:	<b>PD-375, Contract de finanțare 200/2010</b>

VALOARE TOTALĂ contract / an 170 000 lei  
ETAPA (din Anexa II) unică 2011  
VALOARE FAZA 170 000 lei

**SINTEZA LUCRĂRII**

Sinteza lucrării proiectului de cercetare PD cod proiect PD-375, titlul proiectului "*Cercetări epidemiologice și de biologie moleculară privind infecțiile cu arterivirusuri la suine și evine în estul României*", director proiect Asistent univ.dr. Tănase Irina-Oana.

<b>An</b>	<b>Etapa</b>	<b>Obiective</b>	<b>Activități</b>
2011	Unică	1. Ancheta seroepidemiologică privind prevalența infecției cu arterivirus la ecvinele din Estul României	1.1. Prelevarea probelor biologice de la ecvine cu condiționarea și stocarea acestora
			1.2 Estimarea seroprevalenței infecției în populația de ecvine
		2. Evidențierea prezentei infecției cu arterivirus la ecvinele și suinele din Estul României	2.1 Prelevare probe biologice din fermele de suine și evidențierea prezentei virusului folosind metodele clasice de diagnostic de laborator
			2.2 Estimarea seroprevalenței infecției la porcinele salbatice
			2.3 Prelevare probe de sânge și secreții de la ecvine și evidențierea prezentei virusului folosind metodele clasice de diagnostic de laborator
		3. Identificarea virusului sindromului respirator și de reproducție porcine prin tehnici de biologie moleculară	3.1. Conceperea și testarea unui protocol de detecție a virusului în secreții (sperma) și organe (pulmon, trahee, limfonoduri traheobronșice)
			3.2. Detecția virusului respirator și de reproducție porcine prin tehnici de biologie moleculară
			3.3. Identificarea, caracterizarea moleculară și încadrarea filogenetică a tulpinilor virale identificate

În anul 2011, în cadrul etapei unice a proiectului au fost efectuate studii privind infecțiile cu arterivirusuri la porcine dar și la ecvine. Ambele entități morbide sunt produse de virusuri aparținând genului *Arterivirus*, capabile să producă infecții asimptomatice persistente gazdelor lor naturale, în anumite circumstanțe, sau infecții evolutive clinic, grave, în alte circumstanțe.

În organismul gazdelor primele celule care se infectează sunt macrofagele, dar, ulterior infecția cuprinde și alte structuri tisulare, având afinitate deosebită pentru endoteliul micilor artere. Transmiterea infecției se face prin contact direct (inclusiv cel sexual), dar și prin aerosoli sau pulberi contaminate.

Arterita virală a ecvinelor a devenit în ultimele două decenii, o boală ce nu mai poate fi ignorată. Îngrijorarea pe care a produs-o în rândul țărilor din Europa și din lume pericolul pe care acesta îl reprezintă, a determinat includerea ei în normele și standardele oficiale ale Oficiului Internațional de Epizootii (OIE) și în normele legislative (directivele) Uniunii Europene care reglementează circulația intracomunitară și în țări terțe a ecvideelor.

Importanța economică a acestei boli, constă în primul rând în pierderile materiale ce survin consecutiv impunerii de restricții severe asupra circulației internaționale a ecvideelor, a importului și exportului la nivel mondial, în special a cabalinelor de mare valoare, pierderilor din sfera reproducției prin numărul mare de avorturi și moartea mânjilor la puțin timp după naștere.

Ca în multe alte țări din lume și din Europa, și în România arterita virală ecvină este din păcate, foarte răspândită, afectând în special cabalinele din rase pure ori specializate, și în mai mică măsură pe cele din gospodăriile populației, care în cea mai mare parte reprezintă un amestec de linii locale cu o parte sânge din anumite rase. Fără a face excepție de la regulă, și în România această boală este mai frecvent întâlnită în rândul cailor trăpași, pur sânge englez pur sânge arab (sau jumătate sânge din aceste rase), și abia apoi la caii din alte rase.

Arterita virală ecvină este o boală infecto-contagioasă, ce afectează ecvideele, indiferent de rasă, vârstă, sex sau stare fiziologică. Se caracterizează clinic prin sindrom febril, însoțit de astenie profundă, epiforă, catar oculo-nazal, edeme inflamatorii în țesutul conjunctiv subcutanat, colorație icterică a mucoasei conjunctivale și avort la femelele gestante. Leziunile cele mai importante sunt cele de panvasculită la nivelul vaselor sanguine, cu diametrul de maximum 5 mm, precum și degenerări și necroze ale mediei acestor vase.

