ISSN 1454-7406

UNIVERSITATEA DE ŞTIINŢE AGRICOLE
ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAŞI

LUCRĂRI ŞTIINŢIFICE
VOL. 51(10)

MEDICINĂ VETERINARĂ

PARTEA 2/2

EDITURA „ION IONESCU DE LA BRAD”

IAŞI - 2008

Volumul a fost editat cu sprijinul financiar al
Ministerului Educației, Cercetării și Tineretului

COLEGIUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:
Prof. dr. SOLCAN Gheorghe

Redactor adjunct:
Prof. dr OPREAN Octavian Zaharie

Membri:
Prof. COTEA Corneliu
Conf. dr. VULPE Vasile
Prof. CARP-CĂRARE Mihai
Prof. DRUGOCIU Dan

Tehnoredactor şi designer:
IGNAT Andrei

COMISIA DE REFERENȚI ŞTINȚIFICI

Prof. dr. OPREAN Octavian
Prof. dr. H.C. CRESPEAU F. L. – ENV Alfort, France
Prof. dr. SOLCAN Gheorghe
Prof. dr. MIRON Liviu
Prof. dr. SĂVUŢA Gheorghe
Prof. dr. PREDOI Gabriel – FMV. București
Prof. dr. GROZA Ioan Ștefan – FMV. Cluj-Napoca
Prof. dr. DĂRĂBUȘ Gheorghe – FMV. Timișoara
Prof. dr. COTEA Corneliu
Prof. dr. CARP-CĂRARE Mihai
Conf. dr. MOROȘAN Șerban – INSERM Paris
Prof. dr. H.C. RUNCEANU Liviu
Prof. dr. H.C. COȚOFAN Vasile
Prof. dr. ŞINDILAR Eusebie
Prof. dr. PERIANU Tudor
Prof. dr. COMAN Ioan
Prof. dr. VELESCU Elena

ISSN 1454-7406

CUPRINS:

1. **ABDELFATTAH Nour**
EFFECTIVE TEACHING AND LEARNING STRATEGIES AND INTERNET-BASED RESOURCES FOR VETERINARY BASIC MEDICAL SCIENCES 1

Secţiunea Preclinici

2. **ALBU Aida, POPESCU O., ŢÂRCĂ Felicia, POP Cecilia, POP I.M.**
CONŢINUTUL DE CUPRU ŞI ZINC DIN NUTREŢURI FOLOSITE PENTRU HRANA VACILOR DE LAPTE
COPPER AND ZINC CONTENT IN DAIRY COW FEEDS 3

3. **ALBU Aida, POPESCU O, ŢÂRCĂ Felicia**
CONŢINUTUL DE CUPRU ŞI ZINC ÎN MATERII PRIME FURAJERE ŞI NUTREŢURI COMBINATE DESTINATE ALIMENTAŢIEI PUILOR BROILER DE GĂINĂ
COPPER AND ZINC CONTENT IN FEEDSTUFFS AND BROILER MIXED FEEDS 7

4. **BELU C., PREDOI G., DUMITRESCU I., GEORGESCU B., ŞEICARU Anca, ROŞU Petronela, TOADER A. I., PREDOI Ştefania, CAZIMIR Iuliana, BIŢOIU Carmen**
RESEARCHES REGARDING THE MORPHOLOGY OF THE ARTICULATIONS OF CERVICAL AREA AT THE OSTRICH (STRUTHIO CAMELLUS) 11

5. **BOISTEANU P.C., USTUROI M.G., LAZĂR Roxana**
METABOLIC PROFIL AND SECRETORY ACTIVITY OF PINEAL GLAND, AT EGG LAYING HENS 15

6. **BORCILĂ Cristina, PAUL. I.**
PRELIMINARY DATA REGARDING EXPERIMENTAL OCHRATOXICOSIS AT BROILERS 18

7. **CAZACU P., COTEA C.**
MORPHOLOGIC AND MICROMORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE THIRD EYELID AND NICTITATING GLAND IN THE DOG 22

8. **CAZIMIR Iuliana, CORNILĂ N., PREDOI Ştefania, RISTEA Florica, CONSTANTINESCU Cristina**
MORFOLOGIA MICROSCOPICĂ A COMPARTIMENTELOR CLOACALE LA PREPELIŢA JAPONEZĂ (COTURNIX COTURNINX JAPONICA)
MICROSCOPICAL MORPHOLOGY OF THE CLOACA COMPARTMENTS IN THE JAPANESE QUAIL (COTURNIX COTURNIX JAPONICA) 27

9. **CERNEA Laura, CERNEA M., OGNEAN L., FIŢ N., TRÂNCĂ S., TRIPON S., CUCURUZAN Simona**
ACŢIUNEA UNOR EXTRACTE VEGETALE ASUPRA MICROBIOCENOZEI INTESTINALE ENDOSIMBIONTE LA ŞOARECELE DE LABORATOR
THE EFFECT OF SOME PLANT EXTRACTS ON THE INTESTINAL ENDO-SYMBIOTIC MICRO-BIOCENOSIS IN LABORATORY MICE 33

10. **CIUCĂ Viviana, DUMITRACHE Mariana**
CYTOTOXIC EFFECT OF ALUMINIUM ON CELL CULTURES 38

11. **CODREANU Iuliana, CONSTANTINESCU Ioana, DOJANĂ N., CODREANU M.D., DOJANĂ Rosalie**
INVESTIGAŢII PRIVIND PROFILUL BIOCHIMIC LA IEPURELE DE CÂMP *(LEPUS EUROPAEUS)*
INVESTIGATIONS ABOUT THE BIOCHEMICAL PROFILE IN WILD RABBIT *(LEPUS EUROPAEUS)* 42

12. **CODREANU Iuliana, CONSTANTINESCU Ioana, DOJANĂ N., CODREANU M.D., DOJANĂ Rosalie**
INVESTIGAŢII PRIVIND NIVELUL UNOR ELEMENTE ÎN PROBELE BIOLOGICE PROVENITE DE LA IEPURELE DE CÂMP *(LEPUS EUROPAEUS)*
INVESTIGATIONS CONCERNING THE LEVEL OF SOME ELEMENTS IN BIOLOGICAL SAMPLES FROM WILD RABBIT *(LEPUS EUROPAEUS)* 45

13. **COTEA C., OPREAN O.Z., SOLCAN Carmen, BOISTEANU P.C.**
CITOCHIMIA GLANDELOR TECALE OVARIENE LA VACI ÎN FAZELE CICLULUI SEXUAL
CYTOCHEMISTRY OF THE OVARIAN THECAL GLAND IN THE PHASES OF SEXUAL CYCLE IN COWS 48

14. **CRESPEAU F.L., ROTARU Anca**
CYTOLOGIE DES CYTOPONCTIONS GANGLIONNAIRES À L'AIGUILLE FINE

FINE NEEDLE ASPIRATION LYMPH NODE CYTOLOGY IN VETERINARY PRACTICE 55

15. **CURCĂ D., PANTĂ A.**
MODIFICATIONS OF BLOOD VALUES AFTER STRENUOUS EXERCISE IN WISTAR RATS FEED WITH FODDER SUPPLEMENTED WITH SELENIUM AND L-CARNITINE 59

16. **FLOREA Elena Cătălina, COTEA C., SOLCAN Carmen**
CONTRIBUŢII LA MORFOLOGIA LOBULUI ALB AL GLANDEI HARDER LA IEPURELE DE CASĂ (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)
CONTRIBUTIONS CONCERNING THE WHITE LOBE MORPHOLOGY OF THE HARDERIAN GLAND IN RABBITS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) 64

17. **FLOREA Elena Cătălina, COTEA C., SOLCAN Carmen**
CITOCHIMIA LOBULUI ROZ AL GLANDEI HARDER LA IEPURELE DE CASĂ (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)
CYTOCHEMISTRY OF THE PINK LOBE OF THE HARDERIAN GLANDIN RABBITS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) 69

18. **GEORGESCU B., PREDOI G., CORNILĂ N., TUDOR N., BELU C., PREDOI Ştefania, CAZIMIR Iuliana, NEGHIRLĂ Ioana, PĂUN D., TOADER A. I., PĂLĂMARU Veroana**
CERCETĂRI PRIVIND MORFOLOGIA DIVERTICULULUI VITELIN (MECKEL) LA GÂSCA DOMESTICĂ (ANSER DOMESTICUS)
RESEARCHES REGARDING THE MORPHOLOGY OF THE DIVERTICULUM VITELLIN (MECKEL'S DIVERTICULUM) AT THE DOMESTIC GOOSE (ANSER DOMESTICUS) 74

19. **KEVORKIAN Steliana, MANEA Maria Adina, GEORGESCU S.E., DINISCHIOTU Anca, COSTACHE Marieta**
GENOTYPING OF αs1-CAZEIN GENE IN KARAKUL SHEEP BREED 79

20. **LIONIDE A., CURCĂ D., PANTĂ L.**
EFFECT OF ORGANIC SELENIUM SUPPLEMENTATION DIET IN CALVES ON HUMORAL IMMUNE RESPONSE 82

21. **MACARI V., GUDUMAC V., DONICA A.**
INFLUENŢA REMEDIULUI BioR ASUPRA PSEUDOCOLINESTERAZEI ÎN SERUL SANGUIN LA TINERETUL PORCIN ALIMENTAT CU RAŢII CARENŢATE 87

22. **MACARI V., Putin V., MACARI Ana, POZDÂRCĂ E.**
MANIFESTĂRILE INDICILOR HEMATOLOGICI LA PUII-BROILERI TRATAŢI CU REMEDIULUI BIOR 90

23. **MANEA Maria Adina, KEVORKIAN Steliana, GEORGESCU S.E., DINISCHIOTU Anca, COSTACHE Marieta**
THE α -1 FUCOSYLTRANSFERASE GENE POLYMORPHISM IN CORRELATION WITH THE SUSCEPTIBILITY OF SWINE TO *ESCHERICHIA COLI* INFECTION 93

24. **MICLĂUŞ V., MIHALCA A.D., DAMIAN A., OANA L., RUS V.**
HISTOLOGICAL EVIDENCE FOR MIGRATION SPEED OF *SPIROXYS CONTORTUS* LARVAE IN THE GASTRIC WALL OF THE EUROPEAN POND TURTLE (*EMYS ORBICULARIS*) 96

25. **NEAGU Aritina, CRIVINEANU V., GORAN G.V.*, CODREANU M.D.**
INFLUENŢA SUBSTANŢELOR AZOTATE ASUPRA UNOR PARAMETRII BIOCHIMICI ŞI METHEMOGLOBINEMIEI LA OVINE
NITROGEN SUBSTANCES INFLUENCE ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS AND METHAEMOGLOBINAEMIA IN SHEEP 99

26. **OGNEAN L., CERNEA Cristina, CERNEA M.**
EVOLUŢIA SĂNĂTĂŢII MAMARE LA VACI ŞI A PARAMETRILOR IGENICO – SANITARI AI LAPTELUI PRODUS ŞI PROCESAT PE FILIERA CU CIRCUIT INCHIS A SOCIETĂŢII SANLACTA
EVOLUTION OF COW MAMMARY HEALTH AND THE HYGIENIC AND SANITARY PARAMETERS OF PRODUCED AND PROCESSED MILK ON THE CLOSED CHAIN PRODUCTION FLOW OF THE SANLACTA COMPANY 103

27. **OLARIU Lucia, CACIG Svetlana, LUPEA Alfa Xenia, TULCAN Camelia, ARGHERIE Diana**
THE EFFECT OF THE ZIZIPHUS JUJUBA EXTRACT ON THE SOME ANTIOXIDANT ENZYMES'ACTIVITY IN RATS 109

28. OLARIU-JURCA I., COMAN M., LAZĂU A., STANCU A.
MODIFICĂRI MORFOPATOLOGICE ÎN COLIGRANULOMATOZĂ LA CURCĂ ŞI ASPECTE LEGATE DE DIAGNOSTICUL HISTOPATOLOGIC AL BOLII 113

29. PALL E., GROZA I., SORIŢĂU Olga, CĂTANĂ Laura, CENARIU M.
MODULAREA DIFERENŢIERII CARDIACE A CELULELOR STEM EMBRIONARE MURINE SUB INFLUENŢA UNOR FACTORI DE CREŞTERE
MODULATION OF CARDIAC DIFFERENTIATION OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS UNDER THE INFLUENCE OF SOME GROWTH FACTORS 117

30. PAŞCA S., MIRON L., ACATRINEI D., MIHALACHI Simona
BOTH CARDIO-VASCULARY AND SUBCUTANEOUS FORMS OF DIROFILARIOSIS IN DOG: A CASE REPORT 123

31. PAVEL Geta, MUSTEAŢĂ M., DRAGU Corina, NECULAE Irina
VALOAREA DE DIAGNOSTIC A EXAMENULUI CITOLOGIC AL LICHIDULUI CEFALORAHIDIAN LA CÂINI CU AFECŢIUNI NEUROLOGICE
THE DIAGNOSTIC VALUE OF CEREBROSPINAL FLUID CYTOLOGY IN DOGS WITH NEUROLOGICAL CONDITIONS 128

32. PREDOI Ştefania, CORNILĂ N., CAZIMIR Iuliana, GEORGESCU B., BIŢOIU Carmen, TOADER A.I., ZVORISTEANU Raluca
CERCETĂRI MORFOLOGICE PRIVIND CAVITATEA BUCALĂ LA SPECIA *STRUTHIO CAMELUS*
MORPHOLOGICAL RESEARCHES CONCERNING ORAL CAVITY IN *STRUTHIO CAMELUS* 135

33. PRISĂCARU Cornelia, BURLACU Anca-Irina, ROTARU Liliana
MONITORIZAREA MODIFICĂRILOR BIOCHIMICE DIN STRESUL OXIDATIV SPECIFIC OCRATOXICOZEI A INDUSE PRIN ADMINISTRAREA DE *APII AETHEROLEUM*
EVALUATION OF BIOCHEMICAL CHANGES FROM OXIDATIVE STRESS SPECIFIC TO OCHRATOXICOSIS INDUCED BY *APII AETHEROLEUM* ADMINISTRATION 140

34. PRISĂCARU Cornelia, BURLACU Anca-Irina
TESTAREA EFECTULUI ANTITOXIC AL UNOR PRODUSE VEGETALE CE CONŢIN FTALIDE
EVALUATION OF THE ANTITOXIC EFFECT OF SOME PHTHALIDE CONTAINING VEGETAL PRODUCTS 144

35. RADOI I., SAPCALIU Agripina, CRENGUTA Pavel, TODIRITA Andra
THE EVOLUTION OF SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN THE HONEYBEES' HAEMOLYMPH (A. M. CARPATHICA) COLLECTED IN THE ACTIVE SEASON 148

36. ROTINBERG P., GHERGHEL Daniela, MIHAI C., TRUŢĂ ELENA, CĂPRARU Gabriela, SURDU Ştefania, OLTEANU Zenovia, ROTINBERG Hellen
COMPORTAMENTUL UNOR PARAMETRII HEMATOLOGICI ŞI AL UNOR CONSTANTE BIOCHIMICE PLASMATICE LA TRATAMENTUL CITOSTATIC EXPERIMENTAL CU PRODUSUL GLUCANIC EGlClp
THE BEHAVIOR OF SOME HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND PLASMATIC BIOCHEMICAL CONSTANTS TO THE EXPERIMENTAL CYTOSTATIC TREATMENT WITH THE GLUCANIC PRODUCTS 152

37. SOCACIU Antonia, DAMIAN A., CHIRILEAN Ioana, STAN F., GUDEA Al.
ASPECTE MACROSCOPICE PRIVIND VASCULARIZAŢIA VENOASĂ A GLANDEI MAMARE LA RUMEGĂTOARELE MARI 159

38. SOLCAN Carmen, COTEA C., SOLCAN Gh., FLOREA Elena Cătălina
MODIFICĂRILE HISTOLOGICE ALE PIELII IN UNELE BOLI INFECTIOASE LA PUII BROILER DE GĂINĂ
HISTOLOGICAL LESIONS OF THE SKIN IN SOME INFECTIOUS DISEASES OF BROILER CHICKEN 163

39. SOLCAN Carmen, COTEA C., SOLCAN Gh., POPESCU A.
MODIFICĂRILE HISTOLOGICE ALE PIELII ÎN BOALA MAREK, UNELE BOLI PARAZITARE ŞI DE METABOLISM LA PUII DE GĂINĂ
HISTOLOGICAL LESIONS OF THE CHICKEN SKIN IN MAREK DISEASE AND SOME PARASITIC AND METABOLIC DISEASES IN BROILER CHICKENS 167

40. SPĂTARU Mihaela, COŢOFAN Otilia, SPĂTARU C-tin, VULPE V.
MODIFICARI MACRO ŞI MICROSCOPICE ALE ORGANELOR LA ŞOARECII EXPUŞI LA ÎNTUNERIC PRELUNGIT
THE MACRO AND MYCROSCOPIC MODIFICATIONS OF SOME ORGANS AT MICE THAT ARE KEPT IN PROLONGED DARKNESS 171

41. **STAN F.**
ASPECTE MORFOLOGICE PRIVIND VASCULARIZAŢIA LIMFATICĂ A GLANDEI MAMARE LA CĂŢEA 177

42. **STAN F., GUDEA Al., DAMIAN A., SOCACIU Antonia**
PARTICULARITĂŢI ANATOMICE ALE LIMFOCENTRULUI AXILAR ŞI POPLITEU LA CÂINE 183

43. **TOADER A. I., BELU C., PREDOI G., DUMITRESCU I., GEORGESCU B., ROŞU Petronela, ŞEICARU Anca, BIŢOIU Carmen**
MORFOLOGIA COMPLEXULUI ARTICULAR QUADRATOMANDIBULAR LA STRUŢUL AFRICAN (STRUTHIO CAMELLUS)
RESEARCHES REGARDING THE MORPHOLOGY OF THE QUADRATOMANDIBULARY JOINT AT THE OSTRICH (STRUTHIO CAMELLUS) 188

44. **TRINCĂ LUCIA CARMEN, VOLF MARIANA, AVARVAREI IOAN, BIANU ELISABET**
Pb, Cd and Se levels in fodder plants as part of "farm to fork" food chain survey in Iasi area 192

Secţiunea Clinici

45. **ACATRINEI D., MIRON L.**
EVALUAREA GRADULUI DE POLUARE PARAZITARĂ A ZONELOR DE AGREMENT DIN MUNICIPIUL IAŞI
THE EVALUATION OF PARASITIC POLLUTION STATE OF PUBLIC RECREATION AREAS FROM IASI 198

46. **ACATRINEI D., PAŞCA S., MIHALACHI Simona**
INVESTIGAȚII MORFOLOGICE ÎN INVAZIA CU *DIROFILARIA IMMITIS* LA CÂINE
MORPHOLOGICAL INVESTIGATIONS IN *DIROFILARIA IMMITIS* INVASIONS IN DOGS 200

47. **ANTON Alina, ROLLIN F., SOLCAN Gh.**
THE IMPACT OF COPPER AND ZINC DEFICIENCY ON HEALTH IN HOLSTEIN COWS IN A FARM FROM IASI 207

48. **ARDELEAN. V., ARDELEAN A.I., BONCA Gh., CERNESCU H., MIRCU C., CZAPP Timea, KORODI Gabriela, ZARCULA Simona**
RESULTS OBTAINED DUE TO I.A. IN COWS AND HEIFERS, AND CORRELATIONS BETWEEN FECUNDITY AND SOME ESTRAL MUCUS CHARACTERISTICS 211

49. **BEŞCHEA CHIRIAC I.S., HRIȚCU Luminiţa Diana, BOGHIAN V.**
REACTIVITATEA MUSCULATURII NETEDE ARTERIALE LA UNII AGENŢI VASOCONSTRICTORI (CLORURA DE POTASIU ŞI ANGIOTENSINA) STUDIU COMPARATIV LA UNELE SPECII DE MAMIFERE 216

50. **BORŞ S.I., ROȘCA P., RUNCEANU L.**
OBSERVAŢII PRIVIND DIAGNOSTICUL ŞI TRATAMENTUL HERNIEI UTERULUI GESTANT LA CĂŢEA STUDIU DE CAZ
OBSERVATIONS REGARDING THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF THE PREGNANT UTERUS HERNIA IN A BITCH – CASE REPORT 222

51. **BOGDAN L., GROZA I., CIUPE Simona, NEAGU R., MATEI Sorana, PETREAN Anamaria, VLASIU Teodora**
CERCETĂRI COMPARATIVE PRIVIND TRATAMENTUL ENDOMETRITELOR CRONICE LA VACILE DE LAPTE UTILIZÂND PRODUSELE NATURISTE DIN GAMA PLANTISTIM
COMPARATIVE RESEARCHES REGARDING THE TREATMENT OF CHRONIC ENDOMETRITIS IN DAIRY COWS USING PLANTISTIM NATURAL PRODUCTS 225

52. **BOGHIAN V.**
OPTIMIZAREA DIAGNOSTICULUI CLINIC ŞI PARACLINIC LA VACI CU CETOZĂ CLINICĂ 229

53. **BOGHIAN V., REBEGEA Cristina, MOCANU Diana, BLEJUŞCĂ Alice-Diana, TOMA Luminiţa**
THE BIOCHEMICAL BLOOD PROFILE IN CATS WITH INFECTIOUS PERITONITIS 232

54. **BRĂSLAŞU M.C., BRĂSLAŞU Daniela Elena, CIUBOTARU Emilia, SĂVULESCU I.M., COJMĂLEAȚĂ R., PREDOI Ştefania**
ELECTROCARDIOGRAPHIC CHANGES MADE BY DIABETES MELLITUS 234

55. BRĂSLAŞU M.C., BRĂSLAŞU M.C., VLĂGIOIU C., JOIŢA Silvia, IONESCU S.
USE OF MEXILETIN AT DOGS WITH VENTRICULAR ARRYTHMIAS 238

56. BURCOVEANU Ioana Ruxandra, BURTAN I.
OBSERVAŢII CLINICE ŞI TERAPEUTICE PRIVIND EVOLUŢIA UNUI ULCER CORNEEAN LA PISICĂ – STUDIU DE CAZ
CLINICAL AND THERAPEUTICAL OBSERVATIONS REGARDING THE EVOLUTION OF A CAT'S CORNEAL ULCER – CASE REPORT 241

57. BURTAN L.C., BURTAN I. , FÂNTÂNARU M., CIOBANU S., TOPALĂ Roxana
ETIOPATOGENIA ŞI SIMPTOMATOLOGIA HERNIEI PERINEALE LA CÂINE
ETIOPATHOGENESIS AND CLINICAL SIGNS OF PERINEAL HERNIA AT DOG 245

58. CANTEMIR M.
OBSERVAŢII PRIVIND IMPLICAREA ENDOMERTITELOR ÎN DESFĂŞURAREA PROCESELOR DE REPRODUCŢIE LA VACI
CONSIDERATIONS CONCERNING THE INVOLVEMENT OF THE ENDOMETRITIS ÎN THE DEVELOPEPEMENT OF REPRODUCTIVE PROCESSES ÎN COWS 248

59. CENARIU M., GROZA I., CIUPE Simona , STEGERAN Brînduşa, PALL E., CĂTANĂ Laura, BARTOŞ A.
SEXAREA EMBRIONILOR BOVINI UTILIZÂND REACŢIA ÎN LANŢ A POLIMERAZEI (PCR) 252

60. CERNEA M., CERNEA Cristina, RĂILEANU S., GUT A., SILBERG R., MADEIRA DE CARVALHO L.
STABILIREA PARAMETRILOR NECESARI SI FUNCTIONALI AI MODELULUI MATEMATIC DETERMINISTIC DE EVALUARE *IN VITRO* A CHIMIOREZISTENTEI IN STRONGILIDOZA LA ECVINE
ESTABLISHING THE NECESSARY AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF THE DETERMINISTIC MATHEMATICAL MODEL OF *IN VITRO* RESISTANCE EVALUATION IN EQUINE STRONGYLS RESISTANCE 257

61. CERNEA M., CERNEA Cristina, RĂILEANU S., GUT A., SILBERG R., MADEIRA DE CARVALHO L.
CALCULATION OF RESISTANCE FACTOR AND EVALUATION OF RESULTS VERIDICITY FROM A BIOMATHEMATICAL PROSPECTIVE IN EQUINE STRONGYLS RESISTANCE 261

62. CIOBANU S., BURTAN I., FÂNTÂNARU M., BURTAN L.C., TOPALĂ Roxana
SURGICAL MANAGEMENT IN PALATAL DEFECTS AT CATS 264

63. COIPAN Elena Claudia, VLADIMIRESCU A. F., ARSENE M., ARSENE Marinela, NASTASE S.
CLIMATE VARIABLES INFLUENCE ON THE QUESTING ACTIVITY OF *IXODES RICINUS* TICKS IN TULCEA COUNTY 267

64. CIORNOHAC Mona, HAGIU N., MIHĂEŞ G.
ASPECTE CLINICE ŞI PARACLINICE ÎN EIMERIOZE LA PUII BROILER CRESCUŢI ÎN SISTEM INTENSIV 275

65. CIORNOHAC Mona, HAGIU N., CIORNOHAC G.
IDENTIFICAREA SPECIILOR DE *EIMERII* LA PUII BROILER CRESCUŢI ÎN SISTEM INTENSIV 279

66. CIUPE Simona, GROZA I., PALL E., CENARIU M., STEGERAN Brînduşa, VLASIU Teodora
EFECTELE STRESULUI TERMIC SCROTO - TESTICULAR ASUPRA CARACTERISTICILOR SPERMATICE LA ŞOARECE 282

67. COSMIN M., ROTINBERG P., TRUŢĂ ELENA, GHERGHEL Daniela, CĂPRARU GABRIELA, SURDU Ştefania, OLTEANU Zenovia, ROTINBERG Hellen
HIGHLIGHTING AND REPRODUCIBILITY OF THE ANTITUMORAL PHARMACODYNAMIC EFFECT OF AN AUTOCHTHONOUS GLUCANIC BIOPREPARATION, OF FUNGAL ORIGIN 287

68. CRIVINEANU Maria , NICORESCU V., PAPUC Camelia, MUTU A.
STUDII PRIVIND SINCRONIZAREA ESTRULUI CU PROGESTINE ŞI GONADOTROFINĂ SERICĂ LA OVINE ŞI CAPRINE
STUDIES REGARDING ESTRUS SYNCHRONIZATION WITH PROGESTINS AND SERUM GONADOTROPIN IN SHEEP AND GOATS 293

69. CRIVINEANU V., GORAN G.V., CIUPERCĂ I.A.
MODIFICĂRI HEMATOLOGICE LA TINERETUL TAURIN CRESCUT ÎNTR-O ZONĂ POLUATĂ CU METALE GRELE
HEMATOLOGICAL MODIFICATIONS IN YOUNG BOVINES FARMED IN A HEAVY METALS POLLUTED AREA 298

70. DĂRĂBUŞ Gh., ILIE M., ILIE A., MORARIU S., MORAR D., BRUDIU I.
EVOLUŢIA UNOR PARAMETRI BIOCHIMICI ÎN EIMERIOZA EXPERIMENTALĂ LA PUII BROILER 305

71. DĂRĂBUŞ Gh., IMRE K., OPRESCU I., MEDERLE Narcisa, ILIE M., HERMAN V., HOTEA Ionela
STUDII PRELIMINARE PRIVIND IMPLICAREA CRIPTOSPORIDIILOR ŞI A ALTOR ENTEROPATOGENI ÎN DIAREILE VIŢEILOR 310

72. DOROBANŢU I., GALAN C., DRUGOCIU D., ROŞCA P., CIORNEI Ş.
OBSERVAŢII ASUPRA FRECVENŢEI, FORMELOR CLINICE, SIMPTOMATOLOGIEI SI TERAPIEI ENDOMETRITELOR CRONICE LA VACI
OBSERVATIONS REGARDING OCCURANCE, CLINICAL FORMS, SIMPTOMS AND ENDOMETRITES THERAPY IN COWS 313

73. DRAGHICI Alina Karina, STURZU Simona
DE CE AVEM NEVOIE DE NOI TEHNICI DE DIAGNOSTIC A DERMATOFITOZELOR? 316

74. DRUGOCIU D., ROŞCA P., RUNCEANU L., SOLCAN Gh., CIORNEI Ş., BORŞ S.I.
MONITORIZAREA SUPEROVULAŢIEI ÎN CADRUL TRANSFERULUI DE ZIGOŢI LA VACĂ CU AJUTORUL ULTRASONOGRAFIEI
THE MONITORIZATION OF SUPEROVULATION IN COW DURING EMBRYONARY TRANSFER USING ULTRASONOGRAPHY TECHNIQUE 321

75. ELEFTERESCU H., GROSU F.E., MANGRĂU Angelica, OANCEA I., BOLOG N., BĂLAN L.
MAGNETIC RESONANCE IMAGING IN DOGS: THE INFLUENCE ON CLINICAL MANAGEMENT AND TREATMENT OPTIONS 325

76. FÂNTÂNARU M., BURTAN I., CIOBANU S., BURTAN L.C., TOPALĂ Roxana
UTILIZAREA RIFAMPICINEI ÎN PLĂGI ACCIDENTALE LA CARNIVORE
RIFATROL THERAPEUTIC EFFECT ON CARNIVORES WOUNDS 328

77. FÂNTÂNARU M., BURTAN I., CIOBANU S., BURTAN L.C., TOPALĂ Roxana
UTILIZAREA RIFAMPICINEI ÎN PLĂGI ACCIDENTALE LA CABALINE
USE OF RIFAMPICIN IN ACCIDENTAL WOUNDS AT HORSES 332

78. GALAN C., DOROBANŢU I., DRUGOCIU D., ROŞCA P., CIORNEI Ş.
OBSTRUCIŢA TUBARĂ, CAUZĂ A INFERTILITĂŢII LA VACI
OBSTRUCTION OF THE TUBES, CAUSE OF INFERTILITY IN COWS 335

79. GEORGESCU Gabriela, CODREANU M.D.
HIPOTIROIDISMUL – O CAUZA A PARALIZIEI LARINGIENE LA CAINE (STUDIU DE CAZ) 337

80. GHERGHEL Daniela, ROTINBERG P., MIHAI C., TRUŢĂ ELENA, CĂPRARU GABRIELA, SURDU Ştefania, OLTEANU Zenovia
THE *IN VIVO* ASSESSMENT OF THE PRECLINICAL ONCOCHEMOTHERAPEUTIC EFFECTIVNESS OF THE POLYSACCHARIDIC BIOPREPARATION 341

81. GHIŢĂ M., BRĂSLAŞU M.C., COTOR G.
VALORILE COMPONENTELOR ELECTROCARDIOGRAMEI LA CALUL DE SPORT, ÎNAINTE ŞI DUPĂ ANTRENAMENT 348

82. GORAN G.V., PAPUC Camelia, CRIVINEANU Carmen Delia
INFLUENŢA ADMINISTRĂRII UNOR EXTRACTE ALCOOLICE DE CĂTINĂ ALBĂ (*HIPPOPHE FRUCTUS*) ASUPRA ACTIVITĂŢII UNOR SISTEME ENZIMATICE ÎN HIPERCUPROZA INDUSĂ LA OVINE
ALCOHOLIC EXTRACTS FROM SEA BUCKTHORN FRUITS (*HPPOPHAE FRUCTUS*) ADMINISTRATION INFLUENCE ON ACTIVITY OF SOME ENZYMATIC SYSTEMS IN INDUCED HYPERCUPROSIS IN SHEEP 352

83. GRECU Mariana, NĂSTASĂ V., MORARU Ramona
PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF CYCLODEXTRINES 357

84. GRECU Mariana, HRIŢCU Luminiţa Diana, NĂSTASĂ V.
THERAPEUTICALLY OBSERVATIONS REGARDING NON-STEROIDIAN ANTI-INFLAMMATORY USED IN LOCOMOTORS AFFECTIONS IN DOG 361

85. GRECU Mariana, HRIŢCU Luminiţa Diana, NĂSTASĂ V.
THE BENEFICION/RISK EVALUATION OF THE PYROXICAM WITH THE β-CICLODEXTRINE COMPLEXED IN INFLAMATORY PROCESSES AT DOG 365

86. GROSU F.E., ELEFTERESCU H., MANGRĂU Angelica, BĂLAN L., TUDOR N., VLĂGIOIU C.
DIAGNOSTICUL DEGENERĂRILOR ŞI PROTRUZIILOR DISCURILOR INTERVERTEBRALE LA CÂINE UTILIZÂND TEHNICA DE IMAGISTICĂ PRIN REZONANŢĂ MAGNETICĂ
MRI DIAGNOSIS OF THE INTERVERTEBRAL DISCS PROTUSION AND DEGENERATION IN DOGS 368

87. GROZA I., BOGDAN L., MORAR I., CIUPE Simona, CENARIU M., POP R, NEAGU R.
CRIOCONSERVAREA MATERIALULUI SEMINAL LA BUBALINE
CRYOPRESERVATION OF BUFFALO SEMEN 371

88. HRIŢCU Luminiţa Diana, GRECU Mariana, NĂSTASĂ V.
CLINICAL AND PARACLINICAL ASPECTS IN THE CASE OF KETOPROFEN ADMINISTRATION TO RADICULAR SINDROME IN DOG 376

89. HRIŢCU Luminiţa Diana, GRECU Mariana, BEŞCHEA CHIRIAC I.S.
ETIOLOGIC AND THERAPEUTIC COMPARATIVE STUDY IN DOGS AND CATS WITH DIABETES MELLITUS 380

90. HRIŢCU Luminiţa Diana, GRECU Mariana, SOFRON N.
GUIDELINE REGARDING DIABETIC ANIMALS MONITORIZED 385

91. IGNA C., STRATUL S., SERES Monica, SCHUSZLER Larisa
MINIATURE PIG – A RELIABLE ANIMAL MODEL IN ORTHOPEDY 388

92. IGNA C.
STEM CELL THERAPY: A THERAPEUTIC ALTERNATIVE TO TREAT CARTILAGE LESIONS 392

93. ILIE M.S., DĂRĂBUŞ Gh., OPRESCU I., MORARIU S., MEDERLE Narcisa, ILIE Alina, IMRE K.
CARTAREA SPECIILOR DE HELMINŢI PARAZIŢI LA PĂSĂRI ÎN JUDEŢUL OLT
THE MAPPING OF HELMINTH PARASITE SPECIES IN POULTRY FROM OLT COUNTY 397

94. IMRE K., PĂCURAR C.
IDENTIFICAREA OOCHISTURILOR DE CRIPTOSPORIDII DIN ETALATUL DE FECALE PRIN IMUNOFLUORESCENŢĂ DIRECTĂ 405

95. IMRE K., DĂRĂBUŞ Gh., OPRESCU I., MORARIU S., MEDERLE Narcisa, ILIE M.S., PALCA M.
STUDIU EPIDEMIOLOGIC PRIN ELISA ASUPRA PARAZITISMULUI CU CRIPTOSPORIDII ŞI ALŢI ENTEROPATOGENI, LA VIŢEI ÎN JUDEŢUL CARAŞ-SEVERIN 408

96. IONIŢĂ Mariana, LYONS E.T., MITREA I.L.
SOME ASPECTS OF PARASITISM IN PINNIPEDS (MAMMALIA: PINNIPEDIA - MARINE MAMMALS) 411

97. IVANA Simona, BOGDAN A.T., IONIŢĂ L., IPATE Iudith, POPESCU A.N.
CAT-SCRATCH DISEASE (CSD) 416

98. IVANA Simona, BOGDAN A.T., POPESCU A.N., IONIŢĂ L., Ipate IUDITH
CHERATITA BOXERULUI
BOXER KERATITIS 421

99. LAZĂR G.
OBSERVAŢII ASUPRA FECUNDITĂŢII VACILOR IN RAPORT CU ANTECEDENTELE GINECOLOGICE 424

100. LAZĂR G.
OBSERVAŢII PRIVIND CONCORDANŢA DINTRE INDICII PRODUCTIVI ŞI CEI DE REPRODUCŢIE LA VACI (PRODUCŢIA DE LAPTE) 428

101. LAZĂR M., SARLI G., MOŞU A., LAZĂR Roxana, VULPE V., OPREAN O.Z.
MORPHOLOGIC OBSERVATION ABOUT *DERMOCYSTIDIUM ERSCHOWI* IN COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*) 432

102. LĂCĂTUŞ R.
EXAMENUL RADIOLOGIC AL DENTIŢIEI LA CABALINE 435

103. LEAU T., LEAU F., MOLDOVAN Lucia
STIMULAREA PROCESULUI DE REGENERARE EPITELIALA CU AJUTORUL UNUI FITOCOMPLEX PE SUPORT DE COLAGEN 441

104. MĂLĂNCUŞ R. N., TOFAN C. M.
DIAGNOSTICUL PARACLINIC AL HEPATOPATIILOR LA CARNIVORE
PARACLINICAL DIAGNOSTIC OF HEPATIC DISEASES IN CARNIVORA 444

105. MIRCEAN Viorica, TITILINCU Adriana, COZMA V.
PREVALENŢA INFECŢIEI CU *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. LA PISICI ASIMPTOMATICE (*FELIS CATUS*) ŞI EVALUAREA COMPARATIVĂ A UNOR METODE DE DIAGNOSTIC
PREVALENCE OF CRYPTOSPORIDIUM SPP. INFECTION IN ASYMPTOMATIC CATS (FELIS CATUS) AND EVALUATION OF SOME DIAGNOSTIC METHODS 447

106. MIRON L., NĂSTASĂ V., MAREŞ M.
ANTIFUNGAL THERAPY BASED ON VECTOR TARGETED SYSTEMS 452

107. MITREA I.L., IONIŢĂ Mariana, CONSTANTINESCU F., ONOFREI O., BUZATU M.C.
INCIDENCE OF SOME PARASITIC DISEASES IN SOUTH AND NORTHEASTERN REGIONS OF ROMANIA
INCIDENŢA UNOR PARAZITOZE ÎN EFECTIVE DE TAURINE DIN DIFERITE ZONE DIN SUDUL ŞI NORD-ESTUL ROMÂNIEI 454

108. MORAR I., GROZA I., CIUPE Simona, PALL E., VLASIU Teodora
EVALUAREA MORFOLOGICĂ A OVOCITELOR DE IAPĂ RECOLTATE DUPĂ SACRIFICARE 463

109. MORARIU Florica, MORARIU S.
DINAMICA SEZONIERĂ A CĂPUŞEI DERMANYSSUS GALLINAE (DE GEER, 1778) (ACARI: DERMANYSSIDAE) ÎN FUNCŢIE DE TEMPERATURĂ ŞI UMIDITATEA RELATIVĂ
THE DYNAMICS OF RED POULTRY MITE *DERMANYSSUS GALLINAE* (DE GEER, 1778) (ACARI: DERMANYSSIDAE) DEPENDING ON TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY 466

110. MORARIU S., BRĂILĂ P., MORARIU Florica, COSOROABĂ I., DĂRĂBUŞ Gh., OPRESCU I., MEDERLE Narcisa, ILIE M.
CERCETĂRI ASUPRA FECUNDITĂŢII FEMELELOR DE *DERMANYSSUS GALLINAE* (DE GEER, 1778) (ACARI: DERMANYSSIDAE) ÎN LABORATOR
RESEARCHES ON THE IN VITRO FECUNDITY OF RED POULTRY MITE *DERMANYSSUS GALLINAE* (DE GEER, 1778) (ACARI: DERMANYSSIDAE) 473

111. MORARU Ramona, MALIC Luminiţa Iuliana, NĂSTASĂ V., MAREŞ M.
UPDATE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE MECHANISMS OF THE MICROORGANISMS 479

112. NAGY Ágnes, POP Al.
ASPECTE PRACTICE ÎN STRATEGIA PROFILACTICĂ ŞI TERAPEUTICĂ A DERMATITEI DE HIPERSENSIBILIZARE LA ÎNŢEPĂTURA DE PURICE (DAPP) LA CÂINE ŞI PISICĂ 483

113. NICULAE Mihaela
PRELIMINARY STUDIES ON THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOME HERBAL EXTRACTIONS AGAINST CANINE DERMATOPATHOGENS 488

114. OBER C., MUSTE A., OANA L., MATEŞ N., BETEG Fl., VEREŞ S.
SOME CONSIDERATIONS ABOUT USING OF PROSTHETIC BIOMATERIALS IN REPAIR OF ABDOMINAL WALL DEFECTS IN DOGS 491

115. PAVLI C., ZAMBELLI D.
PROSTATE ANATOMY AND SURGICAL APPROACH IN DOG 495

116. PISICĂ (CRIVINEANU) F.M., CODREANU M.D.
STUDIU PRIVIND INCIDENŢA SINDROAMELOR DE INSUFICIENŢĂ URINARĂ LA CÂINE ŞI PISICĂ
THE STUDY OF SYNDROME INCIDENCE OF RENAL FAILURE ON DOGS AND CATS 500

117. PISICĂ (CRIVINEANU) F.M., PAPUC Camelia, CRIVINEANU Carmen Delia
STUDIUL PRINCIPALILOR PARAMETRII BIOCHIMICI CU VALOARE DE DIAGNOSTIC PENTRU SINDROMUL HEPATO-URINAR LA CÂINE ŞI PISICĂ
THE STUDY OF MAIN BIOCHEMICAL PARAMETERS WITH DIAGNOSIS VALUE FOR HEPATO-RENAL SYNDROME ON DOGS AND CATS 503

118. ROŞCA P., DRUGOCIU D., RUNCEANU L., CIORNEI Ş., HROMEI N.
RESEARCHES CONCERNING THE CORRELATIONS BETWEEN THE NUMBER OF SOMATIC CELLS AND SOME CONSTITUENTS OF THE MILK RESULTED FROM COWS WITH CLINICAL MAMITIS 505

119. SABĂU M., SALA A., SCHUSZLER Larisa, DASCĂLU Roxana, ŞEREŞ Monica, STRATUL S. I., BRATU E., IGNA C.
STABILITY EVALUATION OF METALO-CERAMIC CROWNS FIXED ON DENTAL IMPLANTS IN DOG 508

120. SCHUSZLER Larisa, IGNA C., SALA A., SABĂU M., DASCĂLU Roxana, ŞEREŞ Monica
SUBJECTIVE AND OBJECTIVE MONITORING METHODS – SIGNIFICANCE, ADVANTAGES AND LIMITS 510

121. ŞEREŞ Monica, SABĂU M., DASCĂLU Roxana, SALA A., SCHUSZLER Larisa, SĂRĂNDAN H., IGNA C., CIOCA D., ANGHEL Simona
FULL-THICKNESS SKIN ALLOGRAFT IN IMMUNOTOLERIZED POULTRY 515

122. SEREŞ Ştefania, COZMA V.
CERCETĂRI PRIVIND INFESTAŢIA CU CESTODE LA VULPI DIN NORD-VESTUL ROMÂNIEI
A STUDY ON CESTODE INFECTION OF FOXES IN THE NORTHWESTERN PART OF ROMANIA 520

123. SOFRONIE Mariana, RUGINOSU Elena, PINTEA M., CREANGĂ Şt.
INCIDENŢA ŞI IMPLICAŢIILE ZOOECONOMICE ALE MAMITELOR LA VACILE DE LAPTE ÎNALT PRODUCTIVE
INCIDENCE AND ZOOECONOMICALY IMPLICATIONS OF MASTITIS OF DAIRY COWS HIGH PRODUCTIVITY 524

124. SOLCAN Gh., SOLCAN Carmen, CARP-CĂRARE M., ROTINBERG P., BOGHIAN V., HRIŢCU Luminiţa Diana, BEŞCHEA CHIRIAC I.S., ANTON Alina, MOCANU Diana, BLEJUŞCĂ Alice-Diana
EFECTUL GLUCANILOR EXTRAŞI DIN *CLAVICEPS PURPUREA* ASUPRA UNOR PARAMETRI PRODUCTIVI ŞI A ŢESUTULUI LIMFOID ASOCIAT MUCOASELOR LA PUII BROILER
EFFECT OF GLUCANS EXTRACTED FROM CLAVICEPS PURPUREA ON SOME PRODUCTIVE PARAMETERS AND MUCOSAE ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE IN BROILER CHICKENS 528

125. STEGERAN Brînduşa, GROZA I., CIUPE Simona, CENARIU M., PALL E.
CERCETĂRI PRIVIND PROTOCOLUL DE FERTILIZARE „IN VITRO” A OVOCITELOR BOVINE 534

126. SZAKACS A. R., SZAKACS V. Bianca, SZANTO E., COZMA V.
THE EPIDEMIOLOGY OF PARASITE INFESTATIONS OF PIGS GROWN IN SMALL FARMS FROM THE NORTH-WEST OF ROMANIA 539

127. TITILINCU Adriana, MIRCEAN Viorica, COZMA V.
SEROPREVALENŢA INFECŢIEI CU TOXOPLASMA GONDII LA CAPRE ÎN CENTRUL ŞI NORD-VESTUL ROMÂNIEI
SEROPREVALENCE OF *TOXOPLASMA GONDII* INFECTION IN GOATS FROM CENTRE AND NORD-WEST OF ROMANIA 544

128. TOPALĂ Roxana, BURTAN I., FÂNTÂNARU M., CIOBANU S., BURTAN L.C.
DIAGNOSTICUL OTITEI LA CARNIVORE
DIAGNOSIS OF OTITIS AT CARNIVORES 548

129. TOPALĂ Roxana, BURTAN I., FÂNTÂNARU M., CIOBANU S., BURTAN L.C.
OPŢIUNI TERAPEUTICE ÎN OTITA LA CARNIVORE
THERAPEUTIC OPTIONS FOR OTITIS IN CARNIVORA 553

130. TUDOR N., VLĂGIOIU C., GEORGESCU B.
CANINE HYPERTROPHIC OSTEOPATHY ASSOCIATED WITH INTRATHORACIC LESIONS 557

131. TUDOR Poliana, FERNOAGĂ Cristina, TUDOR N.
DIROFILARIOZA CARDIO-VASCULARĂ LA CÂINE
HEARTWORM (DIROFILARIA IMMITIS) INFECTION IN DOG 560

132. VIŢĂLARU B.A., OCHEA M., BADEA Ruxandra, ŢOGOE D., ROTARU Elena, DINIŢĂ D., DIACONESCU A., BÎRŢOIU A.
REZULTATE OBŢINUTE ÎN URMA TRANSFERULUI DE EMBRIONI LA VACI DIN RASA MONTBELIARDE 563

133. **VULPE V., MISĂILĂ C., MISĂILĂ Elena Rada, VULPE Cristina**
RESEARCH CONCERNING THE CLINIC AND PARACLINIC DIAGNOSIS IN THE PATHOLOGIC ESTATES OF THE FARMING FISH 570

Partea 2a :
Secţiunea Producţii Animaliere şi Sănătate Publică

134. **ALECU Alexandrina 1, TOGOE I.**
STUDII PRIVIND IZOLAREA SI IDENTIFICAREA SPECIEI *BACILLUS CEREUS* DIN PROBE DE LAPTE PRAF 574

135. **AMĂRICĂI Mariana, RÎMBU Cristina, GUGUIANU Eleonora, VOICU Elena, CREŢU Carmen, CARP-CĂRARE M.**
ASPECTE PRIVIND CALITATEA MICROBIOLOGICA A LAPTELUI CRUD INTEGRAL, PROVENIT DINTR-UN JUDET DIN MOLDOVA
ASPECTS REGARDING MICROBIOLOGICAL QUALITY OF INTEGRAL RAW MILK, CAME FROM A MOLDAVIA COUNTY 580

136. **ANDREI Sanda, PINTEA Adela, BUNEA Andrea**
INFLUENŢA METODELOR DE PROCESARE ASUPRA ACTIVITĂŢII ANTIOXIDANTE A LAPTELUI
INFLUENCE OF PROCESSING METHODS ON MILK ANTIOXIDANT ACTIVITY 585

137. **ANDREESCU Nicoleta, CAPLAN Dana Magdalena, IVANA Simona**
LEPTOSPIROZA LA CAINE SI LA STAPANUL ACESTUIA
PET DOG AND OWNER LEPTOSPIROSIS: A CASE STUDY 590

138. **ANIŢĂ Adriana Elena**
HEPATITA E – O NOUĂ ZOONOZĂ PREZENTĂ ÎN ROMÂNIA
HEPATITIS E – A NEW ZOONOSIS PRESENT ALSO IN ROMANIA 593

139. **ANIŢĂ D. C., MERTICARIU Ştefania, SAVUŢA Gh.**
OBSERVAŢII DINTR-UN FOCAR DE RINOTRAHEITA INFECŢIOASĂ BOVINĂ DIN JUDEŢUL IAŞI
OBSERVATIONS FROM AN OUTBREAK OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS IN IAŞI COUNTY 599

140. **ANIŢĂ D. C.**
INVESTIGAŢII SEROEPIDEMIOLOGICE PRIVIND RINOTRAHEITA INFECŢIOASĂ BOVINĂ LA FERME ORGANIZATE DIN BAZINUL SUCEVEI
SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS REGARDING INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS IN FARMS FROM SUCEAVA AREA 602

141. **APETREI Ingrid Cezara, DULMAN Ozana, COJOCARIU L.C., CARP-CĂRARE M., MIHAESCU T.**
HEMOLYSIS AND CYTOTOXICITY MIGHT BE USEFUL BIOMARKERS OF HUMAN AND ANIMAL INDOOR FUNGAL EXPOSURE 605

142. **APETREI Ingrid Cezara, DRĂGĂNESCU Gilda Eleonora, MANTA Livia Georgiana, CARP-CĂRARE M., MIHAESCU T.**
FUNGAL GROWTH EVALUATION IN THE INDOOR ENVIRONMENTS OF A LENDING LIBRARIE - POSSIBLE RISK FACTOR FOR HUMAN HEALTH 611

143. **ARDELEAN A.I., SALAGEAN Monica, DUMA Mihaela**
THE VALIDATION PROTOCOL USED IN HAEMAGGLUTINATION INHIBITION TESTS FOR AVIAN INFLUENZA AND NEWCASTLE DISEASE DIAGNOSIS: A PRACTICAL APPROACH 619

144. **ARSENE M.**
STUDIU DE CAZ PRIVIND FOCARUL DE GRIPA AVIARA DIN LOCALITATEA MALIUC, JUD. TULCEA , DIN ANUL 2005
STUDY REGARDING THE FLU BURNING POINT OF MALIUC, TULCEA, 2005 625

145. **ARSENE M., MAFTEI D., ARSENE Marinela**
ROLUL PASARILOR MIGRATOARE IN EVOLUTIA INFLUENTEI AVIARE PE TERITORIUL JUDETULUI TULCEA
THE ROLE OF THE BIRDS IN THE EVOLUTION OF THE INFLUENCE OF BIRDS FLU IN TULCEA 628

146. ARSENE Marinela
OBSERVATII PRIVIND DISTRIBUTIA SEROTIPULUI LEPTOSPIRA WOLFFI LA OM SI ANIMALE IN JUDETUL TULCEA
OBSERVATIONS REGARDING THE DISTRIBUTION OF THE SEROTYPE LEPTOSPIRA WOLFFI TO PEOPLE AND ANIMALS IN TULCEA DISTRICT 633

147. ARSENE Marinela, ARSENE M.
STUDIUL CAZURILOR SEROLOGIC POZITIVE LA BOVINE CU TULPINA LEPTOSPIRA WOLFFI IN LOCALITATILE DIN DELTA DUNARII
THE STUDY OF THE CASES SEROLOGIC POSITIVE ON THE BOVINE WITH THE STEM OF LEPTOSPIRA WOLFFI IN THE LOCATIES OF DELTA OF DANUBE 637

148. BARAITAREANU S., BĂRĂITĂREANU Ancuţa Paula, DANEŞ Doina, BERCEA Ion
STRATEGII DE SUPRAVEGHERE A FeLV ÎN ROMÂNIA
STRATEGIES OF FeLV SURVEILLANCE IN ROMANIA 641

149. BARAITAREANU S., BĂRĂITĂREANU Ancuţa Paula, COBZARIU D., BALABAN A., CAMPEANU M.V., DANEŞ Doina
MANAGEMENTUL PATOLOGIEI RESPIRATORII INFECTIOASE LA TINERETUL SUIN
YOUNG SWINE MANAGEMENT FOR INFECTIOUS RESPIRATORY PATHOLOGY 644

150. BARAITAREANU S., STONE Carla Sydnei, DANEŞ Doina
IMPLEMENTAREA MODELULUI DELAWARE TECH DE INSTRUIRE A TEHNICIENILOR DE LABORATOR IN ROMANIA
IMPLEMENTATION OF DELAWARE TECH MODEL FOR TECHNICIAN LABORATORY EDUCATION IN ROMANIA 648

151. CAPLAN Dana Magdalena, IVANA Simona, IPATE Iudith
DIAGNOSTIC SI TRATAMENT IN PASTEURELOZA
DIAGNOSIS AND TREATMENT IN PASTEURELOSIS 651

152. BOGOLIN I., VASIU C.
CONTRIBUŢII LA STUDIUL MASTITELOR CLINICE LA OI ŞI CAPRE 655

153. BOGOLIN I., VASIU C.
UTILIZAREA NUMĂRULUI DE CELULE SOMATICE ÎN DIAGNOSTICUL MASTITELOR SUBCLINICE LA OVINE 660

154. VASIU C., BOGOLIN I., CRĂCIUN Maria, BOLFĂ P.
RESEARCHES ON THE CORRELATION BETWEEN SOMATIC CELLS NUMBER AND MAMMARY GLAND INFECTION IN GOATS 666

155. BRIA Gabriela
OBSERVATII PRIVIND POLUAREA APEI CU HIDROXID DE SODIU IN JUDETUL TULCEA
OBSERVATIONS REGARDING THE WATER POLLUTION WITH SODIUM HYDROXYDE IN TULCEA DISTRICT 672

156. BRIA Gabriela, ARSENE Marinela
DETERMINAREA PARAMETRILOR FIZICO-CHIMICI DIN APELE DE SUPRAFATA PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICA
THE DETERMINATION OF THE PHISIC-CHEMICAL PARAMETERS IN THE SURFACE WATERS BY THE SPECTROFOTOMETRICA METHOD 674

157. CADAR D., CSÁGOLA A., ÁDÁM D., URSU Krisztina, SPÎNU Marina, KOBOLKUTI L., POPA Virgilia, MICLĂUŞ V., TUBOLY T.
SYBR GREEN REAL-TIME PCR DETECTION OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) 679

158. CĂLINA Daniela, RĂPUNTEAN Gh., FIŢ N., NADĂŞ G., CHIRILĂ F.
CERCETĂRI PRIVIND IMUNOGENITATEA DERMATOFIŢILOR DIN GENUL *TRICHOPHYTON*
RESEARCHES REGARDING IMMUNOGENITY OF DERMATOPHYTES FROM *TRICHOPHYTON GENUS* 682

159. CĂTANĂ N., POPA Virgilia, BUCUR E., FODOR Ionica
CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ŞI ANATOMOCLINICE ÎNTR-UN FOCAR DE REOVIROZĂ LA PUII DE CARNE
EPIDEMIOLOGICAL AND MORPHOCLINICAL INVESTIGATIONS IN A REOVIROSIS OUTBREAK IN BROILERS 685

160. CĂTANĂ R., GROZA I., MORAR I., VLASIU Teodora, CĂTANĂ Laura
APRECIEREA CLINICĂ ŞI PARACLINICĂ A VALORII REPRODUCTIVE A ARMĂSARILOR
CLINICAL AND LABORATORY EVALUATION OF STALLION REPRODUCTIVE VALUE 689

161. CHIRILĂ D.
INFLUENŢA SISTEMULUI DE ÎNTREŢINERE ASUPRA UNOR INDICATORI BIOCHIMICI DIN PLASMA SANGVNĂ LA GĂINILE OUĂTOARE..... 695

162. COTOR G., GÂJÂILĂ G., GÂJÂILĂ Iuliana, GHIŢĂ M., TRUŢA Alina
EVALUAREA INFLUENŢEI UNOR ADITIVI FURAJERI ASUPRA PARAMETRILOR CANTITATIVI ŞI CALITATIVI AI SECREŢIEI LACTATE, LA VACĂ 698

163. CREANGĂ Şt., MACIUC V., LEONTE C.
CONSERVAREA GENETICĂ A RASEI SURĂ DE STEPĂ DE LA S.C.D.C.B. DANCU, JUDEŢUL IAŞI
GENETICAL CONSERVATION FOR SURA DE STEPA BREED FROM S.C.D.C.B. DANCU, IASI COUNT 702

164. CREŢU Carmen, FLORISTEAN V., CARP-CĂRARE M., BRĂDĂŢAN Gh., IŞAN Elena
INFLUENŢA PH-ULUI ŞI TEMPERATURII ASUPRA SPECIEI *SALMONELLA SPP*. DE PE CARNEA DE PASĂRE PROASPĂTĂ, REFRIGERATĂ ŞI CONGELATĂ
THE INFLUENCE OF PH AND TEMPERATURE AGAINST *SALMONELLA SPP*. GROWTH IN FRESH, FROZEN AND FREEZING POULTRY CARCASSES 707

165. CUC Cosmina, RĂPUNTEAN Gh., FIŢ N., CHIRILĂ F., NADĂŞ G., CĂLINA Daniela
TESTAREA *IN VITRO* A EFECTULUI INHIBITOR A UNOR PRODUSE APICOLE ŞI EXTRACTE VEGETALE ASUPRA ALGELOR DIN GENUL *PROTOTHECA*
THE INHIBITORY EFFECT OF SOME BEE PRODUCTS AND VEGETAL EXTRACTS UPON PROTOTHECA ALGAE IN VITRO GROWTH..... 711

166. CUMPĂNĂŞOIU C., TÎRZIU E., NICHITA Ileana, GROS R.V., SÎRBU Cristina
CHANGES OF THE SANGUINE PARAMETERS IN IMMUNOSUPPRESSED MICE INFECTED WITH *Y. ENTEROCOLITICA* 715

167. CUMPĂNĂŞOIU C., TÎRZIU E., CUMPĂNĂŞOIU C.E., CEAUŞESCU A.
INCIDENCE AND PREVALENCE OF SALMONELLA SPP. INFECTIONS IN BIRD POPULATIONS FROM VÂLCEA COUNTY..... 718