În România, primele semnalări au fost făcute de Aurelia Ionescu și col. (1993). Ulterior, s-au semnalat episoade de arterită virală ecvină în aproape toate hergheliile din țară, iar evoluția clinică a

îmbrăcat aspecte diferite, de la forme foarte grave cu procent de mortalitate mare și avorturi masive, până la evoluții discrete, dar cu procent ridicat de animale seropozitive.

De la ecvine au fost prelevate probe în funcție de starea clinică a animalului. În cazul arteritei virale ecvine este foarte important ca probele să fie recoltate în momentele optime, care să asigure depistarea cu certitudine a virusului, antigenului viral sau a anticorpilor specifici.

Astfel, o parte dintre probele de sânge au fost prelevate în faza febrilă a bolii, imediat după apariția semnelor clinice. De la armăsarii trecuți prin boală, probele de material seminal au fost prelevate după cel puțin trei săptămâni de la dispariția semnelor clinice.

Secrețiile nazale și oculare au fost recoltate cu tampoane sterile în medii de transport, dar și uscate. Pentru recoltarea secrețiilor nazale au fost folosite și soluții sterile izotone cu rol de a spăla cavitățile nazale. Probele de ser au fost prelucrate și conservate până la momentul examinării la  $-20^{\circ}\text{C}$ . Probele de spermă și secrețiile nazale au fost conservate la  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Testul ELISA indirect pentru detecția de anticorpilor specifici infecției cu virusul arteritei virale în vederea estimării seroprevalenței la ecvine**

A fost utilizat testul imunoenzimatic- ELISA indirect pentru detecția și titrarea anticorpilor specifici anti-virusului arteritei virale ecvine din probe de seruri ecvine testate.

Acest kit de diagnostic este destinat detecției anticorpilor direcți contra virusului arteritei ecvine virale (EAV), fiind un test de confirmare pentru serul ecvin.

Testul imunoenzimatic se bazează pe reacția specifică dintre antigenul fixat pe placa de polistiren și anticorpilor pentru arterita virală ecvina din serurile ecvine de testat. Prezența anticorpilor specifici pentru arterită virală ecvină din serurile testate va bloca antigenul de pe placa care în faza a doua nu se va mai lega specific de anticorpilor monoclonali cunoscuți din kit. Prezența sau absența legării specifice a anticorpilor monoclonali se evidentiază printr-o reacție de culoare obținută în prezența substratului și prin adăgarea peroxidazei.

#### **Descriere**

Fiecare godeu este filmat cu o peptidă specifică EAV. Eșantioanele de testat precum și martorii (controalele) se vor adăuga pe microplacă. Anticorpilor anti – EAV, dacă sunt prezenți, formează un complex antigen-anticorp cu epitopii EAV.

În godeurile microplăcii se adaugă un conjugat anti-cal Ig – peroxidază (Po) care fixează anticorpilor anti-EAV, formând un complex antigen-anticorp-conjugat-peroxidază.

După mai multe spălări ce au rolul de a îndepărta excesul de conjugat, se va adăuga soluția substrat (TMB). Diferențele de culoare dintre godeuri sunt proporționale cu cantitatea de anticorpi specifici prezentă în proba de cercetat. Microplaca se va citi la OD<sub>450</sub> nm.

**Acesta este un test de confirmare. Fiecare eșantion și control trebuie să fie depozitat în duplicat.**

Se adaugă:

- 90 μL de **Buffer de diluție 2** în fiecare godeu.
- 10 μl de **Control Negativ** în godeurile A1, A2, B1 și B2.
- 10 μl de **Control Pozitiv** în godeurile C1, C2, D1 și D2.
- 10 μl de probă de examinat în godeurile ce au rămas.

1. Se incubează 1h 30min la 21°C.

2. Godeurile se golesc și se spală de 3 ori cu aproximativ 300 μl de **Soluție de Spălare**.

Se va evita uscarea godeurilor între spălări.

3. Se va prepara **Conjugatul 1X** prin diluția **Conjugatului Concentrat 10X** 1/10 în **Bufferul de Diluție 5**.

4. Se adaugă 100 μl de **Conjugat1X** în fiecare godeu.

5. Se incubează 30 minute la 21°C.

6. Se golesc godeurile și se spală de 3 ori cu aproximativ 300 μl de **Soluție de Spălare**.

Se va evita uscarea godeurilor între spălări.