168. DAMACEANU Ani, MARCU Elena
INVESTIGAŢII PRIVIND MODIFICĂRILE PARAMETRILOR HEMATOLOGICI LA TAURINE DIAGNOSTICATE SEROPOZITIV PENTRU VIRUSUL LEUCOZEI BOVINE (VLB)
INVESTIGATIONS ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS MODIFICATION IN CATTLE POSITIVELY DIAGNOSED WITH THE BOVINE LEUKOSIS VIRUS (BLV) 721

169. DAMIAN A., GUDEA Al., LISOVSCHI C., STAN F., TUNS M.F.
ARCHAEZOOLOGICAL STUDIES OF INFERIOR PANNONIA - A ROMAN PROVINCE NEXT TO DACIA –..... 725

170. DANEŞ Doina, BARAITAREANU S., COBZARIU D., DANEŞ M.
ACTUALITATI IN DIAGNOSTICUL PARVOVIROZEI CANINE SI BOLII CARRÉ
ACTUALITIES IN CANINE PARVOVIROSIS AND CANINE DISTEMPER 731

171. DRĂGAN G., CARP-CĂRARE C., CARP-CĂRARE M.
CERCETĂRI BACTERIOLOGICE PRIVIND PREZENŢA SEROTIPULUI ESCHERICHIA COLI O_{157} : H_7 ÎN CARNE ŞI PRODUSE DE CARNE..... 734

172. DRĂGAN G.
CERCETĂRI PRIVIND IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA SEROTIPULUI *ESCHERICHIA COLI* O_{157} : H_7 DIN MATERII FECALE DE BOVINE..... 738

173. FIŢ N., RĂPUNTEAN Gh., SPÎNU Marina, ŞANDRU Carmen Dana, ŞUTEU E., NADĂŞ G.
DINAMICA UNOR FACTORI UMORALI AI IMUNITĂŢII NESPECIFICE ÎN MIAZA CUTANATĂ INDUSĂ EXPERIMENTAL LA OVINE
HUMORAL NONSPECIFIC IMMUNITY FACTORS DYNAMIC IN EXPERIMENTALLY INDUCED FLY STRIKE IN SHEEP..... 742

174. FIŢ N., RĂPUNTEAN Gh., ŞUTEU E., NADĂŞ G., CĂLINA Daniela, ACHELĂRIŢEI D.
VARIAŢIA EFECTORILOR CELULARI DE APĂRARE NESPECIFICĂ ÎN MIAZA CUTANATĂ INDUSĂ EXPERIMENTAL LA OVINE
VARIATION OF THE NONSPECIFIC DEFENSE CELL EFFECTORS IN EXPERIMENTALLY INDUCED BLOWFLY STRIKE IN SHEEP 746

175. GÂJÂILĂ G., GÂJÂILĂ Iuliana, COTOR G.
AMPLIFICAREA RASPUNSULUI IMUN MEDIAT CELULAR CU AJUTORUL UNUI ADJUVANT VACCINAL CU PROPRIETATI IMUNOMODULATARE 751

176. GAŞPAR C-tin. V., GAŞPAR C., GAŞPAR G.
THE STANDARD OF THE BUCOVINA ROMANIAN SHEPHERD DOG BREED 755

177. GAŞPAR C-tin. V., GAŞPAR C., GAŞPAR G.
THE BECOMING OF THE BUCOVINA ROMANIAN SHEPHERD DOG BREED 761

178. GONCEAROV Magdalena, TUDOR L., MITRĂNESCU Elena
ASPECTE LEGALE, PRINCIPII ŞI STANDARDE PRIVIND OBŢINEREA PRODUSELOR AGROALIMENTARE ECOLOGICE, DE LA ANIMALE
LEGAL ASPECTS, PRINCIPLES AND STANDARDS REGARDING THE OBTAINING OF ECOLOGIC PRODUCTS FROM ANIMALS 769

179. GONCEAROV Magdalena, MITRĂNESCU Elena, TUDOR l.
CONSIDERAŢII PRIVIND REGLEMENTĂRILE VETERINARE ARMONIZATE SAU RATIFICATE DE ROMANIA, CE PRIVESC PROTECŢIA ANIMALELOR
CONSIDERATIONS REGARDING THE VETERINARY REGLEMANTATIONS ARMONISED OR DEVELOPED BY ROMANIA FOR THE ANIMALS PROTECTION 772

180. IPATE Iudith, BOGDAN A.T., IVANA Simona, CAPLAN Magdalena, STRATEANU Amalia, PARASCHIVESCU M., COSTACHE Delia
BIODIVERSITATEA STEREOMICROSCOPICA A BACTERIILOR DIN GENURILE LEPTOSPIRA SI PASTEURELA 775

181. IVANA Simona, CAPLAN Dana Magdalena, BOGDAN A.T., POPESCU A.N., IONIŢĂ L., IPATE Iudith
BIODIVERSITATEA PRINCIPALELOR GENURI DE DROJDII ŞI MUCEGAIURI DIN ALIMENTE
THE BIODIVERSITY OF THE MAIN MOLDS AND YEASTS IN FOODS 792

182. LENGKEY Hendronoto A. W Y., ŢOGOE I., TAŞBAC B. A., BALIA Rostita L.
ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTOBACILLUS FROM MEAT FOR USE AS A BIOPRESERVATIVES IN MEAT AND MEAT PRODUCTS 800

183. LUDU Luanda, COURBEYRETTE Karine, SAVUŢA Gh., CHARNEAU Pierre
REZULTATE PRELIMINARE PRIVIND UTILIZAREA UNUI NOU VACCIN BAZAT PE VECTORI LENTIVIRALI PENTRU PREVENIREA INFECŢIILOR DETERMINATE DE VIRUSUL *WEST NILE* LA CABALINE
PRELIMINARY RESULTS REGARDING THE USE OF A NEW LENTIVIRAL VECTOR BASED VACCINE FOR THE PREVENTION OF WEST NILE DISEASE IN HORSES 804

184. MACIUC V., CREANGĂ Şt., NACU G.
CONTRIBUŢII LA STUDIUL SISTEMELOR POLIMORFE PROTEICE ÎN SÂNGE ŞI LAPTE LA O POLUAŢIE DE TAURINE B.N.R.
CONTRIBUTION ON STUDY REGARDING PROTEICAL SYSTEMS FROM BLOOD AND FROM MILK TO A BNR POPULATION 808

185. MACIUC V., NACU G., IACOB C.
STUDIUL PRINCIPALELOR CARACTERE MORFOPRODUCTIVE LA O POPULAŢIE DE TAURINE DE TIP FRIZĂ DIN NORDUL ROMÂNIEI
STUDY REGARDING THE PRINCIPAL MORPHO-PRODUCTIVE CHARACTERS TO A FRIESEN POPULATION FROM ROMANIAN NORTH AREA 812

186. MĂRCULESCU Anca, RĂPUNTEAN Gh., OROS N. A., CERNEA M., CHEREJ R.I.
STUDIEREA SINERGISMULUI ÎN CAZUL ASOCIERII CEFTIOFUR-GENTAMICINĂ ASUPRA UNOR GERMENI DIN GENUL *ENTEROBACTER* 817

187. MĂRCULESCU Anca, RĂPUNTEAN Gh., OROS N. A., CERNEA M., NUELEANU Veturia, CHEREJ R.I.
ANALIZA FENOMENULUI DE ANTIBIOREZISTENŢĂ A UNOR GERMENI GRAM-POZITIVI FAŢĂ DE PENICILINĂ 820

188. MATEI Gabriela Florina, VASILESCU Clara, POPESCU Cristina Tudorița, SEVASTRU Andreea, ONȚANU Gh.
PROGRAM CADRU PRIVIND UN STUDIU PRELIMINAR PENTRU DETERMINAREA PREVALENȚEI *SALMONELLA* LA GĂINILE OUĂTOARE
FRAMEWORK ON BASELINE STUDY ESTABLISHING SALMONELLA PREVALENCE IN LAYING HENS.....824

189. MIHALACHI Simona, MUSTEAȚĂ M., ACATRINEI D., TĂNASE Irina-Oana, PERIANU T.
THE RAPID DIAGNOSIS OF CANINE DISTEMPER USING THE RAPIGEN DISTEMPER AG TEST 832

190. MITRĂNESCU Elena, TAPALOAGA Dana, FURNARIS F., TUDOR L., ROTARU Elena, SIMION Violeta
ASSESSMENT OF MICROBIAL DECONTAMINATION EFFICIENCY BY FINK-ANTISEPT A PRODUCTS.....835

191. NADĂŞ G., RĂPUNTEAN Gh., FIȚ N., RĂPUNTEAN S., CHIRILĂ F., CUC Cosmina, CĂLINA Daniela
LEVURILE GENULUI *MALASSEZIA*: ASPECTE PRIVIND IZOLAREA ŞI PATOGENITATEA LA CÂINE
GENUS MALASSEZIA YEAST: ASPECTS REGARDING ISOLATION AND PATHOGENITY IN DOGS.....838

192. NECULIȚĂ C., CHIRIAC Adriana Gabriela, CARP-CĂRARE M.
SENSIBILITATEA ŞI SPECIFICITATEA UNOR TESTE SEROLOGICE UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL INFECȚIEI CU BRUCELLA OVIS
SENSIBILITY AND SPECIFICITY OF SOME SEROLOGIC TESTS USED FOR *BRUCELLA OVIS* INFECTION DIAGNOSIS.....842

193. NECULIȚĂ Elena Narcisa, FLORISTEAN V., CREȚU Carmen, CARP-CĂRARE M.
OBSERVAȚII PRIVIND INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE PRELUCRARE ASUPRA MICROFLOREI CARCASELOR DE PASĂRE ÎNTR-UN ABATOR RECENT MODERNIZAT
OBSERVATIONS CONCERNING THE INFLUENCE OF PROCESSING STEPS ON POULTRY CARCASS MICROFLORA IN A RECENTLY MODERNIZED ABATTOIR 846

194. NECULIȚĂ Elena Narcisa, FLORISTEAN V., CREȚU Carmen, CARP-CĂRARE M.
OBSERVAȚII PRIVIND MICROFLORA AERULUI ÎNTR-UN ABATOR DE PĂSARI RECENT MODERNIZAT
OBSERVATION CONCERNING AIRBORNE MICROFLORA FROM IN A RECENTLY MODERNIZED POULTRY ABATTOIR 851

195. OLELEU Ana-Maria, RĂPUNTEAN Gh., OLELEU I.
ASPECTE EPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECȚIA CU *BRUCELLA OVIS* ÎN JUDEȚUL CLUJ
EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF *BRUCELLA OVIS* INFECTION IN THE AREA OF CLUJ COUNTY.....856

196. ONAC Diana, TITILINCU Adriana, COZMA V.
DIAGNOSTICUL COMPARATIV AL HIDATIDOZEI LA BOVINE SACRIFICATE ÎN ABATOR.....861
COMPARATIVE DIAGNOSTIC OF HIDATIDOSIS IN BOVINES SACRIFICED IN ABATTOIR.....861

197. PANAGACHI-T. (Gogu) Mihaela, COMAN I., MIRON L., TARȚĂU Liliana, BOMPA C., GOGU P.
CUNNINGHAMELLA SPP. MICROMICET CU POTENȚIAL PATOGEN IZOLAT ÎN PREMIERĂ ÎN ȚARA NOASTRĂ.....865

198. PETCU Carmen Daniela, SAVU C., NEAGU Iuliana, TAPALOAGA Dana, MANTA Cristina
PARTICULARITĂȚILE UNOR PROGRAME PRELIMINARE DINTR-O UNITATE DE PRELUCRARE A PEŞTELUI
FEATURES OF SOME PRELIMINARY PROGRAMMES IN A FISH PROCESSING UNIT 872

199. PĂVĂLEAN D., RĂPUNTEAN Gh., RĂPUNTEAN S.
ASPECTE EPIDEMIOLOGICE PRIVIND BOALA EDEMELOR LA SUINE ÎN AREALUL JUDEȚULUI BISTRIȚA NĂSĂUD
EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS REGARDING OEDEMA DISEASE IN PIGS IN THE AREA OF BISTRIȚA NĂSĂUD COUNTY 879

200. PĂVĂLEAN D., RĂPUNTEAN Gh.
SENSIBILITATEA LA ANTIBIOTICE A UNOR TULPINI DE *E. COLI* IZOLATE DE LA PURCEI CU BOALA EDEMELOR
SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF SOME *E. COLI* STRAINS ISOLATED FROM PIGS WITH OEDEMA DISEASE.....887

201. POPESCU Raluca, HORHOGEA Cristina, PERIANU T.
ASPECTS REGARDING CLINICOPATHOLOGICAL INVESTIGATIONS OF PRIMARY MAEDI-VISNA VIRUS INFECTION 893

202. POPESCU Raluca , HORHOGEA Cristina, PERIANU T.
INVESTIGATIONS REGARDING SEROLOGICAL SURVEILLANCE FOR MAEDI-VISNA VIRUS IN SHEEPS 897

203. RĂPUNTEAN S., RĂPUNTEAN Gh., CHIRILĂ F., FIŢ N., NADĂŞ G.
CARACTERIZAREA MORFOLOGICĂ, CULTURALĂ ŞI BIOCHIMCĂ A UNOR TULPINI DE *NEISSERIA SP*., IZOLATE DE LA ANIMALE 902

204. RÎMBU Cristina, GUGUIANU Eleonora, REBEGEA Cristina, CREŢU Carmen, CARP-CĂRARE C., CARP-CĂRARE M.
RESEARCHES REGARDING THE INFLUENCE OF SOME FACTORS, INVOLVED IN THE EMERGENCE OF DOGS AND CATS BACTERIAL STOMATITIS 909

205. ROTARU Elena, MITRĂNESCU Elena, TAPALOAGA Dana, TUDOR L., FURNARIS F., DINIŢĂ I., IONESCU G.
RESEARCHES REGARDING THE MILKING SYSTEM INFLUENCE UPON COW MILK QUALITY 913

206. SĂLCEANU Ionela, PERIANU T., JELEA Cătălina
OBSERVAŢII PRIVIND INCIDENŢA ANEMIEI INFECŢIOASE ECVINE ÎN JUDEŢUL IAŞI 917

207. SIBECHE Gabriela, CREŢU Carmen, RÎMBU Cristina, CARP-CĂRARE M.
IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA SPECIEI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* DE PE CARCASELE DE BOVINE, OVINE, SUINE ŞI PĂSĂRI
ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ON CATTLE, SHEEP, SWINE AND POULTRY CARCASSES 920

208. SIBECHE Gabriela, CIOBANU G., CREŢU Carmen, RÎMBU Cristina, CARP-CĂRARE M.
ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ON RAW MILK AND PROCESSING MILK DESTINED TO HUMAN CONSUMED 924

209. SIMEANU D., GAVRILAŞ Angela
CERCETĂRI PRIVIND HRĂNIREA BROILERILOR DE GÃINĂ CU NUŢREŢURI COMBINATE FĂRĂ BIOSTIMULATORI ŞI EXPERIMENTAREA UNOR DENSITĂŢI DIFERITE LA POPULARE
RESEARCHES CONCERNING THE CHICKEN BROILERS FEEDING WITHOUT THE USAGE OF BIO-GROWTH PROMOTERS AND THE EXPERIMENTATION OF SEVERAL BROODING DENSITIES 927

210. SIMEANU D., GAVRILAŞ Angela
CERCETARI PRIVIND IMBUNATATIREA CALITATII GALBENUSULUI OUALOR DE CONSUM
RESEARCHES RELATED TO THE IMPROVEMENT OF CONSUMPTION EGGS YOLK QUALITY 933

211. SIMION Violeta, MITRĂNESCU Elena, TAPALOAGA Dana, FURNARIS F., BUSTANI S.
ASSESSMENT OF FUNGI AND MYCOTOXINS CONTAMINATION INFLUENCE ON NUTRITIVE VALUE OF SOME CONCENTRATE FORAGES AND CORN SILAGE 938

212. SPÎNU Marina, ŞANDRU Carmen Dana, BRUDAŞCĂ Gh. F., DUCA Gh.
EVALUAREA INFLUENŢEI SISTEMULUI DE EXPLOATARE ASUPRA REACTIVITĂŢII IMUNE CELULARE NESPECIFICE 942

213. STARCIUC N.
MODIFICĂRI MORFOPATOLOGICE ŞI HISTOPATOLOGICE SPECIFICE ÎN CAZUL BURSITEI INFECŢIOASE AVIARE 947

214. ŞTIRBU-TEOFĂNESCU Beatrice, MILITARU D., MILITARU Manuella, DIACONU Ioana
SUPRAVEGHEREA TOXOPLASMOZEI LA PORCINE PRIN DETECTIA ANTICORPILOR DE TIP IgG, UTILIZAND TESTUL IMUNOENZIMATIC
SURVEILLANCE OF PORCINE TOXOPLASMOSIS THROUGH IGG TYPE ANTIBODIES DETECTION BY IMMUNOENZYMATIC TEST 950

215. STREJA Adriana, CARP-CĂRARE M.
CERCETĂRI PRIVIND VACCINAREA CU VACCIN INACTIVAT MIPRAVAC ÎN EFECTIVE DE GĂINI DE REPRODUCŢIE
RESEARCHES REGARDING VACCINATION WITH INACTIVATED VACCINE MIPRAVAC IN REPRODUCTION POULTRY EFFECTIVE 953

216. TĂNASE Irina-Oana, PAVLI C., PERIANU T.
IMPACTUL ECONOMIC AL SINDROMULUI RESPIRATOR ŞI DE REPRODUCŢIE ÎN CREŞTEREA SUINELOR
PRRS ECONOMIC IMPACT IN INTENSIVE BREADING SWINE HEARDS 957

217. ŢIBRU I., RĂDUCANU Andrada
LAMINITELE – INDICATOR DE APRECIERE A BUNĂSTĂRII 960

218. ŢIBRU I., CĂTANĂ N.
PROTECŢIA PUILOR DE CARNE CU AJUTORUL ACIDIFIANŢILOR 963

219. TÎRZIU E., CUMPĂNĂŞOIU C., NICHITA Ileana, GROS R.V.
STUDY OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF SOME MYCOTOXINS ON BROILERS 966

220. ŢOGOE I., TUDOR L., CRĂCIUN GABRIELA, TUDOR ANETA LAURA
THE EVALUATION OF IMMUNOGENIC CAPACITY OF AN INACTIVATED ANTI-*FUSOBACTERIUM NECROPHORUM* VACCINE 969

221. TOGOE I., TUDOR L., GALIS Anca Maria, CALIN Mihaela Antonina
THE PHOTODYNAMIC INACTIVATION APPLICATION FOR GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE BACTERIA 974

222. TSOMPANELLIS E., FLORISTEAN V., ŞINDILAR E.V.
OBSERVATION CONCERNING THE DEGREE OF POLLUTION WITH ARSENIC AND HEAVY METALS OF SHEEP AND GOAT MILK 978

223. TSOMPANELLIS E., FLORISTEAN V., ŞINDILAR E.V.
OBSERVATIONS CONCERNING SEASONAL VARIATION OF SOMATIC CELL COUNT IN SHEEP AND GOAT MILK 982

224. TUDOR L., ŢOGOE I., MITRĂNESCU Elena, FURNARIS F., GONCEAROV Magdalena
THE ASSESSMENT OF MICROBIOLOGICAL QUALITY OF SOME CHEESE ASSORTMENTS 987

225. TUDOR L., ŢOGOE I., MITRĂNESCU Elena, TUDOR Laura Aneta
YERSINIA ENTEROCOLITICA RAPID METHOD FOR ISOLATION AND IDENTIFICATION FROM FOOD PRODUCTS 992

226. TURCITU M.A., COSTE Handan, ALEXANDRU N., CODREANU Iuliana, CODREANU M.D., OLARU Irina, TAMBA Paula, ZYBACZYNSKI Iulia
EVALUAREA TEHNICILOR DE BIOLOGIE MOLECULARĂ PENTRU IDENTIFICAREA VARIABILITĂŢII GENETICE A PROTEINEI PRIONICE LA EFECTIVELE DE OVINE
EVALUATION OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR PRIONIC PROTEIN GENETIC VARIABILITY IDENTIFICATION IN SHEEPS 998

227. TURCITU M.A., COSTE Handan, CIORANU Raluca, NICOLAE Şt., BĂRBOI Gh., ONIŢĂ Iuliana, NEAGOE Graziela, NEICUŢ Adriana, SANDU Ana
USE OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS 1003

228. VĂTĂŞESCU-BALCAN R.A., GEORGESCU S.E., MANEA Maria Adina, DINISCHIOTU Anca, TESIO C.D., COSTACHE Marieta
ROMANIAN DAIRY CATTLE GENOTYPES 1007

229. VELESCU Elena, PERIANU T., TĂNASE Irina-Oana, PAVLI C., ANIŢĂ D. C., ANIŢĂ Adriana Elena, MIHALACHI Simona
PROFILAXIA SPECIFICĂ A PODODERMATITEI INFECŢIOASE LA RUMEGĂTOARE, PRODUSĂ DE FUSOBACTERIUM NECROPHORUM, PRIN UTILIZAREA ELECTRONILOR ACCELERAŢI ŞI A MICROUNDELOR
THE SPECIFIC PROPHYLAXIS FOR THE INFECTION WITH FUSOBACTERIUM NECROPHORUM IN BOVINES, USING ACCELERATED ELECTRONS AND MICROWAVES 1010

230. VLAD-SABIE Alina, CARP-CĂRARE M., BRĂDĂŢAN Gh., CREŢU Carmen
CERCETĂRI PRIVIND PREZENŢA SPECIILOR E. COLI ŞI SALMONELLA SPP. DE PE CARCASELE DE BOVINE ŞI SUINE
RESEARCH REGARDING THE PRESENCE OF THE *E. COLI* AND *SALMONELLA SPP*. OF THE BOVINE AND SWINE CARCASSES 1012

231. VOICU Elena, CARP-CĂRARE M., AMĂRICĂI Mariana, VOLOŞENIUC M.
APRECIEREA CALITĂŢII IGIENICE A LAPTELUI DE CAPRĂ PRIN DETERMINAREA NUMĂRULUI DE CELULE SOMATICE ŞI A NUMĂRULUI TOTAL DE GERMENI
QUALITY CONTROL OF GOAT MILK USING TOTAL GERM AND SOMATIC CELL COUNT 1016

232. VOICU Elena, SOLCAN Carmen, CARP-CĂRARE M.
RESEARCHES REGARDING CYTOMORPHOLOGY IN SHEEP MILK..... 1019

233. VUŢĂ V., BĂRBOI Gh., TURCITU M.A., OLVEDI Irina, BONCEA D., ORĂŞANU Adriana, ALEXANDRU N., NICOLAE Şt.
THE EVALUATION OF EARLY METHODS OF DIAGNOSIS FOR THE BLV INFECTION..... 1022

Secţiunea Producţii Animaliere şi Sănătate Publică

STUDII PRIVIND IZOLAREA SI IDENTIFICAREA SPECIEI *BACILLUS CEREUS* DIN PROBE DE LAPTE PRAF

ALECU Alexandrina [1*], TOGOE I. [2]
[1]S.N. "Institutul Pasteur" S.A
[2]FMVBucuresti
lxandralecu@yahoo.com

There were performed studies on 42 samples of milk powder taken from several units and there were isolated 7 Bacillus cereus strains.

The isolated strains were biochemicaly and bacteriologicaly tested, and they all showed morphological characteristics specific to the species, their insemination in soft agar proved their mobility and also their viability.

In order to test the pathogenity of 7 strains, there were undertaken "in vivo" tests, the nasal instillation test on mice best proved the presence of metabolits correlated to their pathogenity.

Organismul uman este permanent agresat de factorii fizici, chimici si microbiologi ci, care in final duc la degradarea functiilor vitale ale individului.

In cursul anilor au fost stabilite o serie de ierarhizari ale implicarii diferitilor agenti microbieni in declansarea toxiinfectiilor alimentare. Nu de mult, statisticile aratau ca Salmonella s-ar afla pe primul loc, urmata de Escherichia coli, apoi de Staphylococus aureus, *Bacillus cereus*, s.a.

Facand referiri directe la *Bacillus cereus*, el este un germen ubiquitar si-l gasim incepand de la ambalajele alimentelor, rufaria din spitale, instalatiile de aer conditionat, produse lactate, carne, cereale crude, alimente cu amidon, alimente deshidratate, condimente, muraturi.

Bacillus cereus specie din genul *Bacillus*, familia *Bacillaceae*, elaboreaza substante toxice – factor letal, factori de permeabilizare si enterotoxina, capabile sa produca mortalitate la soareci, acumulare de lichid in ansa ligaturata la iepuri si toxiinfectii alimentare la om.

Pe traseul prelucrarilor si transformarilor la care sunt supuse alimentele, este neaparata nevoie sa se asigure anumite conditii de pastrare, care sa mentina alimentele la niste parametri optimi pentru consum si care sa fie cat mai apropape de posibilitatile fiziologice de asimilare si transformare a lor in organismul uman.

In literatura mondiala de specialitate exista foarte multe date referitoare la contaminarea alimentelor, rezultand toxiinfectii alimentare produse de *Bacillus cereus*. Dar in aceeasi masura *Bacillus cereus* poate contamina tubul digestiv, la oameni, fara a produce imbolnaviri. In afara afectiunilor nongastrointestinale, el poate provoca sindromul de voma sau sindromul enterotoxic.

Un studiu realizat in China pe probe de lapte praf a evidentiat ca aproximativ 50% din probele testate au fost contaminate cu *Bacillus cereus* [12].

De asemeni, a fost observata importanta mastitelor la bovine, din diferite cirezi, multe din aceste cazuri au fost atribuite folosirii antibioticelor contaminate sau instrumentarului contaminat cu *Bacillus cereus[14].*

Facand investigatii in literatura mondiala de specialitate, mentionam faptul ca exista o crestere, in ultimii ani, a imbolnavirilor individuale si de grup cu *Bacillus cereus.*

Bacillus cereus provoaca 20% din infectii si toxiinfectii alimentare in Olanda, 12% in Finlanda, 10% in Danemarca, 6% in Ungaria si Suedia, 5% in Romania. Mentionam faptul ca din 29 de tari raportoare numai 12 ofera date legate de imbolnavirile provocate de specia *Baillus cereus [4].*

Specia *Bacillus caereus* cuprinde tulpini patogene atat pentru om cat si animale.

Lucrarea de fata isi propune un studiu privind izolarea si identificarea *Bacillus cereus* in probe de lapte praf recoltate din diverse unitati din Romania.

MATERIALE SI METODE

In vederea izolarii si identificarii bacteriilor apartinand speciei *Bacillus cereus* au fost recoltate si prelucrate prin examene bacteriologice, biochimice si morfologice 42 probe de lapte praf din diferite unitati.

Examenul morfobiologic s-a realizat prin efectuarea de culturi pe doua tipuri de medii, cu agar si bulion: agar nutritiv simplu, agar moale pentru mobilitate, agar MYP cu polimixina B, agar nutritiv cu

sange de berbec si bulion nutritiv, bulion tripticaza-soia-polimixina B (0,15%), bulion glucoza rosu fenol, bulion Voges-Prosckaner.

Din punct de vedere biochimic, pentru identificare, s-au realizat urmatoarele teste: fementarea glucozei si manitolului, reducerea nitratiilor in nitriti, producerea de lecitinaza si acetilmetilcarbinol, crestera in prezenta a 10% NaCl.

Pentru stabilirea patogenitatii tulpiniilor de *Bacillus cereus* au fost utilizate comparativ 3 tehnici "*in vivo*": testul ansei ileale ligaturate, testul reactiei intradermice, testul instilatiei nazale, folosindu-se mai multe loturi de soareci albi din linia Swiss (10), cobai (7) si iepuri (7).

La testul ansei ileale ligaturate s-au folosit iepuri tineri cu greutate aproximativa de 2 kg. ; in fiecare segment ligaturat a fost inoculat cate 1 ml de cultura din fiecare tulpina de Bacillus cereus, inainte si dupa tratare termica (30C timp de 48 ore).

Testul reactiei intradermice s-a realizat pe un lot de cobai, care dupa o pregatire de 24 ore, au fost inoculati cu cate 0,1 ml din filtratele culturii de *Bacillus cereus*, ca atare sau dupa tratare termica(30C timp de 48 ore).

Testul instilatiei nazale, s-a realizat pe soareci tineri, cu greutate de aproximativ 25 gr. Instilatiile s-au realizat cu culturi de 12, 24, 48 si 72 ore in bulion nutritiv, in doze cuprinse intre 0,1-0,3 ml pentru fiecare lot.

REZULTATE SI DISCUTII

In urma investigatiilor bacteriologice intreprinse, din cele 42 de probe de lapte praf prelucrat au fost izolate 7 tulpini de *Bacillus cereus.*

Toate tulpinile izolate au prezentat caracteristicile morfologice specifice.

Pe frotiurile colorate prin metoda Gram si examinate cu ajutorul microscopului optic, bacteria se prezenta sub forma de bacil de dimensiuni mari cu extremitati rotunjite si colorati gram pozitivi.

In culturile efectuate din mediile lichide majoritatea tulpinilor formau lanturi de diemnsiuni variabile.

In cazul frotiurilor efectuate din culturile obtinute pe suprafata mediilor solide, mai vechi de 96 ore, s-au evidentiat frecvent bacilli sporulati, sporul fiind situat in pozitia subterminala sau centrala fara sa deformeze celula vegetativa.

In urma insamantarii tulpinilor in agar moale, toate s-au aratat a fi mobile, ceea ce a dovedit viabilitatea lor.

In mediul bulion, cele 7 tulpini de *Bacillus cereus* izolate au prezentat grade de turbiditate diferite, dar de regula majoritatea au produs turbiditate intensa iar prin invechire un sediment de dimensiuni mari, omogenizabil.

Toate tulpinile au format dupa 24 ore de incubatie un inel de dimensiuni variabile (2-5 mm), de culoare alb-galbui, ce se datoreaza tranformariilor metabolice.

Pe suprafata agarului nutritiv inclinat, s-au format colonii de dimensiuni mari, cu contur neregulat, cu suprafata neteda si lucioasa, colorate in galben deschis asemanator cu ceara de albine.

Fig 1. Cultura de Bacillus cereus pe agar nutritiv inclinat, 24 ore la 37˚C

Pe agarul nutritiv cu sange de berbec toate tulpinile izolate au produs in jurul coloniilor zone de hemoliza intensa de tip α hemoliza.

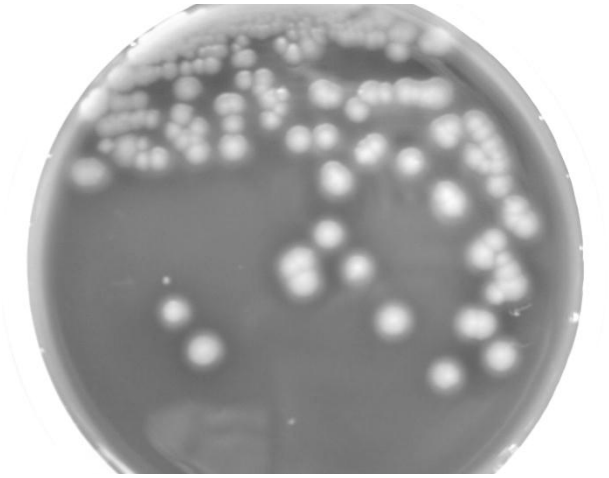


Fig 2. Cultura pura de Bacillus cereus obtinuta pe agar nutritiv cu sange de berbec, dupa 24 ore la 37˚C.

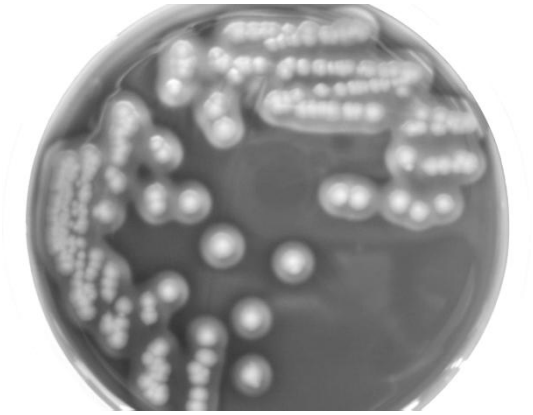


Fig 3. Cultura pura de Bacillus cereus obtinuta pe agar nutritiv cu sange de berbec, dupa 48 ore la 37˚C.

Pe suprafata agarului MYP cu polimixina B toate tulpinile examinate au format colonii mari cu margini neregulate, de culoare roz-rosiatica, inconjurate de o zona larga de culoare galbena, mai opaca decat suprafata mediului pe care nu erau prezente colonii.

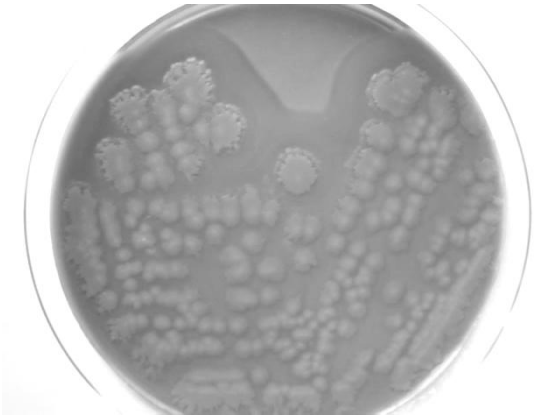


Fig 4. Cultura pura de Bacillus cereus obtinuta pe agar cu manita – galbenus de ou – polimixina B (MYP) – Mossel : descompunerea manitolului pozitiv, activarea lecitinazei si fosfolipazei pozitiva, la 48-72 ore la 37˚C

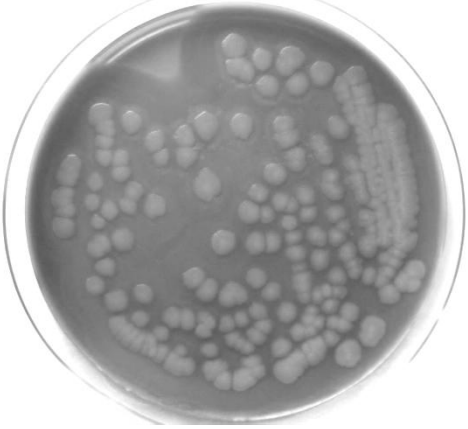


Fig. 5. Cultura pura de Bacillus cereus obtinuta pe agar cu manita – galbenus de ou – polimixina B (MYP) – Mossel : descompunerea manitolului pozitiv, activarea lecitinazei si fosfolipazei pozitiva, la 48-72 ore la 37˚C

In urma examenului biochimic, toate cele 7 tulpini examinate au avut o comportare identica si anume:

- au fermentat glucoza in anaerobioza;
- nu au fermentat manitolul;
- au redus nitratii in nitriti;
- au produs acetilmetilcarbinol
- au produs lecitinaza.

Rezultatele privind patogenitatea celor 7 tulpini de *Bacillus cereus*, studiate comparativ prin testul ansei ileale ligaturate, testul reactiei intradermice si testul instilatiei nazale, sunt prezente sintetic in tabelele 1, 2 si 3.

Analiza comparativa a datelor prezentate in tabelul 1 demonstreaza ca 100% din tulpinile izolate au produs reactii constant pozitive, pentru culturile mai vechi de 24 ore.

Aceste rezultate sugereaza ca acumularea metabolitilor implicati in patogenitatea bacteriei se produce la sfarsitul fazei de multiplicare exponentiala si inceputul fazei stationare.

In cazul in care culturile sau filtratul acestora au fost supuse unui tratament termic (expuse la temperatura fierberii pentru 10 minute) s-a constatat o reducere evidenta a actiunii toxice pentru ambele teste, astfel incat numai 37.5% din tulpinile izolate si-au pastrat patogenitatea.

Analiza datelor obtinute dupa efectuarea testului instilatiei nazale, prezentata sintetic in tabelul 3 demonstreaza ca 50% din tulpinile studiate au avut efect letal asupra soarecilor.

Acesta a fost constatat chiar la culturile in varsta de 12 ore ; patogenitatea a crescut pana la varsta de 48 ore si a ramas constanta la vasta de 72 ore.

Numarul reactiilor pozitive indiferent de varsta culturilor utilizate, a fost influentat de volumul instilatiilor, acesta fiind maxim la doza de 0,3 ml (tabel 3).

Dupa ce culturile au fost expuse la temperatura de fierbere timp de 10 minute, indiferent de vechimea lor si de doza utilizarii pentru instilatii, nu au mai aparut reactii pozitive.

Interpretarea comparativa a rezultatelor obtinute in urma efectuarii testelor de patogenitate "*in vivo*" pentru cele 7 tulpini de *Bacillus cereus* izolate din lapte praf, demostreaza ca testul instilatiei nazale la soareci exprima mai fidel prezenta metabolitilor ce se coreleaza cu patogenitatea.

De asemenea, acest test s-a dovedit a fi mai sensibil si mai usor de efectuat, iar interpretarea rezultatelor poate fi realizata intr-o perioada scurta de timp.

Tabel 1 Evidentierea patogenitatii celor 7 tulpini de Bacillus cereus prin testul ansei ileale ligaturate

Nr. Crt.	Varsta culturii inocluate	Cultura netratata termic		Cultura tratata termic	
		Nr. reactii pozitive	%	Nr. reactii pozitive	%
1	12 ore	0	0	0	0
2	24 ore	3	60	0	0
3	48 ore	5	100	1	100
4	72 ore	5	100	1	100

Tabel 2 Evidentierea patogenitatii celor 7 tulpini de Bacillus cereus prin testul reactiei intradermice

Nr. Crt.	Varsta tulpinii culturii care a fost obtinuta filtratul inoculat	Filtrat netratat termic		Filtrat tratat termic	
		Nr. reactii pozitive	%	Nr. reactii pozitive	%
1	12 ore	0	0	0	0
2	24 ore	2	40	0	0
3	48 ore	5	100	0	0
4	72 ore	5	100	1	100

Tabel 3 Evidentierea patogenitatii celor 7 tulpini de Bacillus cereus prin testul instilatiei nazale

Nr. Crt.	Varsta culturii instilate	Doza instilata (ml)	Cultura netratata termic		Cultura tratata termic	
			Nr. reactii pozitive	%	Nr. reactii pozitive	%
1	12 ore	0.1	1	14.2	0	0
		0.2	4	57.1	0	0
		0.3	7	100	0	0
2	24 ore	0.1	1	14.2	0	0
		0.2	6	85.7	0	0
		0.3	7	100	0	0
3	48 ore	0.1	5	71.4	0	0
		0.2	7	100	0	0
		0.3	7	100	0	0
4	72 ore	0.1	5	71.4	0	0
		0.2	7	100	0	0
		0.3	7	100	0	0

CONCLUZII

In perioada 2005 – 2007 au fost efectuate investigatii privind prevalenta speciei *Bacillus cereus* in 42 probe si evidentierea principalelor proprietati morfo-biologice ale tuplinelor izolate, cu precadere asupra patogenitatii acestora.

Investigatiile efectuate in prezenta lucrare nu au dorit sa precizeze numarul probelor de lapte praf necorespunzatoare din punctul de vedere al prezentei speciei *Bacillus cereus* sub aspectul cantitativ, ci izolarea unui numar cat mai mare de tulpini in scopul caracteristicii complexe a acestora.

Ansamblul investigatiilor intreprinse ne permit formularea unor concluzii :

1. Din cele 42 probe de analizat, specia *Bacillus cereus* a fost prezenta in 7 din acestea.
2. Toate cele 7 tulpini de *Bacillus cereus* izolate, au prezentat insusiriile morfo-biologice caracteristice acestei bacterii.
3. Dintre caracterele fenotipice exprimate "*in vitro*" ce s-au corelat cu patogenitatea , productia de hemolizine si de lecitinaze a fost evidentiata la toate cele 7 tulpini izolate.
4. Dintre testele de patogenitate "*in vivo*" cel mai constant si usor de evidentiat a fost testul instilatiei nazale cu culturi in mediul lichid, care se aflau spre sfarsitul fazei de crestere exponentiala (in varsta de 24 – 48 ore).
5. Pe baza rezultatelor privind exprimarea functiei de patogenitate la *Bacillus cereus* obtinut, se poate aprecia ca metaboltii raspunzatori de declansarea toxiinfectiilor alimentare la om, apar in alimentele incriminate in urma multiplicarii speciei *Bacillus cereus*, iar declansarea acesteia se realizeaza numai cand acestia ating o anumita concentratie.

BIBLIOGRAFIE

1. Andersson M.A., Mikkola R., Helin J., Andersson M.C. et Salkinoja-Salonen M. - Anovel sensitive bioassay for detection of Bacillus cereus emetic toxin and related depsipeptide ionophores. Appl. Environ. Microbiol., 1988,64,1338-1343.
2. Anderson A., Ronner U. et Granum P.E. - What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens Bacillus cereus and Clostridium perfringens?. sources. Int. J. Food Microbiol., 1995,28, 145-155.
3. Anderson Borge G.I., Skeie M., Sorhaug T., Langsrud T. et Granum P.E. - Growth and toxin profiles of Bacillus cereus isolated from different food sorces. Int. J. Food Microbiol., 2001, 69, 237-246.
4. Bouvet P. - Infections d'origine alimentaire. Bulletin de l'Association des Anciens Eleves de l'Institut Pasteur, 2003, no. 176, 113-127.
5. Barzoi D., Lazarescu S., Maier N., Tulus L., Korn R., Dumitrescu F., Nuca O. - Metodemicrobiologice pentru examenul de laborator al produselor alimentare de origine animala. Ministerul Agriculturii si Industriel Alimentare, 1977, Romania.
6. Barzoi D. - Microbiologia produselor alimentare de origine animala, 1985, Ed. Ceres, Romania.
7. Donnio p.Y., Le Deaut P., Schuttler C. et Avril J.L. - Caracterisation et signification clinique des souches de bacillus isolees par hemocultures. Med. Mal. Infect., 1987, 17, 110 – 112.
8. Guinebretiere M.H., Broussolle V. et Nguyen-The C. - Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne Bacillus cereus strains. J. Clin. Microbiol., 2002, 40, 3053 – 3056.
9. Haeghebaert S., Le Querrec F., Vaillant V., Delarouque Astagneau E. et Bouvet P. - Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire, 2001, No. 15.
10. Hilliard N.J., Schelonka R.L. et Waites K.B. - Bacillus cereus bacteremia in a pretern neonate. J. Clin. Microbiol., 2003, 41, 3441 – 3444.
11. Kotiranta A., Lounatmaa K. et Haapasalo M. - Epidemiology and pathologenesis of Bacillus cereus infections. Microbes and Infection, 2000, 2, 189 – 198.
12. Nakamura L.K. – Bacillus pseudomycodes sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1998, 48,1031 – 1035.
13. Togoe I., Tudor L., Florea Alisa Nicoleta – Investigatii privind corelatia intre numarul de celule, varsta culturilor si patogenitatea tulpinilor de Bacillus cereus.
14. Korn R. - Incidenta speciei B. cereus in unele alimente de origine animala si proprietatile tulpinilor izolate. Teza de doctorat, FMV Bucuresti, 1981.

ASPECTE PRIVIND CALITATEA MICROBIOLOGICA A LAPTELUI CRUD INTEGRAL, PROVENIT DINTR-UN JUDET DIN MOLDOVA

ASPECTS REGARDING MICROBIOLOGICAL QUALITY OF INTEGRAL RAW MILK, CAME FROM A MOLDAVIA COUNTY

AMĂRICĂI Mariana[1], RÎMBU Cristina[2], GUGUIANU Eleonora[2], VOICU Elena[2], CREŢU Carmen[2], CARP-CĂRARE M.[2]
[1]DSVSA Vrancea
[2]FMV Iaşi

Milk, because of it's very complex composition and big amount of water, consist in a good medium for the development of contamination microorganisms.

The conditions that respect quality criteria of raw milk are detailed in Regulation (CE) no. 853/2004, which, from January, 1st 2007 is directly applied, without it's transposition in national legislation. In conformity to this legislation, hygienic quality of cows milk is represented by total germs count at 30^0C/ml ≤ 100.000 and somatic cells count /ml ≤ 400.000.

The study realised during a periode of two calendaristic years - 2006- 2007 - (before and after European Union integration), tried to overhear implementation effects of the european quality rules. Raw milk prime materia from three colection of some milk processing units in Moldavia county were analysed. Laboratory exams, reveals producers and milk procesators preoccupations, towards animals healthy state milk quality.

MATERIAL SI METODĂ

Au fost luate în studiu probe de **lapte de vacă crud - materie prima**, recoltate de pe şase rute, care alimentează trei centre de colectare.

Laptele este destinat procesării uzinale, în trei unităţi amplasate într-un judeţ din Moldova. Cele trei unităţi de procesare a laptelui erau în curs de adaptare structurală şi tehnologică la cerinţelor comunitare, conform ord.ANSVSA 276/2006 pentru a fi acreditaţi să comercializeze produse în tot spaţiul CE:

Pentru a se face observaţii obiective privind efectul implementării normelor de calitate impuse de UE, s-a luat în studiu doi ani calendaristici respectiv anul anterior integrării europene (ianuarie-decembrie 2006) şi primul an după integrare (ianuarie-decembrie 2007).

Au fost recoltate câte două eşantioane de lapte pe luna, de la fiecare centru de colectare, prin programul de autocontrol impus de ANSVSA.

Probele au fost examinate în cadrul LSVSA efectuându-se determinarea numărului total de germeni (NTG la 30^0C/ml) şi numărul de celule somatice (NCS /ml).

Metoda standardizată pentru determinarea NTG/ml lapte, a fost şi rămâne, **metoda culturilor în plăci** care are ca principiu de lucru, efectuarea diluţiilor zecimale din produsul testat şi efectuarea însămânţărilor prin încorporare, în două plăci cu mediu nutritiv pentru fiecare diluţie în parte. După termostatare la 30^0C timp de 24 ore se numără coloniile care au rezultat din fiecare diluţie şi pentru a afla numărul de germeni din materialul examinat se înmulţeşte numărul coloniilor cu diluţia respectivă. Pentru a obţine rezultate mai precise, se numără coloniile din mai multe plăci, se înmulţeşte fiecare cifră aflată cu diluţia respectivă şi apoi se face media geometrică. Rezultatul se exprimă prin unităţi formatoare de colonii, care corespunde cu numărul bacteriilor, pe unitatea de volum. Stabilirea criteriilor de calitate se face prin media geometrică, pentru NTG, a două probe de lapte pe lună.

Pentru determinarea numărului de celule somatice s-a utilizat analizatorul SOMACOUNT 150.

Aparatul determină numărul de celule somatice/ml lapte, prin numărarea pulsurilor electrice, determinate de trecerea acestor celule printr-un capilar transparent plasat în faţa unei raze laser de culoare verde.

Proba de lapte s-a recoltat în flacoane de plastic de 50 ml, încălzite la 40º C, urmând a fi analizate. Aparatul este prevăzut cu un agitator care se introduce în fiecare flacon pentru omogenizarea probei de lapte. După agitare, aparatul extrage din proba de analizat 2,5 ml lapte, printr-un impuls, apoi 3 ml de soluţie colorantă. Din amestec, aparatul preia 1 ml şi îl trimite prin capilarul transparent la dispozitivul de citire.

Parametrii admisi de normative, sunt etapizate pe anumite perioade de timp. Astfel perioadele luate în studiu, corespund primelor două etape, respectiv:

Etapa I 1.01.2005 – 31.12.2006 NTG<1.000.000;NCS< 600.000

Etapa II1.01.2007 – 31.12.2008 NTG<500.000;NCS<400.000

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În anul 2006,unităţile de procesare a laptelui treceau prin perioada de adaptare a legislaţiei europene la condiţiile de lucru din sistemul românesc.

Examinarea probelor de lapte a relevant un nivel de contaminare foarte variat.

Rezultatele analizelor de laborator pe eşantioane de lapte crud- materie primă, sunt prezentate în tabelul nr.1.

Din analiza acestuia reiese că, probele recoltate pe parcursul anului 2006, din primul centru de colectare prezintă valori necorespunzătoare ale NTG/ml la 10 (43,47%) din 23 de eşantioane de lapte crud. Din cel de-al doilea centru de colectare, s-au identificat 8 (34,78%) eşantioane necorespunzătoare, iar la cel de-al treilea centru de colectare, doar 5 (21,73%) probe nu s-au încadrat în parametrii impuşi de legislaţie.

La cel de-al doilea parametru de calitate - NCS/ml, valorile necorespunzătoare s-au obţinut la 4(17,39%) eşantioane de lapte crud materie primă,pentru unitatea I şi un eşantion de lapte (4,34%) pentru unitatea III. Laptele provenit de la unitatea II, s-a încadrat în limitele admise de ligislaţie (diagrama 1).

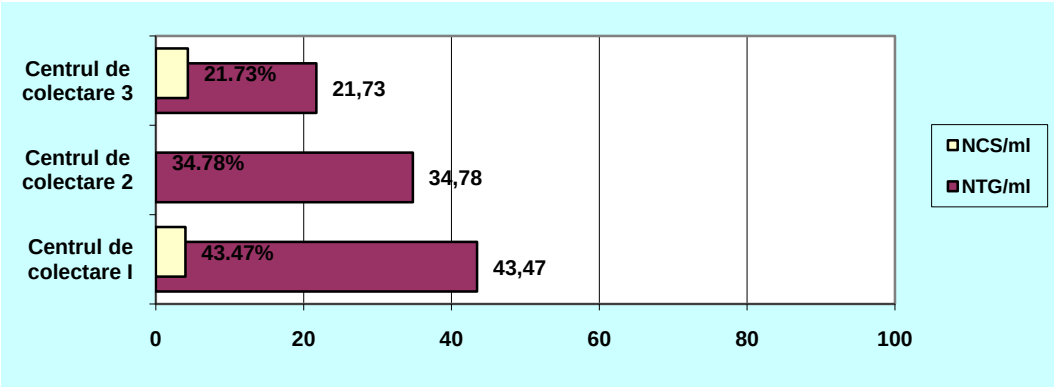


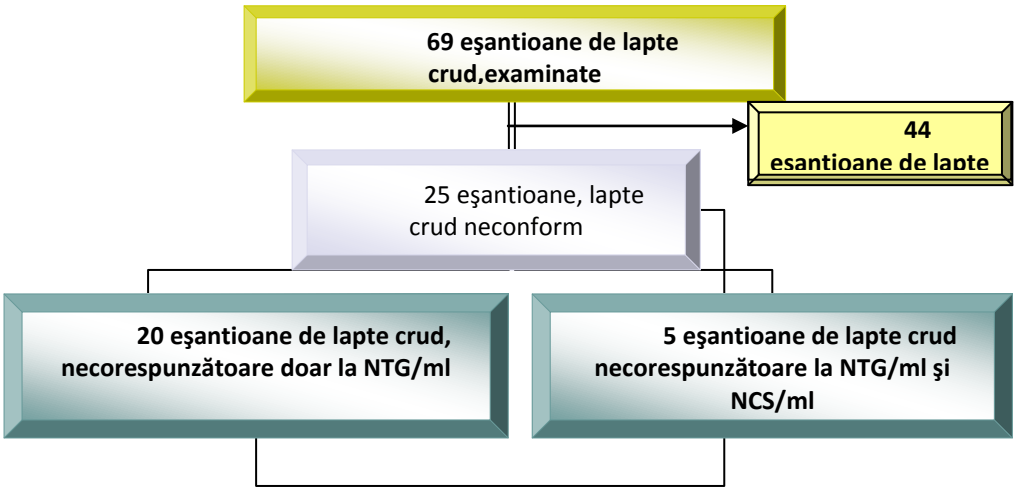
Diagrama 1.Reprezentarea grafica a parametrilor de calitate necorespunzători, la cele trei centre de colectare, pe anul 2006

Tabelul nr.1

Valorile indicatorilor de calitate a laptelui crud- materie primă, pe eşantioanele recoltate în 2006

luna	Rute	Unitatea 1			Unitatea 2			Unitatea 3		
		Cantitate litri	NTG/ml	NCS/ml	Cantitate litri	NTG/ml	NCS/ml	Cantitate litri	NTG/ml	NCS/ml
ianuarie	Ruta 1	700 l	**146000000**	**32846**	250 l	**12.000.000**	**32846**	**220 l**	745.000	32486
	Ruta 2									
februarie	Ruta 1	1570	**1.900.000**	32846	1000 l	763636	339979	900 l	980.000	65693
	Ruta 2	515	**2.770.000**	30703	800 l	**1036033**	30793	400 l	**2.800.000**	131386
martie	Ruta 1	761 l	310.000	65693	700 l	763636	33979	600 l	980.000	328466
	Ruta 2	601 l	**1.050.000**	98540	800 l	809.000	65693	800 l	460.000	229926
aprilie	Ruta 1	1060 l	**4.000.000**	**664243**	881 l	**8200000**	131386	500 l	**2200000**	330243
	Ruta 2	2256 l	**89.000.000**	**695620**	776 l	890.000	164233	600 l	990 000	225467
mai	Ruta 1	1644 l	945000	131386	1035 l	**1600000**	295620	250 l	**4900.000**	164.233
	Ruta 2	1026 l	950000	98540	870 l	**1450000**	197080	400 l	**3100000**	**631386**
iunie	Ruta 1	2119 l	22000	65693	980 l	780000	164233	600 l	870000	131386
	Ruta 2	2115 l	340.000	32.846	900 l	840000	32846	800 l	780000	197080
iulie	Ruta 1	692 l	**14700000**	**598708**	600l	870000	131386	400 l	28000	32846
	Ruta 2	1061 l	**13900000**	**651693**	800l	780000	197080	600 l	66000	98540
august	Ruta 1	2070 l	940.000	131386	400 l	320000	131386	400 l	920000	19768
	Ruta 2	2130 l	680.000	197030	500 l	12.000	131386	500 l	760000	13905
septembrie	Ruta 1	916 l	**1200000**	164233	300 l	**1600000**	295629	800 l	640.000	164233
	Ruta 2	932 l	980000	197077	400 l	**1800000**	164233	500 l	680.000	32846
octombrie	Ruta 1	2241 l	**1600000**	123175	1500 l	5000	197080	600 l	**3.700.000**	164233
	Ruta 2	3105 l	**24.000.000**	394160	800 l	800000	134667	500 l	900000	233433
noiembrie	Ruta 1	789 l	9200000	246350	300 l	**2300000**	164233	300 l	840.000	167000
	Ruta 2	830 l	780000	140771	500 l	**2600000**	151600	300 l	197080	246350
decembrie	Ruta 1	1915 l	920.000	140171	300 l	750.000	140771	800 l	880000	90 166
	Ruta 2	2000 l	460000	90133	500 l	820000	164233	60 l	920000	85686

Sintetizând datele obţinute în 2006, pe toată cantitatea de lapte crud materie primă colectată pentru cele trei unităţi, reiese că au fost examinate calitativ, 69 de eşantioane de lapte crud materie primă. Ca urmare a analizelor de laborator, au fost identificate 25 eşantioane de lapte neconform, structurate astfel: 5 eşantioane erau necorespunzătoare la ambele criterii de calitate (NTG şi NCS) şi 20 eşantioane de lapte, erau necorespunzătoare doar la NTG (schema nr.1).



Schema nr.1 Încadrarea calitativă a eşantionalor de lapte crud-materie primă

Se poate concluziona faptul că, prezenţa eşantioanelor de lapte crud neconform, se datorează cel mai probabil, deficienţelor igienice de la muls până la transportul laptelui către punctul de colectare. Prezenţa celulelor somatice, peste pragul valoric admis (< 600.000) denotă evoluţia unor afecţiuni ale glandei mamare.

Analizând trimestrial situaţia celor două criterii de calitate (NTG/ml şi NCS/ml), la toate cele trei centre de colectare, se observă faptul că, contar asteptărilor, în lunile cu temperaturi mai scăzute, procentul eşantioanelor cu lapte neconform, este mai mare decât în lunile cu temperaturi mai ridicate. Astfel în trimestrul I (ianuarie- aprilie) din 21 de eşantione de lapte crud, 11 (52,38%) esantioane reprezentau laptele neconform, în trimestrul II (mai-august), din 24 eşantione de lapte crud , 6 (25%) erau neconforme iar în trimestrul III (septembrie-decembrie), din 24 de esantione examinate, 8 (33,3%) erau necorespunătoare calitativ (diagrama nr.2)

Întrucât laptele crud materie primă, este recoltat de la animale exploatate în sistem gospodăresc, unde în primele luni de primăvară şi toamnă-iarnă, predomină furajarea în stabulaţie, există riscul contaminării microbiene a laptelui cu microorganismele din microaeroflora adăposturilor.

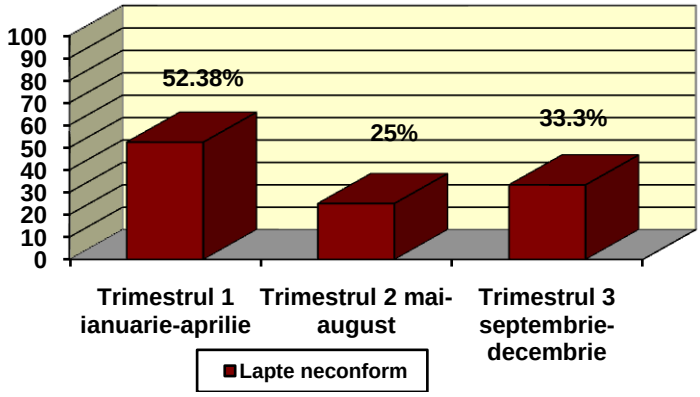


Diagrama 2 Analiza trimestrială a eşantioanelor de lapte crud neconform

Pentru anul calendaristic 2007, toate evaluările calitative reprezentate de NTG/ml şi NCS/ml s-au încadrat în parametrii admişi prin legislaţie.

Având în vedere că unităţile de procesare se aflau în diferite etape de adaptare la normele UE pentru acreditare şi comparând cei doi ani 2006 şi 2007, se poate concluziona faptul că progresele sunt vizibile.