7. Se adaugă 100 μl de **Soluție Substrat** în fiecare godeu.

8. Se incubează 15 minute la 21°C.

9. Se adaugă 100 μl de **Soluție STOP** în fiecare godeu pentru a stopa reacția.

10. Citirea și înregistrarea rezultatelor se face la OD<sub>450</sub> nm.

### **Rezultate și discuții**

În urma cercetărilor întreprinse până la ora actuală au fost testate 239 de probe de sânge de cabaline ce se află sub jurisdicția județului Bacău, Iași, Botoșani, Vaslui.

Eșantionul luat în studiu este format din animale de ambele sexe. Probele au fost așezate pe placa de lucru în dublu exemplar (tabelul 1).

Tabelul 1

Repartiția probelor de ser pe o placă cu 96 de godeuri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	N	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
B	N	N	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
C	P	P	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
D	P	P	8	8	16	16	24	24	32	32	N	N
E	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	N	N
F	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	P	P
G	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	P	P
H	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36		

În funcție de valorile densităților optice, serurile au fost clasificate în pozitive, dubioase sau negative pentru anticorpi specifici virusului arteritei virale ecvine.

Pentru ca rezultatele testului ELISA să fie considerate corespunzătoare, este necesar să fie îndeplinite criteriile de validare când DO450 a serului de control negativ este mai mică de **0,350**.

În urma depunerii probelor de ser în godeuri și a efectuării reacției ELISA EAV au fost obținute următoarele rezultate, (exemplul unei plăci de lucru la citire), tabelul 2:

Tabelul 2

Rezultate ELISA EAV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.057	0.057	0.179	0.213	0.083	0.183	<b>1.035</b>	<b>2.841</b>	0.126	0.21	0.51	0.343
B	0.15	0.078	<b>0.289</b>	<b>3.428</b>	<b>0.198</b>	<b>3.776</b>	<b>0.171</b>	<b>3.709</b>	0.31	0.572	0.588	0.542
C	0.085	1.638	<b>0.142</b>	<b>3.677</b>	0.294	0.871	0.085	0.179	0.125	0.135	0.683	0.468
D	0.121	1.382	<b>0.17</b>	<b>3.602</b>	0.115	0.268	0.102	0.092	0.255	0.228	0.075	0.08
E	0.195	0.308	0.13	0.345	<b>0.073</b>	<b>3.55</b>	0.079	0.088	0.07	0.209	0.064	0.061
F	0.14	0.311	0.198	0.233	0.1	0.359	0.098	0.198	0.086	0.071	0.167	0.586
G	0.114	0.292	<b>0.152</b>	<b>2.88</b>	<b>0.129</b>	<b>3.647</b>	0.093	0.083	<b>0.147</b>	<b>3.533</b>	0.149	0.672
H	0.106	0.166	<b>0.124</b>	<b>3.231</b>	<b>0.108</b>	<b>2.303</b>	0.169	0.095	0.158	0.356	0.058	0.06

Utilizând testul ELISA indirect au fost examinate în total 239 seruri de cabaline și s-a obținut o seroprevalență medie a fost de **30,76 %**.

Efectivul de ecvine care a făcut obiectul cercetărilor noastre are vârste cuprinse între 48 de luni și 140 de luni, la acest experiment participând atât femele cât și masculi. S-au identificat 141 (58,97%) masculi și 98 femele (iepe) (41,02%).

Dintr-un număr total de armăsari testați serologic au fost detectați ca fiind seropozitivi 30,43% dintre ei, cu vârste cuprinse între 64 de luni și 120 de luni.

Dintr-un număr total de 98 iepe testate serologic pentru prezența anticorpilor anti-EAV au fost depistate seropozitive 31,25% cu vârste cuprinse între 52 de luni și 140 de luni.

Aceste cercetări au fost demarate deoarece în ultimii ani a crescut incidența avorturilor la iepe, fără ca să apară semne clinice de boală.

Pentru a limita efectele aceste boli și pentru a preveni extinderea ei și la efective de ecvine ce se află sub jurisdicția altor CSV-uri învecinate se va restrânge la maxim circulația cabalinelor.