CONCLUZII

1. Au fost examinate 69 eşantioane de lapte crud materie primă în anul 2006 ,iar în anul 2007 s-au examinat 72 eşantioane, recoltate de pe şase rute, care alimentează trei centre de colectare.
2. În anul 2006, valorile NTG / ml erau necorespunzătoare la: 43,47% din eşantioanele de lapte crud materie primă recoltate de la primul centru de colectare; 34,78% de la cel de-al doilea centru de colectare ; 21,73% din eşantioanele de lapte crud recoltat de la cel de-al treilea centru de colectare.
3. În anul 2006, valorile necorespunzătoare ale NCS/ml s-au identificat la 17,39% eşantioane de lapte crud materie primă, pentru unitatea I şi 4,34% eşantioane de lapte recoltat de la unitatea III. Pentru unitatea II, toate eşantioanele de lapte s-au încadrat în valorile normale ale NCS/ml.
4. Din 25 de eşantioane de lapte neconform: 5 eşantioane erau necorespunzătoare la ambele criterii de calitate (NTG şi NCS) şi 20 eşantioane de lapte, erau necorespunzătoare doar la NTG.
5. Din analiza trimestrială în 2006, reiese că: în trimestrul I (ianuarie- aprilie) din 21 de eşantione de lapte crud, 11 (52,38%) eşantioane reprezentau laptele neconform, în trimestrul II (mai-august), din 24 eşantione de lapte crud , 6 (25%) erau neconforme iar în trimestrul III (septembrie-decembrie), din 24 de eşantione examinate, 8 (33,3%) erau necorespunătoare calitativ
6. Ca urmare a implementării legislaţiei europene, privind criteriile de calitate ale laptelui materie primă, în anul 2007, toate eşantioanele de lapte s-au încadrat în valorile admise, pentru NTG/ml şi NCS/ml.

BIBLIOGRAFIE

1. Bondoc Ionel (2007) Tehnologia şi controlul calităţii laptelui şi produselor lactate ,Vol.I. Ed. “Ion Ionescu de la Brad” Iaşi
2. Fthenakis, G. C., E. T. El-Masannat, J. M. Booth, and J. E. T. Jones. (1991). Somatic cell count of ewes’ milk. Br. Vet. J. 147:575–581.
3. Haenlein, G. W. (2002). Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. Small Rumin. Res. 45:163–178.
4. Georgescu Ghe. şi col.(2005) - Cartea producătorului şi procesatorului de lapte. Vol. 4.,,Ed.Ceres,Bucureşti
5. Le Jaouen J.C., Toussaint G.1993 - Le lait de chévre en Europe. *Lait,* 73, 5-6, 407-445.
6. Michel Valerie, Hauwuy Agnes, Chamba J.F.(2001) - La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Lait,* 2001, 81, 6, 575-592.
7. Sevi A., Taibi L., Albenzio M., Annicchiarico G., Muscio A.(2001) - Airspace effects on the yield and quality of ewe milk. *J. Dairy Sci.,* 2001, 84, 12, 2632-2640
8. www.asro.ro/
9. www.ansv.ro
10. www.europa.eu.int/eur

INFLUENŢA METODELOR DE PROCESARE ASUPRA ACTIVITĂŢII ANTIOXIDANTE A LAPTELUI

INFLUENCE OF PROCESSING METHODS ON MILK ANTIOXIDANT ACTIVITY

ANDREI Sanda, PINTEA Adela, BUNEA Andrea
FMV Cluj-Napoca
sanda_m_andrei@yahoo.com

Milk is a very complex food whose consumption confers a number of nutritional benefits In particular, beyond the presence of valuable macro- and micronutrients, milk also contains antioxidant factors. These are represented by naturally occurring vitamins (vitamins E and C, provitamines and vitamins A), and enzymatic systems, mainly represented by lactoperoxidase, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.

The changes in antioxidant activity of milk (lactoperoxidase activity, vitamins E, provitamines and vitamins A concentration) were studied using different heat treatments (the short-time boiling treatment, the ultra high temperature (UHT) process and pasteurization). We also investigated the relationshion between antioxidant activity and the level of lipids peroxidation.

The results indicate that heat treatments can be potentially responsible for depletion in the overall antioxidant properties of milk. Lactoperoxidase was inactivated by boiling, the same situation being observed in UHT milk case. In pasteurized milk the enzyme lost a great part of activity but it was not completed inactivated. The different types of processed milk show a significant difference in antioxidant vitamins concentration. The milk retinol and tocopherol content decrease with 50% in boiling milk but in pasteurized and UHT milk the depletion of those vitamins was more reduced. Lipids were not equally affected by oxidative modifications. The peroxidation highest level was observed in the case of sterilized milk and the lowest in the case of UHT milk.

Key words: milk, antioxidants, heat treatments

Activitatea antioxidantă a lapteului este datorată prezenţei unor enzime antioxidante, cum sunt enzimele din clasa oxidoreductazelor (catalaza-Cat, glutation peroxidaza-GPx, lactoperoxidaza-LPx şi superoxid-dismutaza- SOD) sau a unor vitamine şi provitamine cum sunt vitamina A şi carotinoidele, vitamina E, vitamina C. Moleculele antioxidante prezente în lapte au un rol important în menţinerea calităţii acestuia (prevenind procesele de peroxidare lipidică) şi odată ajunse în organism îşi menţin această funcţie participând activ la sistemul antioxidant al organismului. Acţiunea sistemelor antioxidante este însă modificată ca urmare a proceselor tehnologice de prelucrare a laptelui.

După xantin-oxidoreductaza, lactoperoxidaza este una din enzimele cele mai abundente din lapte, reprezentând aproximativ 0,5% din totalul proteinelor solubile din lapte, respectiv 0,1% din totalul de proteine a laptelui. O comparaţie între laptele de bovină şi cel uman a arătat faptul că cel din urmă conţine un nivel foarte scăzut de LPx, doar aproximativ 5% din nivelul prezent în laptele de bovine [Bonini şi colab., 2007; Fox şi Kelly, 2006].

Vitamina A este un important antioxidant liposolubil, acţiunea sa de inhibare a peroxidării lipidelor şi de protecţie a membranelor celulare fiind cunoscută de peste 60 de ani [Cadena şi Parker, 1996]. În produsele de origine animală (lapte, carne), vitamina A este prezentă în principal sub formă de esteri ai retinolului cu acizi graşi .

În ultimii ani, în studiile de specialitate, un interes deosebit a fost acordat funcţiei antioxidante a pigmenţilor carotinoidici. Multe din cercetările cu privire la funcţia antioxidantă, ce au fost efectuate în sisteme biologice, au demonstrat faptul că atât carotinoidele hidrocarburice cât şi xantofilele sau chiar apocarotinoidele funcţionează ca antioxidanţi. Dintre rumegătoare doar bovinele sunt capabile de a acumula concentraţii mari de carotinoide (în special -carotină) la nivelul plasmei şi a ţesutului adipos. În laptele de vacă, pe lângă β–carotină (sub forma de izomeri all-trans) pot fi întâlnite concentraţii scăzute de luteină. [Noziere şi colab., 2006].

La rumegătoare, conţinutul vitaminei E prezente în lapte este în relaţie directă cu nivelul plasmatic al acestei vitamine. Conform datelor prezentate de Fox şi Kelly (2006) suplimentarea dietei

vacilor cu tocoferol determină creşterea nivelului acesteia în fracţiunile lipoplasmatice concomitent cu o creştere a concentraţiei vitaminei în lapte. De altfel, nivelul concentraţiei vitaminei E în membranele globulelor grase poate fi utilizat ca un marker al stabilităţii oxidative a laptelui.

Laptele ca atare este un produs foarte perisabil. Pentru o siguranţă în vederea păstrării sau procesării, laptele este supus unor procedee fizice, chimice sau mecanice de conservare [Rotaru şi Mihaiu, 2005]. În studiile efectuate de Calligaris şi colab. (2004) s-a urmărit modul în care se modifică activitatea antioxidantă a laptelui în urma unor diverse tratamente termice. Aceşti cercetători au arătat că această activitate scade în urma încălzirii laptelui, fapt ce poate fi explicat prin combinarea a două efecte: degradarea termică a antioxidanţilor naturali din lapte cât şi formarea, în urma încălzirii, a noi specii de oxigen active. Căldura produce şi modificări importante asupra echipamentului enzimatic al laptelui. Astfel, pasteurizarea nu influenţează evident activitatea unor enzime cum sunt ribonucleaza, amilaza sau fosfataza acidă însă determină o inactivare moderată a lactoperoxidazei şi xantinoxidazei [Stepaniak, 2004].

Efectele prelucrării termice a laptelui se răsfrâng şi asupra vitaminelor. Vitaminele se distrug în prezenţa oxigenului, motiv pentru care se preferă pasteurizarea instantanee. Sensibilitatea cea mai mare la prezenţa oxigenului o are vitamina C, pe când vitamina D şi E sunt foarte rezistente. Conform datelor prezentate de Fenaille şi colab (2006) atât laptele pasteurizat cât şi laptele UHT se caracterizează prin apariţia unor modificări oxidative atât la nivel de lipide (creşte concentraţia produşilor de oxidare cum sunt malonildialdehida şi hexanalul) cât şi al proteinelor.

Scopul acestei lucrări este urmărirea modului în care diverse procese termice de prelucrare a laptelui de consum influenţează activitatea enzimelor antioxidante şi conţinutul în vitamine. Am monitorizat activitatea antioxidantă prin determinarea activităţii lactoperoxidaza (LPx) precum şi concentraţia vitaminei A, carotinoidelor şi vitamina E. De asemenea s-a determinat nivelul de peroxidare al lipidelor prezente în lapte.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările s-au realizat pe patru tipuri diferite de lapte, lapte proaspăt şi lapte prelucrat prin diverse procedee tehnologice (pentru fiecare tip de lapte s-au prelucrat 3 probe diferite): lapte proaspăt de vacă, lapte de vacă fiert, lapte de vacă pasteurizat - „Cedra” (grăsime 3,5%) şi lapte UHT - „Milli” (grăsime 1,5%).

Determinarea activităţii lactoperoxidazei

Lactoperoxidaza, împreună cu ionul tiocinat (SCN^-) şi cu peroxidul de hidrogen determină peroxidarea tiocianatului la ionul hipotiocianat, considerat a avea proprietăţi antimicrobiene. Datorită acestei proprietăţi, activitatea lactoperoxidazei este importantă pentru păstrarea laptelui. Pentru determinarea activităţii lactoperoxidazei, în studiul nostru am utilizat o metodă bazată pe utilizarea ABTS [acid 2,2’-azinobis-(3-etil-benztiazolina-6-sulfonic) [Pintea și colab., 2008].

Determinarea provitaminelor şi vitaminelor A din lapte

Determinarea conţinutului în vitamine şi provitamine A s-a realizat prin cromatografie HPLC, pe extracte obţinute din probele de lapte. Pentru a realiza analiza cantitativă, într-o primă etapă s-a determinat curba etalon, utilizând soluţii standard de retinol. Utilizând aceleaşi condiţii de separare, s-a realizat analiza probelor de lapte.

Pentru extracţia vitaminelor liposolubile s-a utilizat un amestec de eter etilic și eter de petrol în raport de volume de 1:1. S-a separat faza superioară eterică care apoi s-a supus saponificării cu o soluţie de hidroxid de potasiu 5 % în etanol 96 %, după care vitaminele s-au reextras de mai multe ori în hexan. Fazele hexanice au fost reunite, spălate în pâlnia de separare cu apă şi apoi evaporate la sec. Probele au fost păstrate la congelator până la analiza ulterioară.

Dozarea spectrofotometrică a carotenoidelor se bazează pe proprietatea acestora de a absorbi radiaţie luminoasă din domeniul vizibil, cu un maxim de absorbţie situat în jurul valorii de 450 nm. Un volum măsurat hexan s-a adăugat reziduului obţinut după saponificare şi se citeşte absorbanţa la 450 nm. Înregistrarea spectrului de absorbţie şi citirea absorbanţei la 450 nm s-a făcut cu un Spectrofotometru Jasco V-530[Andrei și Pintea, 2004].

Analiza cantitativă a retinolului s-a realizat utilizând o curbă etalon întocmită cu soluţii de retinol-trans-total (Sigma) de concentraţii cuprinse între 10 şi 80 µg/ml. Soluţiile standard şi probele

au fost injectate într-un sistem HPLC prevăzut cu sistem de pompe Shimadzu LC-20 AT, detector Waters 990 cu softul de prelucrare a datelor, injector Rheodyne cu buclă de 20 µl şi coloană Spherisorb RP-18 cu lungime de 25 cm, diametrul interior 4,6 mm şi dimensiunea particulelor de 5 µm. Faza mobilă a constat în acetonitril:metanol 85:15, în sistem izocratic.

Determinarea vitaminei E

Conţinutul în tocoferol al laptelui s-a determinat utilizând acelaşi extract realizat pentru analiza carotenoidelor şi retinolului iar separarea HPLC s-a realizat utilizând acelaşi sistem cromatografic descris anterior. Faza mobilă a constat în metanol 100 % cu un debit de 1 ml/min. Monitorizarea cromatogramei s-a făcut la 298 nm iar determinarea cantitativă s-a bazat pe o curbă etalon întocmită cu soluţii de concentraţii 10µg/ml – 100 µg/ml de α-tocoferol (Sigma).

Determinarea nivelului peroxidării lipidelor

Malonildialdehida (MDA) este considerată a fi produsul final al peroxidării lipidelor şi este cel mai utilizat marker al peroxidării. Pentru determinarea cantitativă a MDA pe baza reacţiei cu acid tiobarbituric (TBA) se pot utiliza atât metode bazate pe absorbţia în domeniul vizibil, cât şi metode fluorimetrice sau cromatografice (HPLC). În această lucrare s-a utilizat metoda fotometrică de determinare a MDA la 532 nm [Pintea și colab, 2008].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Aşa cum reiese din tabelul 1, activitatea lactoperoxidazei prezintă variaţii în funcţie de tipul de procesare a laptelui. Astfel, enzima este inactivată prin fierbere, aceeaşi situaţie regăsindu-se în cazul laptelui UHT. În cazul laptelui pasteurizat, enzima îşi pierde mult din activitate, prezentând valori mai scăzute comparativ cu laptele proaspăt, dar contrar celorlalte tipuri de lapte prelucrate termic ea nu este complet inactivată.

Tabel 1: Variaţia activităţii lactoperoxidazei la laptele proaspăt şi procesat

Activitatea LPx	Lapte vacă proaspăt	Lapte fiert	Pasteurizat (3,5 % grăsime)	UHT (3 % grăsime)
U/ml	5.62 ± 0.19	0	0.31 ± 0.04	0

Datele obţinute sunt în concordanţă cu cele prezentate de Raynal-Ljutovac şi colab. (2007) conform cărora enzimele din lapte sunt denaturate în timpul tratamentelor termice, procentul de denaturare fiind dependent de temperatură, timpul de încălzire şi tipul enzimei. De exemplu lipazele şi amilazele şi fosfataza alcalină sunt foarte labile şi se inactivează uşor în timpul proceselor termice de pasteurizare a laptelui în timp fosfataza acidă este stabilă şi prezentând o rezistenţă mult mai mare în aceleaşi condiţii. Rezultatele obţinute în urma determinării cantitative a retinolului în probele de lapte proaspăt şi prelucrat termic sunt prezentate în tabelul 2. Aşa cum se poate observa în tabel, conţinutul în retinol al laptelui scade cu aproape 50% în timpul procesului de fierbere în timp ce în cazul laptelui pasteurizat şi UHT pierderile sunt mai reduse.. Conform studiilor prezentate de Whiten şi colab. (2002) există doi factori majori ce determină scăderea concentraţiei de vitamină A în lapte. Este vorba de expunerea la lumină şi temperatura, factori ce determină intensificarea formării speciilor active de oxigen, specii ce sunt inactivate de această vitamină antioxidantă. Prin exercitarea acestei funcţii, retinolul este oxidat ceea ce determină scăderea concentraţiei în lapte.

Tabel 2: Conţinutul în retinol al laptelui proaspăt şi procesat

Conţinutul în retinol	Lapte de vacă proaspăt	Lapte de vacă fiert	Pasteurizat (3,5 % grăsime)	UHT (3 % grăsime)
În µg/100 g lapte	37,2 ± 2,1	14,4 ± 0,9	31.9 ± 1.8	26,4 ± 1,2
În µg/g grăsime totală*	8.8 ± 0,5	8,0 ± 0,4	9.1 ± 0,5	8.8 ± 0,5
În U.I/100 g lapte*	124	48	106	88

* cantitatea de grăsime luată în calcul a fost: vacă – 4,2 %

* 1 UI (unitate internaţională retinol) = 0.3 µg retinol

Noziere şi colab. (2006), au arătat faptul că prelucrarea termică a laptelui determină scăderi în concentraţia de retinol.De exemplu, pasteurizarea laptelui la 72ºC timp de 30 de secunde are ca efect o scădere a concentraţiei retinolului de peste 6%. De asemenea prin pasteurizare au loc şi procese de

izomerizare a retinolului de la forma *trans* la forma *cis*, această izomerizare fiind direct dependentă de intensitatea tratamentului termic. De asemenea, aceeaşi cercetători, au arătat faptul că pasteurizarea nu induce modificări majore în conţinutul în β-carotină a laptelui.

Utilizând aceleaşi extracte, în probele de lapte s-a determinat conţinutul în carotinoide totale şi conţinutul în β-carotină (tabelul 3). Dacă comparăm laptele proaspăt cu cel fiert respectiv cu laptele UHT, observăm că prin aceste tratamente termice conţinutul în carotinoide totale respectiv cel în β–carotină scade accentuat.

Tabel 3: Conţinutul în β-carotină şi carotinoide totale al laptelui proaspăt şi procesat

Conţinutul	Lapte de vacă proaspăt	Lapte de vacă fiert	Pasteurizat (3,5 % grăsime)	UHT (3 % grăsime)
β-carotină	17,8 ± 2,0	7,4 ± 0,7	16,2 ± 1,8	8,2 ± 0,8
Carotenoide totale	19.3 ± 2,4	8,5 ± 0,7	18,2 ± 2,1	8,9 ± 0,9

Un alt parametru determinat în lapte a fost vitamine E, rezultatele studiului cantitativ fiind prezentate în tabelul 4.

Tabel 4: Conţinutul în α-tocoferol al laptelui proaspăt şi procesat

Conţinutul în tocoferol	Lapte de vacă proaspăt	Lapte de vacă fiert	Pasteurizat (3,5 % grăsime)	UHT (3 % grăsime)
În µg/100 g lapte	88.2 ± 2,4	48, 4 ± 1.1	76,3 ± 1.9	65,4 ± 1.9
În µg/g grăsime totală*	21.3 ±.0,6	26.8 ± 0.2	21.8 ± 0.5	21.8 ± 0.6

Determinarea concentraţiei vitaminei E în lapte este foarte importantă. Nivelul concentraţiei vitaminei E în membranele globulelor grase poate fi utilizat ca un marker al stabilităţii oxidative a laptelui [Fox şi Kelly, 2006]. Conţinutul laptelui în tocoferol este dependent de temperatură, fierberea laptelui având ca rezultat o scădere a acestuia de aproape 50%.

Scăderea activităţii antioxidante a laptelui în urma tratamentelor termice are ca efect o creşterea a concentraţiei formelor oxidate ale antioxidanţilor neenzimatici precum şi o creştere a concentraţiei SRO respectiv a produşilor rezultaţi prin degradarea oxidativă a lipidelor. Determinarea gradului de peroxidare lipidic s-a realizat prin monitorizarea concentraţiei malonildialdehidei, rezultatele obţinute fiind prezentate în tabelul 5.

Tabel 5: Concentraţia malonildialdehidei (MDA) în laptele proaspăt şi procesat

Peroxidare lipide	Lapte vacă proaspăt	Lapte fiert	Pasteurizat (3,5 % grăsime)	UHT (3 % grăsime)
MDA nmoli/ 1 ml lapte	13,85 ± 2.03	18,86± 0.03	20,31 ± 0.95	8.40± 0,56

Datele prezentate confirmă rezultatele obţinute de Calligaris şi colab. (2004), aceştia demonstrând faptul că diferitele tratamente termice aplicate laptelui induc creşterea nivelului de peroxidare a lipidelor, datorită degradării biomoleculelor antioxidante din lapte (în special antioxidanţii liposolubili), acestea neputând proteja acizii graşi nesaturaţi componenţi ai lipidelor.

În urma determinărilor efectuate în această lucrare asupra gradului de peroxidare lipidic, am observat faptul că valorile cele mai mari se înregistrează în cazul laptelui pasteurizat iar cele maici valori în cazul laptelui UHT. Pentru laptele UHT valorile determinate au fost chiar mai mici comparativ cu laptele proaspăt. Această valoare extrem de scăzută poate fi explicată prin faptul că în acest tip de lapte destinat consumului apar în mod frecvent adaosuri de substanţe antioxidante. Aceste adaosuri sunt strict necesare ţinând cont de faptul că laptele UHT poate fi păstrat timp îndelungat, la temperatură ambientală. Rezultate asemănătoare au fost prezentate de Fenaillea şi colab. (2006). În studiu efectuat de aceştia asupra laptelui pasteurizat, laptelui UHT şi laptelui praf (instant), valorile cela mai scăzute ale concentraţiei MDA au fost înregistrate la laptele UHT, la polul opus aflându-se laptele instant.

CONCLUZII

- Activitatea lactoperoxidazei (Lpx) prezintă variaţii în funcţie de tipul de procesare a laptelui. Enzima este inactivată prin fierbere, aceeaşi situaţie regăsindu-se în cazul laptelui de tip UHT. În cazul laptelui pasteurizat, enzima îşi pierde mult din activitate dar nu este complet inactivată.
- Conţinutul în retinol al laptelui scade cu aproape 50% în timpul procesului de fierbere în timp ce în cazul laptelui pasteurizat şi UHT pierderile sunt mai reduse. Pasteurizarea nu induce modificări majore în conţinutul în β-carotină a laptelui. Comparând laptele proaspăt cu cel fiert respectiv cu laptele UHT conţinutul în carotinoide totale respectiv cel în β-carotină scade accentuat. Conţinutul laptelui în tocoferol este dependent de temperatură, fierberea laptelui având ca rezultat scăderea acestuia cu aproape 50%.
- Scăderea activităţii antioxidante a laptelui în urma tratamentelor termice are ca efect o creşterea a concentraţiei produşilor rezultaţi prin degradarea oxidativă a lipidelor. Valorile cele mai mari ale nivelului de peroxidare se înregistrează în cazul laptelui pasteurizat iar cele mai mici valori în cazul laptelui UHT. Peroxidarea lipidelor în laptele UHT prezintă valori mai mici comparativ cu laptele proaspăt, ceea ce se explică prin faptul că în acest tip de lapte destinat consumului apar în mod frecvent adaosuri de substanţe antioxidante.

BIBLIOGRAFIE

1. ANDREI SANDA şi PINTEA ADELA, 2004, *Vitamine, enzime, hormoni - analize biochimice*, Editura Clusium, Cluj-Napoca
2. BONINI M., SIRAKI A., BHATTACHARJEE S., MASON R., 2007, *Glutathione-induced radical formation on lactoperoxidase does not correlate with the enzyme's peroxidase activity*, Free Radical Biology & Medicine, 42: 985–992
3. CADENAS E. ŞI PARKER L., 1996, *Handbook of Antioxidants*, New-York - Basel –HongKong
4. CALLIGARIS S., MANZOCCO L., MONICA ANESE, MARIA CRISTINA NICOLI, 2004, *Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk*, International Dairy Journal 14:421–427
5. FENAILLEA F., PARISODA V., VISANIB P., POPULAIREA S ,TABETC J., GUYA P., 2006, *Modications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study* International Dairy Journal, 16: 728–739
6. FOX P., KELLY A., 2006, *Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1*, International Dairy Journal 16: 500–516
7. KUMAR, R., BHATIA, K. L., *Standardization of method for lactoperoxidase assay in milk*, Lait, 79, 269-274, 1999
8. NOZIERE P., GRAULET B., LUCAS A., MARTIN B.,GROLIER P., DOREAU M., 2006, *Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products*, Animal Feed Science and Technology, 131:418–450
9. PINTEA ADELA, ANDREI SANDA, BELE C., 2008, *Biochimie Medicl Veterinară – lucrări practice* , Editura AcademicPres, Cluj-Napoca
10. PUTTER, J., BECKER, R., Peroxidases, in: Bergmeyer H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 3. ediţia a treia, Verlag Chemie, Weinheim, FRG, 1983, 286-293
11. RAYNAL-LJUTOVAC K., PARK Y.W., GAUCHERON F., BOUHALLAB S.,2007, *Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk*, Small Ruminant Research, 68:207–220
12. ROTARU O., MARIAN M., 2005, *Igiena veterinară a produselor alimentare vol.II (lapte, ouă, miere, procesarea şi conservarea alimentelor),* Ed. Risoprint, Cluj-Napoca
13. STEPANIAK L., 2004, *Dairy enzymology,* International Journal of Dairy Technology, Vol 57, No 2/3
14. WHITED L. J., HAMMOND B. H., CHAPMAN K. W., BOOR K., 2002, *Vitamin A Degradation and*

LEPTOSPIROZA LA CAINE SI LA STAPANUL ACESTUIA

PET DOG AND OWNER LEPTOSPIROSIS: A CASE STUDY

ANDREESCU Nicoleta[1], CAPLAN Dana Magdalena[2], IVANA Simona[3]
[1]I.N.C.D.M.I. Cantacuzino Bucuresti
[2]I.N.C.D.M.I.Cantacuzino Bucuresti
[3]FMV Bucuresti
nandreescu@cantacuzino.ro

Four interesting cases of human leptospirosis bacteriologically confirmed: three cases directly transmitted from a suspected and afflicted dog in a small area plus one sporadic case.

Key words: leptospirosis, dog, man

MICROFOCAR

1. E.F. in varsta de 40 ani, de profesie "procesator carne" intr-o fabrica de mezeluri, a fost internat intr-un spital de boli infectioase din Bucuresti, in ultima decada a lunii iunie. Bolnavul a prezentat febra (39˚C) si mialgii generalizate. Testele de laborator clinic (disproteinemie enzimatica, creatinfosfokinaza serica crescuta, VSH crescut, etc) au creat suspiciunea de leptospiroza care a fost confirmata in Centrul national de referinta din Institutul Cantacuzino prin testarea serului sanguin prelevat la circa 7 zile de la debutul bolii. Astfel, Reactia de aglutinare rapida macroscopica (RAR) efectuata cu antigenul Leptospira Patoc inactivat (preparat "in house") a fost pozitiva, iar Reactia de aglutinare ultramicroscopica (RAM) efectuata cu 17 antigene Leptospira vii de tip (preparate "in house") a evidentiat un titru pozitiv de 1/400 pentru anticorpii Pomona si un titru de 1/100 pentru anticorpii Canicola.
2. E.I. in varsta de 36 ani cu aceeasi ocupatie si acelasi loc de munca cu persoana precedenta, a fost internat in acelasi spital in prima decada a lunii iulie pentru febra 40˚C, mialgii generalizate, disconfort digestiv accentuat si laborator clinic asemanator cazului anterior. Cele doua teste serologice specifice leptospirozei au indicat pozitivitate atat pentru RAR cat si pentru RAM; RAM evidentiind un titru pozitiv de 1/400 atat pentru anticorpii Pomona cat si pentru anticorpii Canicola.
3. S.G. in varsta de 42 ani provenit din acelasi loc de munca si cu aceeasi ocupatie ca ceilalti doi bolnavi, a fost internat in acelasi spital in ultima decada a lunii iulie, evidentiind febra 40˚C, cefalee insotita de iritatie meningeana, mialgii si laborator clinic modificat asemenea celorlalti doi. RAR a fost pozitiv, iar RAM in dinamica a evidentiat titruri pozitive de 1/200 pentru anticorpii Canicola si de 1/800, respectiv 1/1600 pentru anticorpii Pomona.
4. R.P. in varsta de 32 ani, coleg de servici cu ceilalti trei bolnavi, a fost internat in acelasi spital in ultima decada a lunii iulie pentru cefalee si mialgii generalizate. Laboratorul clinic a indicat numai o moderata disproteinemie enzimatica. Testele serologice pentru leptospiroza, RAR si RAM efectuate in dinamica au fost negative, in plus in sange si urina nu s-au evidentiat leptospire la examenul ultramicroscopic direct.

Astfel, in primele 3 cazuri, E.F., E.I. si S.G., etiologia leptospirotica a fost sustinuta de profesia si obiectul muncii – cu predilectie carnea de porc, de simptomatologia clinica si alterarea probelor de laborator clinic complementare acestei infectii si de confirmarea prin cele 2 teste serologice specifice: RAR si RAM.

In plus, trebuie mentionate datele epidemiologice concludente reiesite din discutia pe care am purtat-o cu managerul fabricii, de profesie medic veterinar, care s-a deplasat in Centrul nostru pentru a solicita explicatii referitoare la focarul de leptospiroza umana inregistrat in intreprinderea sa. Din anamneza efectuata pe baza faptului ca RAM a evidentiat ca serotip al tulpinii/tulpinilor infectante, nu numai Pomona, fapt explicat de manipularea de catre lucratori a carnii de porc, cat si serotipul Canicola, am aflat ca imbolnavirea lucratorilor a fost precedata de o stare de boala pe care au manifestat-o cei opt caini de paza pe care ii are in curtea fabricii si care nu au fost vaccinati impotriva leptospirozei.

Cainii au prezentat inapetenta alimentara, adinamie accentuata si dorinta de refugiu in adapost. Medicul si-a explicat aceasta stare a cainilor din cauza caldurii. In plus, el a afirmat ca muncitorii adesea se joaca cu cainii si ca uneori le da acestora ca hrana, chiar daca nu este indicat, organe crude de porc.

Discutia s-a incheiat cu promisiunea ca ne va prezenta pentru testare serologica prelevate de la cei opt caini de paza, in scopul instituirii unui tratament etiologic acestora, dar acest fapt nu s-a petrecut.

CAZUL INDIVIDUAL

D.G. in varsta de 47 ani, a fost internat intr-o clinica de chirurgie, cu diagnosticul de abdomen acut si stare toxico-septica, aparute dupa circa 30 ore de la consumarea unei conserve de legume. Dupa 48 de ore de la internare a aparut icterul in urma interventiei chirurgicale pentru abdomen acut. La interventia chirurgicala s-a decelat o intensa iritatie peritoneala cu microfocare de "pseudopurpura hemoragica". Sindromul microhemoragic a condus spre suspectarea de leptospiroza emisa de un specialist infectionist.

Testele serologice specifice efectuate la aproximativ 7 zile de la debut si anume RAR cu antigenul Leptospira Patoc inactivat a fost pozitiva, iar RAM cu 17 antigene Leptospira vii de tip a fost pozitiva la titrul de 1/400 pentru anticorpii Wolffi. In plus, in exsudatul abdominal recoltat din tubul de dren s-au evidentiat leptospire la examenul ultramicroscopic.

Tratamentul etiologic efectuat timp de 14 zile cu Penicilina G in doze medii uzuale a fost completat cu tratamentul antiflogistic cu un antialergic uzual in scopul inactivarii endotoxinei bacteriene.

Anamneza epidemiologica efectuata cu ocazia confirmarii microbiologice, a relevat faptul ca bolnavul locuieste la curte, are animale de casa si curte (porc, vaca, caine), iar in urma cu circa 1 an i-a murit cainele de apartament cu suspiciunea clinica de leptospiroza; cainele mort si animalele de curte nu au fost vaccinate impotriva leptospirozei.

Referitor la debutul simptomatologiei dupa consumarea unei conserve, se cunoaste din literatura de specialitate si din practica, procesul prin care poate fi potentata o leptospiroza latenta (indusa de contactul cu cainele de apartament decedat cu suspiciunea clinica de leptospiroza) de catre germeni gram negativi sau endotoxina lor (posibil prezenti in conserva consumata).

Astfel in cazul D.G. etiologia leptospirotica a fost sustinuta de anamneza epidemiologica, simptomatologia clinica si aspectul macroscopic al peritoneului intravitam, confirmarea prin testele specifice microbiologice si proba terapeutica evidenta (dupa primele administrari de Penicilina G bolnavul a iesit din starea toxico-septica care dura de mai bine de o saptamana).

MATERIAL SI METODA DE LUCRU

Serodiagnosticul consta din:

1. Seroreactia de aglutinare macroscopica rapida pe lama (RAR)

- Se efectueaza cu Antigenul Leptospira Patoc (tulpina saprofita) inactivat termic, preparat “in house” dupa un brevet de inventie OSIM (1990) al Centrului de Referinta.
- Este un test gen specific de orientare care arata daca bolnavul are leptospiroza fara a stabili serotipul tulpinii infectante.
- Este indicat din a 4 – 6 a zi de boala si retrospectiv pana la 5 ani de la infectia initiala.
- Poate fi folosit si in diagnosticul de orientare veterinar; informatia se bazeaza pe rezultatele obtinute la serotestarea a 570 animale domestice bolnave (suine, bovine, ovine, cabaline, canine) efectuata impreuna cu Institutul Pasteur Bucuresti.
- Efectuare: punerea in contact pe o lama microscopica a serozitatii de cercetat si a antigenului, ambele ca atare nediluate si in parti egale (circa 0,03 ml – o picatura din fiecare).
- Citire: dupa circa 40 secunde, timp in care se imprima lamei miscari circulare, reactia se citeste cu ochiul liber in fata unei lampi de masa, intr-un spatiu sau pe un fond intunecat.

- In cazul unei reactii pozitive, se evidentiaza aparitia spontana sau in timpul miscarii, a grunjilor caracteristici aglutinarii corpusculare, care se pot dispune la periferia picaturii din cauza greutatii complexelor anticorp -antigen specifice.
- In cazul unei reactii negative, lichidul opalescent ramane ca atare dupa perioada de amestec de circa 40 secunde.
- In fiecare zi de lucru se efectueaza in primul rand testarea serurilor martor 2 pozitive si 2 negative.

2. Seroreactia de aglutinare ultramicroscopica (RAM)

- Se efectueaza cu 9 antigene Leptospira vii, specifice de tip, preparate "in house" in mediul lichid Korthof imbogatit cu ser normal de iepure, din tulpini de referinta internationala, serotipurile icterohaemorrhagiae, canicola, pomona, grippotyphosa, wolffi, hebdomadis, sejroe, australis, hardjo; dupa caz, acestora li se adauga si serotipurile saxkoebing, borincana, hyos, batavie, javanica, autumnalis, balum, pyrogenes, cynopteri.
- Este un test de confirmare prin evidentierea serotipului tulpinii infectante, indispensabil efectuarii unei anchete epidemiologice eficiente.
- Este indicat din a 5 – 6 a zi de boala si retrospectiv pana la cativa zeci de ani.
- Efectuare: punerea in contact pe o lama microscopica a serozitatii de cercetat (diluata in tub cu ser fiziologic intre 1/10 – 1/50 in functie de varsta, greutate corporala, manifestare clinica, stadiu de infectie sau boala, etc) cu fiecare antigen ca atare, in parti egale (circa 0,03 ml – o picatura din fiecare).
- Pentru cazurile pozitive in etapa anterioara, se continua testarea prin punerea in contact pe o lama microscopica a serozitatii de cercetat diluata binar pornind de la dilutia initiala si efectuandu-se minimum trei dilutii, cu fiecare antigen in parte pentru care reactia a fost pozitiva in prima etapa.
- Citire: dupa un repaus de 30 minute intr-o camera umeda la temperatura ambianta, citirea se efectueaza la microscopul cu campul intunecat.
- Rezultatul se noteaza astfel:

(-) toate leptospirele vizibile pe campul microscopic sunt libere, mobile, neaglutinate.

(±), (+), (++) in functie de 25, 50, 100% leptospire aglutinate.

- Interpretarea reactiei:

O reactie pozitiva care nu necesita repetare in dinamica, trebuie sa prezinte o aglutinare de minimum un plus la dilutia minima de 1/100 – 1/200 (in functie de dilutia initiala).

- In fiecare zi de lucru se efetueaza in primul rand testarea a minimum doua seruri martor pozitive, astfel incat sa verificam pozitivitatea pentru cele 9 antigene folosite si a unui ser martor negativ pentru verificarea absentei hiperreactivitatii celor 9 antigene folosite.

BIBLIOGRAFIE

1. Postic D. and col. "Biological diagnostic leptospirosis. Metodes de laboratoire". Edition 2000, Institut Pasteur Paris.
2. Andreescu Nicoleta. "Leptospiroza umana – o infectie grava care se aseamana cu multe afectiuni." Monografie 101 pagini. Editura National Bucuresti, 2003.
3. Andreescu Nicoleta. "Identificarea leptospirelor." Cap.37.1. pag. 935-944. "Tratat de Microbiologie clinica", sub redactia D. Buiuc si M.Negut, ed. II, Editura Medicala Bucuresti, 2008.

HEPATITA E – O NOUĂ ZOONOZĂ PREZENTĂ ÎN ROMÂNIA

HEPATITIS E – A NEW ZOONOSIS PRESENT ALSO IN ROMANIA

ANIŢĂ Adriana Elena
FMV Iaşi
adrianalazar79@yahoo.com

Hepatitis E is a liver disease caused by the hepatitis E virus (HEV), which is typically spread through contaminated food or water. HEV is a nonenveloped small virus with an approximately 7,5 kb single-stranded positive sense RNA genome containing 3 open freames, classified in the genus Hepevirus of the family Hepeviridae. At present, four genotypes are known, of which genotype 3 causes sporadic autochthonous human hepatitis E cases in Europe. Pigs, either domestic or feral, can be infected with strains of HEV genotypes 3 that are almost indistinguishable from some human isolates, showing an increasing evidence that hepatitis E is a zoonosis.

A survey to detect antibodies against HEV was undertaken on 164 swine serum samples and 67 human serum collected from the region of east of Romania. Swine serum samples were tested for IgG anti-HEV by immunoblot and human samples were tested using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The presence of IgG anti-HEV was detected in 71 swine serums and 4 human serums.

Key words: hepatitis E, swine, IgG anti-HEV

Hepatita E (HEV), cunoscută anterior ca hepatita non-A, non-B, este o boală infecţioasă virală cu manifestări clinice şi aspectele epidemiologice ale unei hepatite acute. Este o boala endemo-epidemică, legată de riscul contaminării fecale, ce evoluează îndeosebi în regiuni ale lumii în care igiena colectivă este deficitară.

Virusul hepatitei E este clasificat în noua familie *Hepeviridae,* genul *Hepevirus* (Emerson şi col., 2005). Virusul hepatitei E (VHE) este o particulă relativ stabilă, rezistentă la acţiunea sucurilor gastrice şi a sărurilor biliare, ceea ce explică supraviețuirea sa în mediul intestinal (Purcell şi Emerson, 2008). Este un virus de dimensiuni mici, cu un diametru cuprins între 27 şi 33 nm, cu o structura icosaedrală, fără anvelopă, ce prezintă protuberanțe în formă de spiculi vizibile la suprafață (Balayan şi col., 1983). Compararea secvențelor genomice şi analizele filogenetice au arătat ca virusul hepatitei E este destul de stabil genetic, identitatea nucleotidelor tulpinilor izolate dintr-un singur focar fiind foarte mare (Arankalle şi col., 2001).

Această boală se diagnostică regulat în multe țări, în urma anchetelor seroepidemiologice, cu descrierea de noi cazuri sporadice în țările industrializate şi focare endemice sau chiar epidemice în țările în curs de dezvolatre (Aggarwal R., 2000). Rata mortalității în cadrul pacienților cu hepatită E este de regulă între 1% şi 3%, dar poate depăşi 20% în cazul femeilor gravide, infectate în special în al treilea trimestru de sarcina (Worm şi col., 2002)

In țările industrializate principalele cazuri umane diagnosticate au apărut inițial după efectuarea de călătorii în zonele endemice. Cazuri autohtone au fost descrise din ce în ce mai frecvent la persoane care nu au efectuat călătorii înafara granițelor țării lor cum ar fi: SUA, Spania, Grecia, Italia, Franța, Germania şi Austria, Marea Britanie, țări din regiunea balcanică. Analizele moleculare au demonstrat că izolatele virale din aceste țări formează un grup de tulpini de VHE care sunt divergente antigenic față de tulpinile izolate în țările în care hepatita E este endemică (Girones, 2003).

De exemplu, tulpinile suine izolate în S.U.A. şi țările europene fac parte din genotipul III. Tulpinile virale umane din S.U.A. sunt mult mai înrudite cu tulpinile suine din S.U.A. (Mushahwar I., 2008). În mod similar, tulpinile de origine umană izolate în Spania sunt mai mult înrudite cu tulpinile virale spaniole de origine porcină. Deasemenea, în Marea Britanie s-a izolat o tulpină de origine umană care are aceeaşi secvența de aminoacizi ca cea suină. În Japonia, o tulpină virală indigenă de HEV izolată de la un pacient din Hokkaido în 1997 prezintă o identitate de 100% cu secvența unei tulpini virale HEV izolată de la un porc din Hokkaido în 2002, în această țară tulpinile virale umane şi suine aparținând genotipurilor III şi IV. Mai recent, evidențierea directă a transmiterii zoonotice a

virusului hepatitei E a fost raportată la doi pacienţi care au consumat ficat crud de porc (Takahashi M, 2004).

Luând în considerare toate aceste date se poate considera că suinele reprezintă rezervorul animal al virusului, acestea asigurând transmiterea zoonotică a VHE la om. Rezultatele investigaţiilor efectuate de Dobrenciuc şi col.(2001) în Republica Moldova au indicat faptul că numărul persoanelor la care s-au identificat anticorpi anti-VHE şi care lucrau în crescătorii de suine a fost de 1,46 -1,51 ori mai mare decât al donatorilor de sânge găsiţi seropozitivi, iar 51% dintre crescătorii şi îngrijitorii de suine au fost găsiti seropozitivi, în comparaţie cu 25% identificaţi în lotul de subiecţi de control. Aceste argumente conduc la concluzia ca VHE trece bariera de specie, cu risc profesional crescut.

În anii 1990 grupul animalelor receptive la infecţia cu HEV şi capabile să dezvolte anticorpi anti-HEV a inclus şi suinele, bovinele, oile şi caprele, mieii, rozătoarele şi păsările. În SUA, mai mult de 80% din porcii cu vârstă mai mare de trei luni prezintă anticorpi anti-HEV (Meng şi col., 1997). Trei specii de şobolani sălbatici au fost depistate în SUA că posedă anticorpi anti-hepatita E, într-un procent variind de la 44% la 90% (Kabrane-Lazizi şi col., 1999). În Vietnam, anticorpi anti-hepatita E au fost depistaţi la 44% dintre găini, la 36% dintre porci, la 27% dintre câini şi la 9% dintre şobolani. În Turkmenistan, între 42% dintre oi şi 67% dintre capre au fost depistate seropozitive. În Somalia, Tajikistan şi Turkmenistan peste 29% dinte bovine şi în Ucraina 12% dintre vaci au fost depistate că posedă anticorpi anti-HEV (Kerri Lee Cooper, 2004). Anchete seroepidemiologice recente (2007) efectuate în Spania în 41 de unităţi de creştere a porcinelor au demonstrat pozitivitatea a 40 dintre ele (97.6%). Cercetările au evidenţiat procentul crescut al scroafelor purtătoare de virus (60.8%), comparativ cu 36.2% al purceilor în vârstă de până la 6 săptămâni (pigprogress.net).

Rezultate similare s-au constatat şi în alte regiuni, în care hepatita E la om evoluează endemic sau nu, sugerând că virusul hepatitei E se găseşte într-o manieră ubicvitară în crescătoriile de suine de pe întreg globul.

Detecţia virusului la porc şi la alte specii de animale domestice şi sălbatice indică rolul potenţial al rezervorului animal în apariţia acestei zoonoze. Acest lucru a fost demonstrat în urma identificării suşelor porcine în regiunile fără endemicitate a VHE (SUA, Spania, Olanda), aceste tulpini avand o identitate nucleotidică de 92-94 % cu izolatele umane (Arankalle şi col., 2001). Numeroase studii epidemiologice realizate la mistreţii din fauna silvatică au evidenţiat prezenţa infecţiilor cu virusul hepatitei E (S. Kaci şi col., 2007).

MATERIAL ŞI METODĂ

În cadrul cercetărilor au fost prelevate un număr de 112 probe de sânge de la suine din gospodăriile populaţiei şi 140 se probe de sânge de la suine din sistemul intensiv. Dintre acestea, un număr de 164 de probe au fost testate prin metoda imunoblot (western blot) pentru evidenţierea prezenţei IgG anti-virusul hepatitei E. Deasemenea au fost testate un număr de 67 seruri umane, din care 37 de la femei şi 30 de la bărbaţi din diferite regiuni ale Moldovei. Serurile au fost puse la dispoziţie pentru investigaţii de către Autoritatea de Sănătate Publică Iaşi (ASP).

Toate probele de ser au fost congelate la temperatura de -20^{0}C şi stocate până în momentul testării pentru evidenţierea IgG anti-virusul hepatitei E. Serurile de origine porcină au fost testate prin metoda imunoblot, iar serurile umane au fost testate utilizând un kit ELISA indirectă. Serurile umane reacţionate pozitiv prim metoda imunoenzimatică au fost retestate pentru confirmare prin metoda imunoblot.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Cercetările au constat în prelevarea unui număr de 252 probe de sânge de la suine din gospodăriile populaţiei şi din sistemul intensiv. Dintre acestea, un număr de 164 de probe au fost testate prin metoda imunoblot (western blot) pentru evidenţierea prezenţei IgG anti-VHE, anume 95 probe prelevate de la suine crescute în sistem intensiv şi 69 provenite din sistemul extensiv de creştere.

Tabel nr.1

Rezultatele testării serologice a probelor recoltate din sistemul intensiv de creştere

Nr. crt.	**Unitatea de creştere**	**Număr probe testate**	**Număr probe rezultate pozitive**	**Vârsta animalelor**
1	**A**	15	**1**	6 luni
2	**B**	13	**11**	5 luni
3	**C**	9	**0**	6 luni
4	**D**	20	**12**	6 luni
5	**E**	7	**0**	?
6	**F**	5	**1**	1-1,5 ani
7	**G**	26	**12**	6 luni-1an şi 5 luni

Animalele de la care au fost prelevate probe de sânge au avut vârsta cuprinsă între 5 luni şi un an şi jumătate. În urma testării au fost depistate ca fiind seropozitive un număr de 37 de probe. Din analiza rezultatelor se observă că în două ferme nu s-a evidenţiat prezenţa IgG anti-VHE, în două crescătorii a fost identificat câte un caz seropozitiv, respectiv unul din 15 seruri testate şi unul din 5 seruri testate. În trei crescătorii s-a evidenţat o valoare mai mare a seropozitivităţii şi anume: 11 probe din 13 analizate (84,61%) în ferma B, 12 probe din 20 (60%) în ferma D şi 12 probe din 26 testate (46,1%) în ferma G.

Tabel nr.2

Rezultatele testării serologice a probelor recoltate din gospodăriile populaţiile

Nr. crt	Localitate	Număr probe prelevate	Număr de probe testate	Număr probe rezultate pozitive
	Ţibana	9	**9**	**3**
	Şipote	15	**6**	**6**
	Dagîţa	15	**8**	**4**
	Erbiceni	15	**6**	**2**
	Aroneanu	7	**7**	**0**
	Romaneşti	15	**3**	**2**
	Golăeşti	10	**8**	**6**
	Dobrovat	3	**3**	**2**
	Movileni	8	**8**	**3**
	Ţuţora	15	**11**	**6**

Din totalul de 69 probe de ser analizate au fost depistate ca seropozitive un număr de 34 de seruri (49,28%) şi 35 de probe rezultate negativ (50,72%), distribuţia lor fiind reprezentată în următoarea figură.

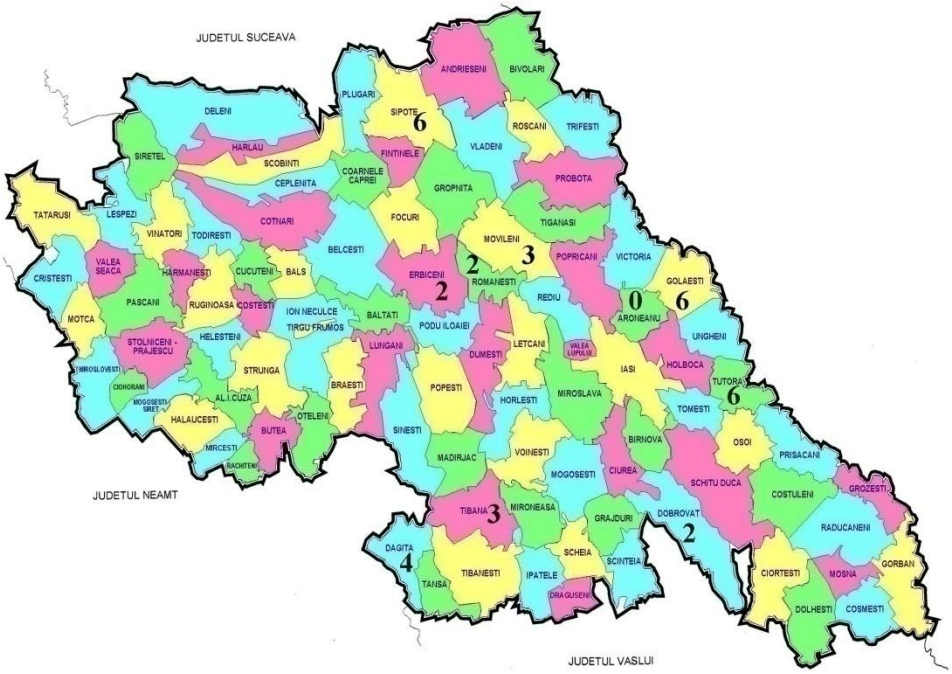


Fig. nr. 1. Distribuţia suinelor din gospodăriile populaţiei identificate seropozitive prin metoda imunoblot

Deasemenea au fost testate un număr de 67 seruri umane, din care 37 de la femei şi 30 de la bărbaţi din diferite regiuni ale Moldovei. Serurile au fost puse la dispoziţie pentru investigaţii de către Autoritatea de Sănătate Publică Iaşi (ASP). Probele provin de la persoane cu vârste cuprinse între 20 şi 78 de ani, ce manifestau semne clinice de hepatită acută. În urma testării acestora, folosind kitul ELISA IgG anti-HEV (Genelabs-MP Biomedicals) au fost identificate 4 seruri pozitive (3 probe provenite de la pesoane din judeţul Iaşi şi o probă recoltată de la o persoană din judeţul Botoşani). Cele patru seruri au fost apoi retestate prin metoda imunoblot pentru confirmarea pozitivităţii.

Tabel nr. 3

Serurile umane testate prim metoda imunoenzimatică şi imunoblot

Nr. crt.	**Domiciliu**	**Sex**	**Vârstă (ani)**	**Rezultat ELISA IgG anti-VHE**	**Rezultat Imunoblot**
	Suceava	F	21	-	
	Iaşi	M	60	-	
	Iaşi	M	25	-	
	Butea-Iaşi	F	65	+	+
	Iaşi	F	37	-	
	Iaşi	F	53	-	
	Iaşi	F	20	-	
	Ciurea- Iaşi	F	42	-	
	Voineşti- Iaşi	M	78	-	
	Iaşi	F	49	-	
	Iaşi	F	32	-	
	Miroslva- Iaşi	M	27	-	
	Huşi-Vaslui	F	50	-	
	Şipote- Iaşi	F	10	-	
	Pd.Iloaiei	M	34	-	
	Miroslava- Iaşi	F	20	-	
	Roman-Neamţ	F	31	-	
	Iaşi	M	68	-	
	Iaşi	M	35	-	
	Ţibana- Iaşi	M	20	-	

Nr. crt.	Domiciliu	Sex	Vârstă (ani)	Rezultat ELISA IgG anti-VHE	Rezultat Imunoblot
	Ciurea- Iaşi	M	45	-	
	Iaşi	F	30	-	
	Bacău	F	25	-	
	Iaşi	F	28	-	
	Iaşi	F	53	-	
	Iaşi	M	38	-	
	Bacău	M	27	-	
	Iaşi	M	48	-	
	Trifeşti- Iaşi	F	25	-	
	Iaşi	F	47	-	
	Iaşi	M	20	-	
	Iaşi	M	23	-	
	Ţigănaşi- Iaşi	F	27	-	
	Cristeşti- Iaşi	F	55	+	+
	Sireţel- Iaşi	F	34	-	
	Iaşi	F	39	-	
	Iaşi	M	51	-	
	Popricani-Iaşi	F	30	-	
	Gherăieşti-Neamţ	F	31	-	
	Iaşi	M	24	-	
	Iaşi	F	64	-	
	Frătăuţii vechi-Suceava	M	32	-	
	Iaşi	F	56	-	
	Roman-Neamţ	F	31	-	
	Suceava	F	22	-	
	Trifeşti- Iaşi	F	21	-	
	Iaşi	F	64	-	
	Bacău	M	23	-	
	Pd.Iloaiei	M	27	-	
	Ţibana- Iaşi	M	70	-	
	Iaşi	M	72	-	
	Moţca- Iaşi	M	78	-	
	Botoşani	F	48	-	
	Tg.Frumos	M	56	-	
	Movileni-Iaşi	F	60	+	+
	Iaşi	F	38	-	
	Iaşi	F	52	-	
	Fălticeni-Suceava	M	28	-	
	Zorleni-Vaslui	M	46	-	-
	Buhăeşti-Vaslui	F	29	-	
	Lungani-Iaşi	F	27	-	
	Iaşi	M	21	-	
	Suceava	F	40	-	
	Popricani	M	20	-	
	Iaşi	M	27	-	
	Iaşi	M	46	-	
	Rădăuţi Prut-Botoşani	M	56	+	**slab pozitiv**

Toate cele patru seruri seropozitive provin de la persoane cu vârsta peste 50 de ani, respectiv trei femei şi un bărbat. Aceste rezultate sunt similare cu cele descrise în literatura de specialitate, în ţările industrilizate riscul de infecţie cu virusul hepatitei E crescând odată cu vârsta.

Din localitatea Movileni, unde a fost identificată una din cele patru probe umane seropozitive, au fost testate nouă seruri prelevate de la suine din gospodăriile populaţiei. Cele nouă probe au fost testate prim metoda imunoblot cu scopul evidenţierii IgG anti-VHE. Din cele nouă probe de origine porcină testate, o probă a rezultat intens pozitivă şi două probe mediu pozitive, ceea ce poate sugera

o posibilă transmitere interspecifică a infecţiei, urmând ca în cadrul cercetărilor ulterioare să realizăm investigaţii aprofundate, bazate pe metode statistice de eşantionare şi interpretare.

CONCLUZII

1. Faptul că hepatita E la suine şi la om a fost descrisă în multe ţări din diverse continente precum şi în unele limitrofe României, ne-a determinat să întreprindem investigaţii serologice preliminare la suine din diverse categorii de exploataţii situate în nord-estul României.
2. Cele 34 de seruri de porc prelevate din sistemul extensiv identificate ca fiind pozitive (49,28% din 69 de seruri testate) confirmă prezenţa infecţiei cu virusul hepatitei E în gospădăriile populaţiei.
3. Din totalul de 95 de porbe de sânge de porc prelevate din crescătorii şi testate prin metoda western blot au fost identificate ca fiind seropozitive 37 (38,94%), ceea ce demonstrează prezenţa infecţiei cu VHE în sistemul de creştere intensiv.
4. Evidenţierea infecţiei la om în aceleaşi localităţi în care au fost depistaţi porci seropozitivi poate sugera o posibilă transmitere interspecifică a infecţiei.

MULŢUMIRI

Mulţumesc Doamnei Dr. Nicole Pavio şi Domnului Prof. Dr. Marc Eloit din cadrul Laboratorului de Virusologie 1161- Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort Franţa pentru ajutorul acordat în oferirea protocolului de testare a serurilor porcine şi Doamnei Dr. Elena Duca de la Autoritatea de Sănătate Publică Iaş pentru furnizarea serurilor umane.

BIBLIOGRAFIE

1. Aggarwal R., Krawczynski K. (2000) – Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. Journal of Gastroenterology and Hepatology nr.15, pg. 9-12.
2. Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM, Gandhe SS, Chobe LP, Rautmare SS, Mishra A, Padbidri VS (2001)- Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. Journal of Viral Hepatitis, 8: 223-227.
3. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF (1983) – Evidence for a virus non-A, non-b hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology, 20: 23-31
4. Boutrouille Annie, Bakkali-Kassimi L., Crucière Catherine, Pavio Nicole - Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in french blood donors. 2007. Journal of Clinical Microbiology, vol. 45, no.6, p. 2009–2010.
5. Clemente-Cesares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martin M, Mas S, Girones R (2003) – Hepatitis E virus epidemiology in industrialized country. Emerging Infectious Disease, 4: 448-454.
6. Drobeniuc J., Favorov M.O., Shapiro C.N. (2001) - Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. Journal of Infectious Diseases, nr.184, pg. 1594-1597.
7. Emerson S.U., Arankalle V.A., Purcell R.H. (2005) – Thermal stability of hepatitis E virus .Journal of Infectious Diseases, nr.192, pg. 930-933.
8. Kabrane-Lazizi Y., Fine J.B., Glass G.E. (1999) - Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, nr. 61(2), pg. 331-335.
9. Kaci S., Nockler K., Johne R. (2007) - Detection of hepatitis E virus in archived german wild boar serum samples. Veterinary Microbiology.
10. Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Haynes J.S. ,Thacker B.J., Emerson S.U. (1997) – A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, nr. 94, pg. 9860–9865.
11. Mushahwar Isa K. (2008) - Hepatitis E virus: Molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. Journal of medical Virology, nr. 80 (4): 646 – 658.
12. Purcell R.H., S.U. Emerson (2008) - Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease, Journal of Hepatology.
13. Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H (2004) - Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deers and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. Journal of Clinical Microbiology, 42 (11); 5371-5374.
14. Worm H. C., Van der Poel W. H., Brandstatter G. (2002) - Hepatitis E: an overview. Microbes. Infect., nr. 4 pg. 657-666.