De menționat este faptul că lotul de ecvine supus studiului nu este infectat cu virusul anemiei infecțioase (AIE) conform rezultatelor provenite de la LSVSA-Iași în urma efectuării testului Coggins (imunodifuzia în gel de agar).

Cabalinele ce au constituit obiectul cercetărilor în experimentul de față provin din exploatații nonprofesionale (gospodăriile populației) în care nu existau la ora recoltării probelor de sânge suine, pentru a evita astfel eventualele posibile cross-reacții cu virusul PRRS.

Pentru a limita pierderile suferite prin avorturi, armăsarii detectați pozitivi la ELISA EAV vor fi castrați, întrerupând astfel rolul lor în diseminarea bolii în efectiv. Totodată s-a recoltat material seminal din care se va efectua un examen virusologic pentru a putea pune în evidență prezența virusului arteritei ecvine virale (AEV), dar și secreții vaginale și secreții nazale.

S-au luat în evidență efectivele de porcine în care evoluează sindromul respirator și de reproducție porcine sau au existat suspiciuni și au fost catagrafiate. S-au prelevat și prelucrat probe biologice (sânge pentru exprimarea serului, organe receptive: ovare, uter, pulmon, limfoganglioni) în vederea efectuării examenului serologic și ulterior examenelor etiologice (virusologice).

În urma testării serologice a probelor recoltate s-au continuat investigațiile privind estimarea seroprevalenței sindromului respirator și de reproducție porcine în estul României. Reacțiile serologice pozitive, se pot explica prin aceea că animale diagnosticate pozitive anterior nu au fost scoase din efectiv, au fost păstrate și folosite în continuare la reproducție. Cum fermele de suine se află la prima

suspiciune a infecției, atunci când s-au recoltat probele de sânge pentru precizarea diagnosticului, înseamnă că animalele se aflau la prima infecție, cantitatea de virus excretată era importantă ceea ce favoriza ulterior infectarea unui număr mare de animale receptive.

Abordarea acestui obiectiv este utilă dacă ținem seama de faptul că porcul este ubicvitar răspândit, iar boala este din ce în ce mai prezentă în zonele geografice în care se practică creșterea industrială.

S-au extins cercetările și asupra porcului sălbatic. Au fost prelucrate 90 probe de sânge provenite de la mistreți din zona Moldovei și s-a obținut o seroprevalență de aproximativ 30%. Precizarea diagnosticului de sindrom respirator și de reproducție a probelor recoltate de la porcinele domestice și sălbatice din estul României, s-a făcut pe baza examenului serologic, a testului ELISA. S-a folosit kitul HerdCheck PRRS X3.

Din probele biologice recoltate de la porcii domestici și sălbatici au fost inițiate cercetările de biologie moleculară. S-au efectuat extracții de ARN viral cu kitul QIAamp Viral RNA Mini Kit. Au fost prelucrate materialele genetice obținute în vederea retrotranscripției ARN-ului cu ajutorul kitului QIAGEN OneStep RT-PCR Kit și primerilor specifici. Detecția virusului respirator și de reproducție porcine prin tehnici de biologie moleculară a fost urmată de identificarea, caracterizarea moleculară și încadrarea filogenetică a tulpinilor virale identificate.

#### Bibliografie selectivă

1. **CĂTANĂ N., POPA VIRGILIA, HERMAN V., FODOR IONICA**, 2007 – *Cercetări epidemiologice într-un focar endemic de Sindrom Reproductiv și Respirator Porcin*. Revista Română de Medicină Veterinară, vol. 17, nr. 4, pag. 69-74.
2. **CHUNG W.B., LIN M.W., CHANG W.F., HSU M., YANG P.C.**, 1997 – *Persistence of porcine reproductive and respiratory virus in intensive farrow-to-finish pig herds*. The Canadian Journal of Veterinary Research, nr. 61, pag. 292-298.
3. **STADEJEK T., OLEKSIEWICZ M.B., POTAPCHUK D., PODGORSKA K.**, 2006 – *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes*. Journal of General Virology nr. 87, pag. 1835-1841.
4. **HULLINGER PAMELA., GARDNER A.I., HIETALA K.SH., FERRARO L.G., MACLACHLAN J.N.**, 2001 - JAVMA, 219, 7, 946.
5. **IONESCU AURELIA**, 2006 – Cercetări privind arterita virală ecvină. Teză de doctorat, Iași.

Data,  
09.12.2011

Semnătura,  
Asistent univ.dr. Tănase Irina-Oana