OBSERVAŢII DINTR-UN FOCAR DE RINOTRAHEITA INFECŢIOASĂ BOVINĂ DIN JUDEŢUL IAŞI

[1]OBSERVATIONS FROM AN OUTBREAK OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS IN IAŞI COUNTY

ANIŢĂ D. C.[1], MERTICARIU Ştefania [2], SAVUŢA Gh.[1]
[1] FMV Iaşi
[2]L.S.V.S.A. Iaşi

The Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Pustular Vulvovaginitis (IBR/IPV), sometimes called Red nose, is an infectious disease of cattle due to the bovine herpesvirus-1. The virus can infect the upper respiratory tract or the reproductive tract. Clinical signs of the infection include symptoms of inflammatory processes on both respiratory and genital organs, and abortion. Young calves can develop a systemic disease affecting visceral organs.

Only a single serotype of BHV-1 is recognized, but subtypes of BHV-1 have been described. These types are referred to as BHV-1.1 (respiratory subtype), BHV-1.2 (respiratory and genital subtype). BHV-1 is able to establish a latent infection in the trigeminal or sacral ganglia. Animals with a latent BHV-1 infection may serve as a source of infection for susceptible animals if and when the virus is reactivated. The infection is transmitted mainly through respiratory, ocular or genital secretions in a direct contact between animals. However, the infection can also spread through fresh or frozen semen from infected bulls.

Epidemiological investigations were undertaken in a farm of dairy cows, where were registered abortion, respiratory signs in calves.161 samples were collected and then tested using HerdChek Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)/Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) gB Antibody ELISA Test Kit (IDEXX). The presence of IgE anti-BHV1 was detected in 100 bovine serums (62.11%), 90 cows and 10 calves. Healthy animals were vaccinated using a polyvalent vaccine (against IBR-IPV, BVD-MD, PI-3). After vaccination were collected 15 blood samples to evaluate the immune response using two indirect ELISA kits (for gB anti-IBR and antibodies anti-BVD).*

Key words: bovine, IBR, serology

Rinotraheita infecţioasă bovină este o boală infecţioasă ce afectează bovinele de toate vârstele. Perioada de incubaţie variază de la 2 la 4 zile, virusul fiind prezent în secreţiile nazale încă de la 24 ore de la infecţie. Herpesvirusul bovin tip 1 (BHV-1) produce infecţii care pot îmbrăca diferite forme clinice: rinotraheită, vaginită pustuloasă, balanopostită, conjunctivită, avort, enterită, encefalită şi infecţii generalizate la viţeii de 1-3 săptămâni. Infecţia cu BHV-1 se produce viţeii ce posedă anticorpi colostrali, aceştia manifestând boala după vârsta de 3-4 luni (Thiry E., 2000).

Rinotraheita infecţioasă bovină poate evolua clinic sau subclinic. Într-un efectiv infectat morbiditatea ajunge la 100%, însă mortalitatea poate atinge valoarea de 15%, mai ales dacă apar complicaţii. Evoluţia clinică debutează cu febră, depresie, inapetenţă şi apariţia jetajului, care iniţial este seros apoi devine mucopurulent. Mucoasa nazală este hiperemiată, putând prezenta ulcere mai greu observabile în cavitatea nazală. Aerul expirat poate avea un miros fetid Ulterior apare dispnea, respiraţie cu botul deschis, salivaţie şi tuse umedă. Formele acute necomplicate evoluează timp de 10-15 zile.

Deasemenea poate să apară conjunctivita uni sau bilaterală, însoţită ades de catar ocular. La vacile adulte poate să apară gastroenterita, iar la viţeii nou-născuţi poate evolua generalizat, aceasta din urmă terminându-se de cele mai multe ori fatal. La femele gestante infectate poate apare avortul în lunile 4-7 de gestaţie (Perianu T., 2005).

Anticorpii specifici anti BHV-1 pot fi detectaţi la 7-10 zile post infecţie, putând fi puşi în evidenţă şi după evoluţia clinică a bolii şi în perioada de latenţă a virusului. Evidenţierea markerilor umorali specifici infecţiei cu BHV-1 pot fi evidenţiaţi în probele de sânge şi lapte individual şi de colectură (Boelaert F., 2005). Tehnica imunoenzimatică este foarte larg utilizată datorită uşurinţei de utilizare, rapidităţii, costului şi adaptării analizării unui număr mare de eşantioane.

[1] Cercetări finanţate prin grantul PN2 51-004/2007

MATERIALE ŞI METODĂ

Pentru detectarea anticorpilor anti-BHV 1 au fost prelevate un număr de 161 de probe de sânge in luna iulie 2007, 151 de la adulte si 10 probe de la viţei. După exprimarea serului, acesta a fost prelevat şi stocat la congelator la temperatura de -20^{0}C până în momentul testării. Pentru examenul ELISA am folosit testul "HerdChek Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)/Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) gB antibody ELISA". După vaccinarea efectivului cu un vaccin trivalent (IBR, BVD, PI3), s-au recoltat probe de sânge prin sondaj de la un număr 15 animale pentru evidenţierea anticorpilor postvaccinali. Pentru această testare s-au utilizat două teste imunoenzimatice : HerdChek Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)/Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) gB antibody ELISA (IDEXX) şi BVD-MD-BD P80 ELISA (POURQUIER). Protocolul de lucru a respectat indicaţiile şi etapele prevăzute în manualul kitului.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Investigaţiile au fost realizate într-o ferma zootehnică din judeţul Iaşi, în care s-au importat în lunile mai-iunie 2007 un număr de 72 vaci rasa Holstein din Cehia, Olanda şi Germania. După introducerea animalelor în efectiv au apărut semne clinice similare celor din rinotraheita infecţioasă bovină. Bovinele adulte (vaci de lapte) afectate, prezentau următoarele semne clinice: hipertermie, jetaj seros, unele prezentau jetaj mucopurulent, cu miros fetid, salivaţie abundentă, conjunctivită cu epiforă, respiraţia era accelerată, dispneică, chiar bucală. Unele prezentau tuse umedă şi inflamaţia tegumentului din regiunea botului. Iar la necropsie s-a observat bronhopneumonie în diferite stadii evolutive, zone de emfizem pulmonar grav, hemoragii, iar organele parenchimatoase erau degenerate.

Fig.1 Prezenţa jetajului nazal seros

Fig.2 Prezenţa jetajului nazal mucopurulent

Fig.3 Emfizem pulmonar grav in lobii diafragmatici

Fig.4 Pulmon de vaca. Brohopneumonie purulentă

Viţeii infectaţi erau cahectici, cu grave probleme respiratorii, prezentau congestia mucoaselor buco-nazale şi leziuni ulcerative.

Rezultatele examenului serologic executat pentru testarea celor 161 de probe din focar sunt prezentate în tabelul nr.1.

Tabel nr.1
Rezultatele testării serologice

Ferma	Numărul de probe recoltate	Numărul de probe pozitive	Numărul de probe negative	Numărul de probe dubioase
A	151 probe de la bovine adulte	90	60	1
	10 probe de la viţei	10	0	0

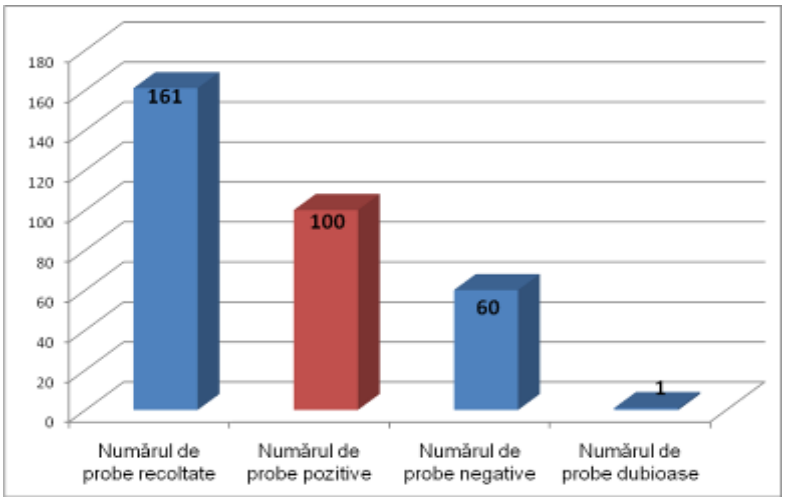


Fig. 5 Reprezentarea grafică a rezultatelor testării serologice

Din analiza rezultatelor obţinute se constată ca din cele 161 de probe testate un număr de 100 (62,11%) au reacţionat pozitiv pentru rinotraheita infecţioasă bovină, şi anume 90 de bovine adulte şi zece viţei. Procentul mare de detecţie ne arată caracterul enzootic al bolii, cu mare difuzibilitate în focar şi se colaborează şi cu semnele clinice caracteristice pentru rinotraheita infecţioasă întâlnite la animalele testate.

După aplicarea vaccinului trivalent s-au recoltat un număr de 15 probe de sânge pentru evidenţierea prezenţei anticorpilor postvaccinali. Prelevarea de probe s-a realizat în luna martie 2008 constând în şapte probe de la vaci şi opt probe de la viţei. La toate probele testate s-a evidenţiat un rezultat pozitiv (valoare asemănătoare controlului pozitiv) la ambele teste serologice, demonstrând instalarea unui nivel crescut de anticorpi protectori.

CONCLUZII

1. Datorită înregistrării unui număr crescut de cazuri de bovine ce prezentau semne respiratorii s-a întreprins o anchetă seroepidemiologică în ferma A, din judeţul Iaşi, în urma căreia s-a evidenţiat prezenţa anticorpilor specifici anti-IBR.
2. Examenul serologic prin testul ELISA (kit IDEXX HerdCheck IBRgB) a evidenţiat o prevalenţă de 62,11% din 161 de probe supuse testării.
3. Titrurile postvaccinale de anticorpi anti IBR şi anti-BVD s-au menţinut la un nivel corespunzător pentru protecţia efectivului.
4. In continuare vor supraveghea unitatea de creştere prin controale periodice pentru a observa persistenţa anticorpilor protectori anti-IBR.

BIBLIOGRAFIE

1. Boelaert F., N. Speybroeck, A. Kruif, M. Aerts, T. Burzykowski, G. Molenberghs, D.L. Berkvens, 2005, Risk factor for bovine herpesvirus 1 seropositivity, Prev. Vet. Med. 96, 285-295.
2. Thiry E., (2000) – Maladies virales des ruminants. Collection virology clinique. Maisons – Alfort
3. Thiry E., M. Lemaire, 2001, Infection des ruminants par des herpesvirus hétérologues. Le Point Vét., 217, 20-25.
4. Perianu T., 2005- Boli infecţioase ale animalelor. Viroze II. Editura Universitas XXI, Iaşi, 2005
5. Pourquier P., 1996 - IBR: utilisation comparee du lait et du serum, GDS-Info 123, 17-22.
6. Vasiu C., 2003 - Viroze si boli prionice la animale, Ed. Neremia Napocae, Cluj – Napoca,
7. ***** Programul acţiunilor de supraveghere, prevenire şi control al bolilor la animale, ANSVSA Bucureşti, 2007.
8. ***** O.I.E., Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004, www.oie.int.

INVESTIGAŢII SEROEPIDEMIOLOGICE PRIVIND RINOTRAHEITA INFECŢIOASĂ BOVINĂ LA FERME ORGANIZATE DIN BAZINUL SUCEVEI

SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS REGARDING INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS IN FARMS FROM SUCEAVA AREA

ANIŢĂ D. C.
FMV Iaşi

Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) is a highly contagious, infectious disease that is caused by bovine herpesvirus-1 (BHV-1). In addition to causing respiratory disease, this virus can cause conjunctivitis, abortions, encephalitis and generalized systemic infections. BHV-1 is capable to produce latent infections. The IBR virus can persist in a clinically recovered animal for years. The virus remains inactive and "hidden" following an infection and is thought to be re-activated by stresses applied to the animal (stress transport or corticosteroids treatment). Once the virus becomes reactivated, the infected animal sheds the IBR virus through secretions of the eyes, nose and reproductive organs. Animals infected with these "hidden" viruses are frequently considered to be reservoirs of the disease. Animals clinically sick with IBR also spread the virus via secretions of the eye, nose and reproductive organs.

In allowance with the seroprevalence of the BHV-1 infections, the eradication programs are based on the detection and elimination of the seropositive animals or using repeated vaccinations. Because the use of the vaccines do not prevent the infection with BHV-1 and establishment of the latent infection, the screening and eradication programs of IBR will take several time till this well adapted bovine virus will be eradicated.

The investigations were undertaken in ten farms situated in Suceava area, consisting in collecting 163 serum samples. The serums were tested for IgE anti-IBR using HerdChek infectious bovine rhinotracheitis (IBR)/bovine herpesvirus-1 (BHV-1) gE antibody ELISA test kit (produced by ELISA). The presence of IgE anti-BHV1 was detected in 61 bovine serums (37.42%).*

Rinotraheita infecţioasă bovină (IBR) este o boală virală produsă de herpesvirusul bovin tip 1(BHV-1) din familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*. Odată pătruns în organism virusul se multiplică masiv la nivelul porţii de intrare, şi anume în celulele epiteliale ale mucoasei respiratorii (tractusul respirator anterior) sau ale mucoasei genitale. Diseminarea în organism a agentului viral se poate realiza pe trei căi: sangvină, filete nervoase şi transmiterea de la o celulă la alta (intercelular) (Pastoret şi col., 1988).

Infecţia primară a animalelor adulte se caracterizează prin producerea unei viremii tranzitorii urmată de localizarea secundară la nivelul organelor ţintă de la nivelul tubului digestiv, fetus, ovare, glandă mamară. La viţeii nou-născuţi ce nu sunt protejaţi prin imunitatea colostrală, infecţia poate evolua generalizat ducând la moartea animalului (Wyler şi col., 1989)

În timp ce virusul se multiplică la nivelul mucoaselor, el infectează deasemenea filetele nervoase periferice şi avansează pe cale axonală retogradă până la nivelul ganglionilor nervoşi regionali. Infecţia letentă se produce prin persistenţa virusului în organism sub formă de genom viral neintegrat, la nivelul celulelor nervoase ale ganglionului trigemen în cazul infecţiei pe cale respiratorii şi la nivelul ganglionului sacral în cazul infecţiei genitale (Mollema şi col., 2005).

Multiplicarea lui BHV-1 la nivelul mucoaselor induce sinteza locală de anticopi specifici de tipul IgA şi IgM de către plasmocitele din submucoasă. Un răspuns umoral sistemic este deasemenea stimulat ducând la producerea de IgG. IgM apare la aproximativ 8-12 zile de la infecţie, având un vârf de excreţie şi apoi diminuează în timp de o lună. IgG au un maxim de secreţie în aproape o lună şi un nivel care rămâne stabil în continuare. Acest maxim poate fi atins şi mai rapid, în 14 zile la vacile gestante. Anticorpii persistă în toate cazurile pe parcursul mai multor ani (Thiry E., 2000).

MATERIAL ŞI METODĂ

În cadrul acestui studiu au fost prelevate un număr de 163 porbe de sânge din 10 ferme organizate în bazinul Sucevei. După exprimarea serului, acesta a fost prelevat şi stocat la congelator la temperatura de -20^{0}C până în momentul testării. Probele au fost supuse examenului serologic

utilizând testul "HerdChek Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)/Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) gE antibody ELISA" (produs de IDEXX) pentru evidenţierea anticorpilor specifici glicoproteinei E anti-IBR. Acest test permite diferenţierea anticorpilor post-infecţie de cei post- vaccinali, în cazul în care animalele au fost vaccinate cu vaccin marcat (deletat). Densitatea optică (OD) a probelor a fost măsurată la lungimea de undă de 650 nm, testul fiind validat prin calcularea diferenţei dintre valoarea controlului negativ şi a controlului pozitiv (OD la 650 nm) care a rezultat mai mare de 0,3.

Prezenţa sau absenţa anticorpilor faţă de gE a virusului BHV-1 se determină prin calcularea raportului dintre valoarea densităţii optice a fiecărei probe (S) şi cea a martorului negativ (N). Dacă valoarea raportului S/N este mai mic sau egal cu 0,60 proba este considerată ca fiind pozitivă, iar dacă valoarea raportului S/N este mai mare de 0,70 proba este considerată negativă. Dacă pentru o probă de cercetat valoarea raportului S/N este mai mare de 0,60 dar mai mică sau egală cu 0,70, proba trebuie retestată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Investigaţiile au fost întreprinse în perioada aprilie - mai 2008 şi au constat în realizarea unei anchete serologice în zece unităţi de creştere a bovinelor, în care pe parcursul ultimilor doi ani nu au fost efectuate acţiuni de vaccinare împotriva rinotraheitei infecţioase bovine. Animalele au fost importate în urmă cu cinci ani de zile din Austria, ca rase preponderente fiind Fleckvieh şi Bruna austriacă.

Cele zece ferme de unde au fost prelevate probele de sânge sunt amplasate în bazinul Sucevei (fig.1).

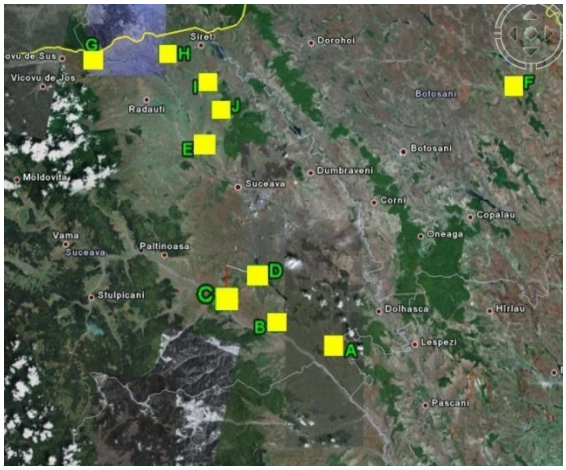


Fig.1 Amplasarea geografică a celor zece ferme in bazinul Sucevei

Din totalul de 163 probele de sânge, 155 au fost prelevate de la vaci de lapte cu vârsta cuprinsă între 3 şi 6 ani, 7 de la animale încadrate în categoria tineret (6 luni -1 an) şi de la un tăuraş cu vârsta de 2 ani.

În urma testării din totalul de probe au fost identificate ca fiind seropozitive un număr de 61 de probe (tabel nr.1).

Tabel nr.1 Distribuţia pe ferme a animalelor recţionate pozitiv la testul imunoenzimatic

Ferma	Număr probe testate	Număr probe pozitive	Număr probe negative
A	16	14	2
B	13	0	13
C	21	0	21
D	19	0	19
E	17	16	1
F	15	13	2
G	19	14	5
H	15	1	14
I	14	3	11
J	14	0	14
Total	**163**	**61**	**102**

În urma testării animalele seropozitive reprezintă 37,42% din totalul efectivului luat în studiu. Distribuţia animalelor reacţionate pozitiv este diferită în funcţie de crescătorie. Astfel se pot diferenţia ferme cu o seropozitivitate crescută: A (87,5%), E (94,11%), F (86,66%), G (73,68) şi ferme cu un număr redus de animale seropozitive: H (un animal identificat pozitiv din 15 supuse testării), I (3 bovine seropozitive din 14 testate).

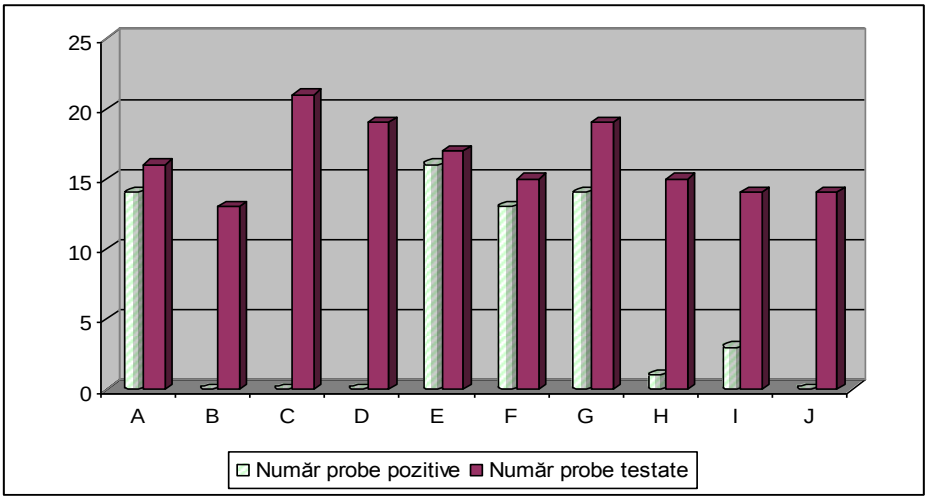


Fig. 2. Reprezentarea grafică a rezultatelor testării serologice

Din totalul de 61 animale seropozitive 59 sunt vaci de lapte, un tăuraş şi un tineret femel de 6 luni. Dintre bovinele adulte identificate ca fiind pozitive la examenul serologic trei dintre ele au avortat în luna a patra –a cincea de gestaţie.

Din analiza datelor obţinute se poate afirma că în 6 ferme există animale seropozitive faţă virusul rinotraheitei infecţioase bovine, examene virusologice (imunofluorescenţă directă) urmând să fie realizate pentru a stabili prezenţa virusului.

CONCLUZII

1. Din totalul de zece ferme din care s-au prelevat probe de sânge, în şase dintre ele au fost identificate animale seropozitive, 61 de probe pozitive din 163 testate.
2. În condiţiile neaplicării în ultimii ani a unui de program de profilaxie specifică pentru virozele respiratorii ale bovinelor putem afirma că procentul de seropozitivitatea (37,42%) este o consecinţă a persistenţei infecţiilor latente nedetectabile clinic.
3. În urma acestei investigaţii serologice se recomandă aplicarea unui program de profilaxie specifică în fermele în care s-au identificat animale seropozitive, sub controlul autorităţilor sanitar-veterinare.

BIBLIOGRAFIE

1. 1.Mollema L., De Jong M.C., Boven M., 2005 – Prolonged persistence of bovine herpesvirus infection in small cattle herds: a model based analysis. Epidem.Infect. 133, 137-148.
2. 2.Pastoret P., Thity E., Dubuisson J., 1988 – La rhinotracheite infectieuse bovine: pathogenie, epidemiologie et prophylaxie. Maladies respiratoires des jeunes bovins: ou en est-on? Ou va-t-on?, Societe francaise de buiatrie, 67-74.
3. 3.Thiry E., 2000 – Maladies virales des ruminants. Collection virology clinique. Maison-Alfort.
4. 4.Wyler R., Engels M., Schwyzer M., 1989 – Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). Herpesvirus dieseases of cattle, horse and pigs, Kluwer Academic Publishers Massachusetts, 1-72.

HEMOLYSIS AND CYTOTOXICITY MIGHT BE USEFUL BIOMARKERS OF HUMAN AND ANIMAL INDOOR FUNGAL EXPOSURE

APETREI Ingrid Cezara[1], DULMAN Ozana[1], COJOCARIU L.C., CARP-CĂRARE M.[1]., MIHAESCU T.[2]
[1]FMV Iaşi
[2]UMF Iaşi
ingridapetrei@gmail.com

*Hemolysins are molecules capable to lyse red blood cells (**RBCs**). In this bibliographic study, we will go through the main currently available scientific research that may provide useful insights into the nature and activities of fungal hemolysins .For instance, there are two types of hemolysins designated - alpha and beta. Alpha hemolysins cause a partial lysis of the RBCs resulting in a darkening of the media around a colony on sheep's blood agar (**SBA**). The beta hemolysins produce a complete lysis of the RBCs, resulting in a clearing around the colony growing on SBA. (**1**) Fungal hemolysins can cause histamine release from mast cells and/or induce cytokine release from human or animal cells. These responses may result in some of the flu- or cold - like symptoms associated with sick building syndrome (**SBS**). Fungal hemolysins, like bacterial hemolysins, can also damage vascular tissues and thus cause some SBS symptoms like headache, dizziness and bleeding. The source of fungal hemolysins can be the colonization of the airway, especially nasopharynx, by indoor fungi and not only from the inhaled spores. Measurements of fungal hemolysins in serum or other bodily fluid should prove as a useful tool in diagnosing SBS.*

Key words: microclimate, fungi, hemolysis, health, cytotoxicity

The potential harmful effects of exposure to fungi (molds) in inhabited buildings were recognized and documented in early Biblical times. In the Old Testament (King James Version, Oxford)\, 1888 Edition, Chapter XIV: Verses 34 thru 47) Leviticus put forth a detailed protocol for the remediation of mold contaminated structures, including the destruction of dwellings and personal belongings if remediation failed. Presently, it is recognized that high levels of humidity and air movement at low velocity into buildings leads to amplification of fungi and bacteria. (**1**) The Centers for Disease Control (CDC) and Environmental Protection Agency (EPA) recommend remediation when fungus growth is evident in a home or office building. What has changed since the pronouncement of Leviticus? Presently, we have greater knowledge regarding the types of microorganisms, their toxic metabolites, and the associated risks of adverse health effects upon occupants of these structures. (**1, 2**)

Occupants of buildings develop multiple organ symptoms and have adverse affects to the upper and lower respiratory tract, central and peripheral nervous system, skin, gastrointestinal tract, kidneys and urinary tract connective tissue, and the musculoskeletal system. (**3**) The human response or immune reaction usually falls into one or more of the following four general types of immune reactions:

Type I reaction commonly referred to as an IgE or allergy mediated response; **Type II** reaction otherwise referred to as a cytotoxic reaction. Target molecules on the cell surface and initiate processes leading to the death of that specific cell. (Hemolytic anemia); **Type III** reaction otherwise called “immune complex” reactions. Protective antibodies attach to an antigen and initiate an inflammatory reaction or response (Glomerulonephritis) or a **Type IV** reaction which involves the bio-mechanisms of cell mediated immunity or the body’s immunological competency to respond appropriately to foreign tissues, certain infectious agents, chemicals and cancerous cells. (**4**) Human illness caused by fungi can result in one or all of the following: mycotic infections, fungal rhino-sinusitis, IgE mediated sensitivity and asthma, hypersensitivity and related pulmonary inflammatory disease, cytoxicity, immune suppression/modulation, autoimmune disorders, mitochondrial toxicity, carcinogenicity, renal toxicity, neurotoxicity, and nuclear and mitochondrial DNA mutations. Finally, in the infectious state, fungi secrete extra cellular digestive enzymes, hemolysins and toxins that cause tissue destruction, angio-invasion, thrombosis, pulmonary bleeding and other manifestations

of the infectious state (**4, 5, and 6**). The purpose of this article is to succinctly review the state of art concerning fungal indoor pollution and the associated health effects caused by human and animal exposure to this mixture. Indoor environmental biocontaminants discussed in the peer reviewed literature can be grouped into the following categories: microbes (fungi and bacteria), particulates, micotoxins, volatile organic compounds, extracellular digestive enzymes and hemolysins, extra cellular polysaccharides and endotoxins.

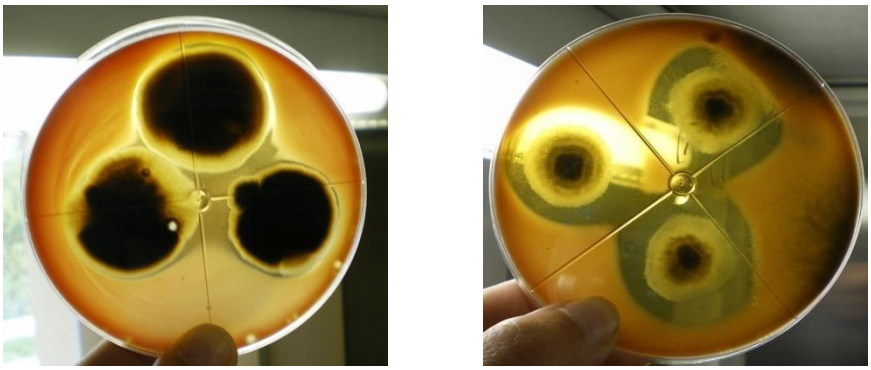


Fig. no. 1, Stachybotrys chartarum, lyses of sheep red blood cells contained by the PDA culture medium, (original pictures)

By classifying the indoor environment contaminants based on their general properties, we can simplify discussion of the bio-contaminants and their role in compromising the indoor environment. Fungi once occur begin to grow within 48 hours. The most common fungi identified growing on various substrates (particle board, dry wall, carpeting, plastic etc.) consist of the following main genera: *Cladosporium, Aspergillus, Penicillium, Chaetomium, Epicoccum, Alternaria, Trichoderma* and *Stachybotrys.* Certain species of these genera amplify indoors vs. outdoors: *Aspergillus* species commonly identified include *flavus, versicolor, sydowii, niger*, and *fumigatus* and the species of *Penicillium* include *chrysogenum, brevicompactum, citrinum* etc. (**37**) *Stachybotrys chartarum* when is present predominantly consists of two **chemo types**. The most dangerous chemo type identified is the one that produces trichothecene mycotoxins, while the other chemo type releases atranones. Both strains cause inflammation and have proved to be cytotoxic in mouse lungs (**7**). The indoor fungal profile is constant when compared to outdoor fungi with respect the presence of species of *Penicillium* and *Aspergillus* being dominant (**8, 9**). In addition *Stachybotrys chartarum* is readily cultured from indoor versus outdoor environments. Fungi gather nutrients from dead organic material (wood, dry wall, paint, paper glues, etc.) by secreting digestive enzymes into the matrix upon which they are growing. The digestive enzymes break down the organic matter for absorption. The moisture content of the material upon which fungi grow is critical and is called water activity, a_w. The a_w is the ratio of the vapor pressure exerted by water in the material to the vapor pressure of pure water at the same temperature and pressure. Thus, the fungi are divided into **primary, secondary and tertiary colonizers** depending upon the a_w (**10, 11**). The partial list of fungi that grow at various water activity ratios given below is helpful for initial basic understanding.

- **primary colonizers** (a_w <0.85): Aspergillus (Eurotium) amstelodomi, Aspergillus candidus, glaucus, niger, penicilloides, repens, restrictus, versicolor; Paedilomyces varlotti; Penicillium aurantiogriseum, brevicompactum, chrysogenum, commune, expansum, griseoflavum, commune, expansum, greiseofulvum; Wallemia sebi;
- **secondary colonizers** (a_w = 85-90): Cladosporium cladosporoides, herbarum, sphaerospermum; Mucor circinelloides; Rhizopus oryzae;
- **tertiary colonizers** (a_w = >90): Alternaria alternata; Aspergillus fumigatus; Epicoccum species.; Exophiala species; Fusarium moniforme; Mucor plumbeus; Phoma herbarum; Phiaosphora species; Trichoderma species; Stachybotrys chartarum; Ulocladium consortiale; Rhodotorula species; Sporobolomyces species.

Particulates

Colonies of fungi shed particulates into the indoor air, range from <0.2 to 9 microns. The particulates can be subdivided into two fractions: large particulates and fine particulates. The large particulate fraction consists of fungus spores and fragments of fungal mycelia (hyphae fragments) hyphae which range from 2 to approximately 9 microns. The large particulates contain mycotoxins, antigenic material, enzymes, hemolysins and other potentially toxic materials. These particulates have been the subject of numerous studies demonstrating their affects on the respiratory tract of mice and rats. Particular attention has been paid to the spores and hyphae fragments of *S. chartarum* because of its isolation from the lung of a child and its potential role in pulmonary bleeding and hemosiderosis (**12-15**).

The fine particulate (less than 2 microns) matter consists of material released by both fungus and bacterial growth (**16-17**). This fraction is shed into the indoor air at activity levels that occur in the frequency range of 1 -20 hertz. Moreover, these frequencies are representative of normal human activity levels, e.g. talking, walking, television, radio, etc. The amount of shed fine particulates is 320 times greater than the large particulate fraction released from fungus colonies. Furthermore, this fraction also contains mycotoxins, endotoxins, antigens, hemolysins, etc.) produced by fungi. The aerodynamics of the fine particulates allows them to be inhaled deeply into the microscopic alveolar spaces of the otherwise unreachable areas of the lungs. Then simple diffusion takes place between the particulates and the blood, which permits the entrance of mycotoxins and other toxins into the systemic circulation (**16-17**). This has been demonstrated in a series of studies with respect to the fungus *Stachybotrys chartarum*. First a laboratory bench study demonstrated that the trichothecenes from *S. chartarum* are present in the fine particulates (**18**). Many studies showed that the trichothecene mycotoxins from an organism are present in the fine particulates filtered from the indoor air of homes infested with *S. chartarum* (**19-23**).

Fig. no. 2, Stachybotrys chartarum x 40

Fig. no. 3, Wall damaged by fungalintrusion and development

This fungus produces several different trichothecene mycotoxins as well as a hemolytic protein, *Stachylysin*. Trichothecene mycotoxins have been identified in the blood and urine of symptomatic individuals occupying buildings where this organism was detected (**17, 18**). Stachylysin was shown to be present in the blood of symptomatic individuals at an average concentration of 371 nanograms/milliliter (**24**).

This occurred in spite of the fact that these authors could not account for the results of their study based upon indoor air spore counts. More recently it has been demonstrated that exposure of humans and animals to **Satratoxins G** (a trichothecene) leads to the production of antibodies against Satratoxin G albumin adducts (**25**), confirming earlier research, demonstrating the presence of antibodies to the mycotoxins in symptomatic exposed humans (**26**).

Volatile Organic Compounds

Fungi and bacteria release volatile organic compounds (VOCs) into the indoor air. It is well accepted that VOCs are irritating to the mucous membranes of the eyes, nose, throat and lungs in settings of sick building syndrome. Thus, the VOC, s emitted by microbial growth are an additional factor for consideration in the evaluation process of the indoor environment as contamination is investigated bearing in mind emissions also occur from newly furnished environments. The VOC, s

emitted by fungi and bacteria include 2-ethyl-1-1hexanol, 1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanol, terpineol, 2-heptanone, 1-octen-3-ol, dimethyl disulfide, 2-hexanone, 3-octanone, 2 pentylfuran, aldehydes, ammonia, and various amine compounds (**27-31, 32**).

Extracellular Enzymes, Siderophores, Hemolysins and Pulmonary Hemorrhage

Fungi secrete a variety of enzymes that allow them to digest the substrate upon which they grow into their surroundings. This occurs on building materials and also occurs on human tissue in infectious states. The enzymes include lipases, proteinases, metalloproteinase, fibrinolytic enzymes, galactosidases, siderophores, and hemolysins among others. In the human or animal body these secreted enzymes can also become allergens, resulting in an IgE allergic response as well as non IgE mediated lung disease. In addition, they are inflammatory leading to lung disease and the release of proinflammatory cytokines (**33-38**). An outbreak of infant pulmonary hemosiderosis was reported in Cleveland and was initially associated with the presence of *Stachybotrys chartarum.* Eventually a hemolysin (Stachylysin) and a siderophore were quantified from strains of Stachybotrys isolated from the infant's homes and from a lung of a child with pulmonary hemorrhage (**12**). In addition, this same investigative team analyzed the dust of these homes for fungi and the production of hemolysins.

Eleven species of *Aspergillus*, ten species of *Penicillium*, two species of *Ulocladium*, *Paecilomyces variotii*, *Memnoniella echinata*, *Scopulariopsis bervicalis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *viride* and *Stachybotrys chartarum* were demonstrated to cause hemolysis of sheep's blood agar. Hemolysins were more commonly produced by the fungi from homes with pulmonary hemorrhage (42%) than from reference homes (10%). It was surprisingly to found that **siderophore biosynthesis** is essential for virulence of fungi, in particular for virulence of *Aspergillus* species, more particularly for virulence of Aspergillus fumigatus. (**38**) In mammalian hosts iron is tightly sequestered by high-affinity iron-binding proteins, and therefore microbes require efficient iron-scavenging systems to survive and proliferate within the host.

Under iron starvation, most fungi synthesize and excrete low-molecular-weight, **iron specific chelators - called siderophores** - which have therefore often been suggested to function as virulence factors. (**33-39**) *A. fumigatus* possesses a combination of physiological features to cope with the immune system and to acquire essential nutrients. One of the most important nutrients in the infection process of any pathogen is iron because this metal is an essential cofactor of enzymes in many biological processes including DNA replication and electron transport. Fungi have developed various high-affinity mechanism of iron acquisition including solubilization of iron by enzymatic reduction of ferric iron and subsequent uptake of ferrous iron by a complex consisting of a ferroxidase and a coupled high affinity ferric permease uptake of hems-iron, and mobilization of iron by siderophores.(**40, 41**)

Extra cellular polysaccharides (EPS).

The cell wall of fungi is a complex structure mainly composed of polysaccharides and from where the majority of antigens, proteins, polypeptide-polysaccharide (EPS) of the fungus are secreted into the surrounding environment.

Some of the components of the wall are directly associated with the colonization of the host tissue and others with damage to the same tissues. For example, the genes and their products with respect to *Aspergillus fumigatus* and other fungi have been reviewed above.(**41, 42**) Two EPS compounds of medical importance are 1, 3 beta-D-glucans (glucans) and galactomannans. Both are diagnostic markers for fungal infections, particularly, *Aspergillus species*, systemic *Candidiasis*, and exposure to several other genera of fungi.(**41, 42**) The glucans have been demonstrated in the indoor air and dust and their presence is related to fungal growth as well as intrusion of outdoor sources into homes or buildings. The glucans cause airway inflammation and they have been identified in brochoalveolar lavage fluid from individuals with acute eosinophilic pneumonia (**43, 44**). In addition, they have been reported to potentate airway allergic conditions by down regulating IgE and promoting airway eosinophilic infiltration against inhaled antigens (**45**). In children this effect is seen as an increased variability in peak expiratory flow probably through nonallergic mechanisms in atopic asthmatic children. (**46, 47**)

NEW FOCUS AREAS FOR REASEARCH

These finding are significant in that they demonstrate the complexity of the indoor environment resulting from fungal contamination. We will attempt to summarize the complexity of the indoor environment resulting from the presence of fungi in homes and buildings. The recent development of quantitative PCR (QPCR) analysis of molds will dramatically improve fungal speciation and quantification, resulting in a highly standardized process for describing the indoor fungal population.

Now, that the populations of indoor fungi can be easily described, we need in future to identify possible causes for SBS associated with fungi. We suggest that fungal hemolysins and cytolysis may play a major role in symptoms linked to sick building syndromes (SBS).

BIBLIOGRAPHY

1. Jack D. Thrasher, Ph.D., Kaye Kilburn, M.D. and Nina Immers**,** *Indoor Environment Resulting From Water Intrusion*, Part I, Harris Martin Publishing, 1 November 2006
2. Falkinham JO, *Mycobacterial aerosols and respiratory disease*. CDC Emerging Infectious Diseases, 2003, 9 (7):763-7.
3. Campbel AW, Thrasher JD, Gray MR, Vojdani A, *Mold and Mycotoxins: Effects on the neurological and immune systems of humans*. In: Straus DC, ed. Sick Building Syndrome, Advances in Applied Microbiology, 2004, Vol 55:375-405, Elsevier/Academic Press, New York.
4. Winchester R, *Principles of the Immune Resonse*. In: Kelley WN, ed-in-chief; DuPont HL, Glick JH, Harris ED Jr, et al, eds. Textbook of Internal Medicine. Vol. 1.3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott- Raven; 1997:18-24.
5. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ, *Zygomycetes in human disease*. Clinical Microbiology Revue. 2000, 13:236-301
6. Rementeria A, Lope-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, et al., *Genes and molecules involved in Aspergillus fumigatus virulence*. 2005, Rev Iberon Micol 22:1-23.
7. Flemming J, Hudson B, Rand TG, *Comparison of inflammatory and cytotoxic lung responses in mice after intratracheal exposure to spores of two different Stachybotrys chartarum strains.* 2004, Toxicol Sci 78:267-75.
8. Straus DC, Cooley JD, Wong WC, Jumper JA, *Studies on the role of fungi in sick building syndrome*. 2003, Arch Environ Health 58:475-8.
9. Schwab CJ, Straus DC, *The roles of Penicillium and Aspergillus in sick building syndrome*. 2004, Adv Appl Microbiol 55:215-38.
10. Gorny RL, *Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air* – A review. 2004, Ann Agric Environ Med 11:185-97.
11. Nielsen KF, *Mycotoxin production by indoor molds.* Fungal Genetics Biol., 2003, 39:103-17
12. Dearborn DG, Smith PG, Dahms BB, Allan TM, Sorenson WG, Montana E, Etzel RA, *Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. 2002*, Pediatrics 110:627-37.
13. Elidemir O, Colasurdo GN, Rossmann SN, Fan LL, *Isolation of Stachybotrys from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis.* Pediatrics, 1999, 104:964-66).
14. Vesper SJ, Derborn DR, Elidemir O, Haugland RA, *Quantification of siderophores and hemolysin from Stachybotrys chartarum strains, including a strain isolated from the lung of a child with pulmonary hemorrhage and hemosiderosis*. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66:2678-81.
15. Jarvis BB, Sorenson WG, Hintikka E-L, Niculin M, Zhou Y, Jiang J, et al., *Study of toxin production by isolates of Stachybotrys chartarum and Memnoniella echinata isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants.* Appl Environ Microbiol, 1998, 64:3620- 25.
16. Gorny RL, Roponen T, Willeke K, Schmechel D, Robine E, et al., *Fungal fragments as indoor air biocontaminants.* Appl Environ Microbiol., 2002, 68:3522-31.
17. Gravesen, S., Nielsen, P.A., Iverson, R., Nielsen, K.F., *Micro fungal contamination of damp buildings – examples of constructions and risk materials.* 1999, Environmental Health Perspective 107 (Suppl. 3):505-8.
18. Brasel TL, Douglas DR, Wilson SC, Straus DC, *Detection of airborne Stachybotrys chartarum macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia*. Appl Environ Microbiol., 2005, 71:114-21
19. Brasel TL, Martin JM, Carriker CG, Wilson SC, Straus DC, *Detection of airborne Stachybotrys chartarum macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment.* Appl Environ Microbiol, 2005, 71:7376-88.
20. Johanning E., Gareis M., Nielsen K., Dietrich R., *et al., Airborne mycotoxins sampling and screening analysis. Proceedings of the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate* (Indoor Air, 2002), Monterey, California, June 30-July 5, 2002. Santa Cruz, CA:Indoor Air 2002 Conference Secratariat.
21. Brasel TL, Campbell AW, Demers RE, Fertuson GS, Fink J, Vojdani A, et al., *Detection of trichothecene mycotoxins in sera from individuals exposed to Stachybotrys chartarum in indoor environments.* Arch Environ Health 2004, 59:317-23.
22. Croft, W.A., Jarvis, B.B., Yatawara, C.S., *Airborne outbreak of trichothecene toxicosis*. Atmosphere Environ 1986, 20:549- 552.
23. Croft WA, Jastromiski BM, Croft AL, Peters HA, *Clinical confirmation of trichothecene mycotoxicosis in patient urine.* J Environ Biol 2002, 23:301-20.
24. Van Emon JM, Reed AW, Yike I, Vesper SJ., *ELISA measurement of stachylysin in serum to quantify human exposures to indoor Stachybotrys chartarum.* J Occup Environ Med., 2003
25. Yikes I, Distler AM, Ziady AG, Dearborn DG, *Mycotoxin adducts in human serum albumin: biomarkers of exposure to Stachybotrys chartarum.* Environ Health Perspect. 2006, 114:1221-26.

26. Vojdani A, Thrasher JD, Madison RA, Gray MR, Heuser G, Campbell AW, *Antibodies to molds and satratoxin in individuals exposed in water-damaged buildings.* Arch Environ Health 2003, 58:421-32.
27. Wady L, Larsson L, *Determination of microbial volatile organic compounds absorbed on house dust particles and gypsum board using SPME/GC-MS*. 2005, Indoor Air 15(Suppl. 9):27-32.
28. Gao, Marin J, *Volatile metabolites produced by three strains of Stachybotrys chartarum cultivated on rice and gypsum board.* Applied Occupational Environmental Hygiene, 2002, 17:530-6 .
29. Claeson AS, Levin JO, Blomquist G, Sunesson AL, *Volatile metabolites from microorganisms grown on humid building materials and synthetic media.* J Environ Monitor, 2002, 4:667-72.
30. Gao P, Korely F, Marin E, Chen BT, *Determination of unique microbial volatile organic compounds produced by five Aspergillus species commonly found in problem buildings.* 2002, AIHAJ 63:135-40.
31. Claeson AS, Sunesson AL, *Identification using versatile sampling and analytical methods of volatile compounds from Streptomyces albidoflavus grown four humid building materials and one synthetic medium.* Indoor Air 15 (Supplement 9) 2005 :41-7.
32. Strauss, DC. Editor., *Sick Building Syndrome.* Advances In Applied Microbiology, Volume 55, Elsevier Publications, 2004, Academic Press, New York.
33. Moon JL, Shaw LN, Mayo JA, Protempa J, Ravis J, *Isolation and properties of extracellular proteinases of Penicillium marneffei.* Biol Chem, 2006, 387:985-93.
34. Reed CE, Kita H, *The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases*. 2004, 114:997-1008.
35. Ramsesh MV, Sirakova T, Pappachan E, Kolattukudy E, *Isolation, characteristics, and cloning of cCNA and the gene for elastinolytic serine proteinase*. Infection Immunology, 1994, 62:79-85.
36. Bramono K, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H, *Comparison of proteinases, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of Candida species*. Jpn J Infection Disease, 2006, 59:73- 6.
37. Vesper, S. J. AND M. J. Vesper. *Possible roles of fungal hemolysins in sick building syndrome.* Advances in Applied Microbiology. Elsevier Science Ltd, London, Uk, 55:191-213, 2004.
38. Vesper SJ, Varma M, Wymer LJ, Dearborn DG, Soblewski J, Haugland RA, *Quantitative polymerase chain reaction analysis fungi in dust from homes of infants who developed idiopathic pulmonary hemorrhaging.* 2004, JOEM 46:596-601.
39. Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Joechl C, Rogers T, et al., *Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for Aspergillus fumigatus virulene*. J Expert Medicine, 2004, 9:1213-19.
40. Li D-W, Yang CS, *Fungal contamination as a major contributor to Sick Building Syndrome*. In: Straus DC, ed. Sick Building Syndrome. Advances in Applied Microbiology, 2004, Vol. 55:31-112, Elsevier/Academic Press, NY.
41. Kamphuis HJ, DeRuiter GA, Veeneman GH, van Boom JH, *Detection of Aspergillus and Penicillium extracellular polysaccharides (EPS) by ELISA: using antibodies raised against acid hydrolysed* EPS.Antonie van Leeuwenhoek, 1992, 61:323-32.
42. Gehring U, Douwes J, Doekes G, Koch A, Bischof W, et al, *B(1-4)-glucan in house dust of German homes: Housing characteristics, occupant behavior, and relations with endotoxins, allergens, and molds*. Environmental Health Perspective, 2001 109:139 - 44.
43. Chew GL, Douses J, Doekes G, Higgins KM, van Strient R, Spithove J, Brunekreef B, *Fungal extracellular polysaccharides, beta (1-3) glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust.* 2001, Indoor Air 11:171-8.
44. Thor J, Rylander R, *Airways inflammation and glucan in a row house area*. American Journal Respiratory Critical Care Medicine, 1998, 157:1798-1803.
45. Kawayama T, Fujiki R, Honda J, Rikimaur T, Aizawa H, *High concentration of (1-3-B0D-glucan in BAL fluid in patients with acute Eosinophilic pneumonia*. Chest, 2003, 123: 302-7.
46. Wan GH, Li CS, Guo SP, Rylander R, Lin RH, *An airborne mold-derived product, beta-1-3-D-glucan, potential airway allergic responses.* European Journal of Immunology, 1999, 29:2491-7.
47. Fogelmark B, Thorn J, Rylander R, *Inhalation of (1-3-beta-D-glucan cause's airway eosinophilia.* Mediators Inflammation, 2001, 10:13-9.

FUNGAL GROWTH EVALUATION IN THE INDOOR ENVIRONMENTS OF A LENDING LIBRARIE - POSSIBLE RISK FACTOR FOR HUMAN HEALTH

APETREI Ingrid Cezara,[1] DRĂGĂNESCU Gilda Eleonora [2], MANTA Livia Georgiana[1], CARP-CĂRARE M.[1]., MIHAESCU T.[3]

[1]FMV Iaşi

[2]USAMV Iaşi, Library Departament

[3]UMF Iaşi

In the period between 15. 05. 2007 – 23. 11. 2007, 59samples from all the working spaces belonging to the Library of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "Ion Ionescu de La Brad", Aleea M. Sadoveanu nr. 3, Iaşi, have been collected with the purpose of evaluating the fungical pollution and in the same time the working conditions of the employees. Research has revealed that the UFC/m3 of air could be recognized in the value range of 574-1570, identifying the following genera: Aspergillus spp., Penicillium spp., Cladosporium spp., Alternaria spp. as predominant in all the analyzed spaces. These values are much over the maximal limits for indoor spaces consensual establish by different international scientific research teams all over the world. Aproximately 9 types of colonies could not be taxonomically classified. A significant number of isolated and identified pathogene fungi should not have been found in the indoor enviroment of the examined spaces of building. Most of the isolated fungi are known as important producers of micotoxins.

Key words: microclimate, fungi, cellulose, health

Indoor fungi have attracted unprecedented attention because of their potential health effects on humans in the last decade. Public awareness of indoor fungi in return generates more research to elucidate their roles in indoor environments and human health. Indoor fungus is not only a scientific issue but is also becoming a social issue. World Health Organization tried to define the sick building syndrome first in 1982, which proved to be extremely difficult issue because of insufficient scientific data available at the time, as well as obstacles of a technical and practical nature. (**1**) A basic understanding of the bioecology of fungi is necessary in order to estimate the health effects of their metabolites on human health. If the time span of exposure is long enough, fungi are well known to produce many agents that can be toxic such as secondary products of fungal metabolism or fungal structural components. Even exposure to molds not highly toxic can have serious health consequences, including respiratory problems, skin and eye irritation, and infections. Fungal spores enter the body by inhalation and through small breaks in the skin. (**1**) Students of the Faculty of Veterinary and Human Medicine are the main active actors contributing to the contamination and dissemination of the microbiological pathogen agents on documents. These documents circulate through laboratories, farms and other specific professional locations. In the past years it has been observed that more than 80 % of the library's personnel have developed professional diseases with effects including acute symptoms such as pulmonary hemorrhages, dermatitis, recurring cold and flu-like symptoms, burning/sore throat, headaches, excessive fatigue and diarrhea. Among the long term effects noticed are: carcinogenicity, mutagenicity, teratogenicity, central nervous system activity impairment, immune system damage, and specific effects on the heart, liver, kidneys and other organs. Turbulence of air in closed spaces play an essential role in the movement and sedimentation of viable fungical structures. Spores/fungical fragments adherence to dry surfaces is mainly the result of the action of their glico proteins, which act as an adhesive making the fixing and the development of the vegetative network harder to dispose off later. (**2**) So-called environmental syndromes such as chronic fatigue syndrome, multiple chemical sensitivity both contributing to the so-called sick building syndrome (SBS), which is characterized by symptoms rather than by identified causative factors in the environment. It is the general opinion that human activity in buildings represents an important factor in the stimulation of fungal development; still very few studies can actually prove that. (**3,4**) **Sessa and col.** have conducted such an experiment in the lecture room of a university in Rome, in the office of a public building and an apartment, trying to establish whether the presence or the absence of the inhabitants might in any way influence the indoor air fungical pollution**.** To this

purpose they used a special device to absorb the surface air, observing that in the presence of the inhabitants and the furniture much higher values have been registered. In the university lecture room the results have been: 1256–1769 UFC/m^3 of air 858 UFC/m^3 of air in the office and 147–297 UFC/m^3 of air in the apartment, in the presence of the inhabitants, while in their absence the values have been much reduced; university 301–431 UFC/$m^{3,}$ 224 UFC/m^3 in the office and 102–132 UFC/$m^{3\ in}$ the apartment **(5).** Fungi using cellulose as a growing substrate eliminate pigments with the production of organic acids, ultimately digesting the cellulose fibers. It has been proved that fungi can consume iron and other elements in the composition of ink so that the effect of chemical degradation of books is much more difficult to eliminate, thus having a permanent aspect.(**6**) In the present context we must mention that in the issue concerning indoor fungal expansion/adaptation, the lack of information creates the need for serious researches to establish some standard limitations in order to eliminate or reduce the indoor human exposure on fungi and their toxic metabolites. Implications related to the health protection of the librarians force us to reconsider the issues concerning the preservation and storage of documents on paper support.

MATERIAL AND METHODS

In the period between 15.05.2007-23.11.2007, 59 samples from all the spaces belonging to the Library of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "Ion Ionescu de La Brad", Aleea M. Sadoveanu nr. 3, Iasi, have been collected with the purpose of evaluating the indoor fungical pollution and in the same time the working conditions of the employees Thus, 29 swab samples have been harvested and immersed into 2 ml of Tween 80 concentration 0,05 %, to obtain a better spreading of the spores, at the same time harvesting some other 22 air samples by direct exposure of sterile Petri dishes, with PDA/cloramphenicol medium, Sabouraud/cloramphenicol and gentamicine and CGA/cloramphenicol, by using the sedimentation Koch technique usually used in the evaluation of air air-microflora. The harvesting of the inert fragments also included the harvesting of 6 paper fragments with visible signs of modification on the surface and of the texture wich were put on the surface of the sterille medium. There were collected 2 samples by the cellotype preparation, one from the ventilation grill of a computer and one from the filter of an air conditioning sistem in the in the main book deposit. The analysis of the samples was made by cultivation on special media or by direct microscopy**.** In order to identify the fungi, internationally accepted micological determinators have been used. (**7, 8, 9**) Incubation of the plaques was carried out at the surrounding enviromental temperature, while the monitoring of the colonies growing and the making of the slides from the cultures was done every 5 days. The exposure of prepared Petri plates in the spaces of the USAMV Library – Iasi, conducted especially in the storage areas of „old books" and areas in which the inhabitants spend most of their time at work, has releaved the installation of respiratory symptoms similar to an incipient virosis. The exposure was made in specific locations, for 15 minutes, by taking off the lid of the Petri dishes. Five days later the fungal development degree was calculated in the no. of UFC/m3 of air.

$$\text{No. of UFC/m}^3\text{ air} = \frac{N \times 10.000}{S \times K}, \text{ where:}$$

N = average of the culture number developed on the medium surface of the 2 exposed plaques
S – plate surface, cm^2 – ($3,14 \times R^2$);
K- the rate of the exposure time, for 5 min, equals 1, and for 10 min. equals 2, while for 15 min. equals 3.

The UFC/m^3 of air fitted the value range **574 – 1570**, with the *Aspergillus spp*., *Penicillium spp*., *Cladosporium spp*., *Alternaria spp* genera as predominant in all the examined spaces. When transplantation techniques and successive macroscopical/ microscopical examinatins did not reach the expected result, that is fungal identification, we proceeded to the sampling of fragments from the fungal cultures in 2 ml of serum, in Eppendorf tubes kept at a cooling temperature for further examination. Twenty nine samples have been harvested with the help of exudate pads from the ventilation grill of the personal computers and the surfaces on which the ventilated air reaches. After harvesting, the samples were taken to laboratory in the shortest time. Each sample was homogenised

for a better spreading of the spores and the miceline fragments in the harvesting liquid. Only one dillution has been made ($10^{-1)}$ by inserting 2, 25 ml of serum in the test-tubes and adding 0.25 ml from the examined sample. From each test-tube 0, 1 ml was taken and has been placed on the surface of the PDA/ cloramphenicol and CGA, already prepared Petri plaques. In another Petri dish, from the same culture media, 0, 1 ml was placed directly from the primary sample, which was in the swab tube with saline Twenn 80 solution. From each sample four Petri dishes have been prepared on culture media, one from dilution and the other directly from the sample. The incubation was made at the surrounding medium temperature, monitoring the development of the cultures every 5 days.

RESULTS AND DEBATES

The main isolated and identified fungal species and genera following a thorough mycological examination of the cultures are:

- Penicillium citrinum
- Penicillium thymicola
- Aspergillus versicolor
- Chaetomium murorum
- Penicillium commune
- Cladosporium herbarum
- Rhizopus microsporus
- Aspergillus puniceus
- Aspergillus niger
- Aspergillus flavus
- Aspergillus candidum
- Aspergillus fumigatus
- Alternaria alternata
- Penicillium spp.
- Fusarium spp.
- Scopulariopsis spp.
- Acremonium hyalinum
- Phaeoisaria clematitidis
- Rhodotorula rubra
- Cladosporium herbarum
- Emmonsia spp
- Phaeosclera dermatioides
- Aspergillus ochraceus

In order to determine whether a certain space meets all the microbiological safety conditions necessary for an activity to be carried on properly conditions, whatever that might be, it is imperative that we establish some maximum admitted limits of the fungal load corresponding to the respective perimeter. It should be mentioned the fact that in the present context, of increase in the fungal indoor accommodation and development, information concerning these limits, are either out of date or they are missing. The fungi using cellulose as development substratum elaborate a series of pigments which eventually digest the cellulosed fibers. Fungal development can produce accumulation of organic acids such as citric acid, oxalic acid and other substances such as hydrogen peroxide working as oxidation agent. It has been experimentally proved that fungi can consume iron and other elements in the composition of ink, and that the effects of chemical degradation are harder to eliminate, having a permanent character**. (6)**

Species belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* genera can consume and degrade up additives, adhesives (glue) or textile materials used in assembling books. At least 180 fungal species are known so far to be able to destroy and consume up cellulose. Fungal pigments resulted from metabolic processes have a complex chemical structure and can be spotted at the level of the mycelium or be issued at the level of a substratum, in this particular case in the cellulose from the composition of book pages.

Table no. 1

Total amount of samples, the technique and the location of the harvesting

	Swab sampling			Sampling of inert fragments	Direct plating – 15 minutes		
Library USAMV 5 indoor Spaces	Ventilation grill of a computer	The area surrounding the ventilation grill of a computer / or any other surface in the building (on cellulosed support)	Filter of air conditioning sistem	Bulk	Near the key-board	Another area in the examined space	Direct examination, cello- type
Total 59	**12**	**10**	**7**	**6 paper fragments**	**12**	**10**	**2**

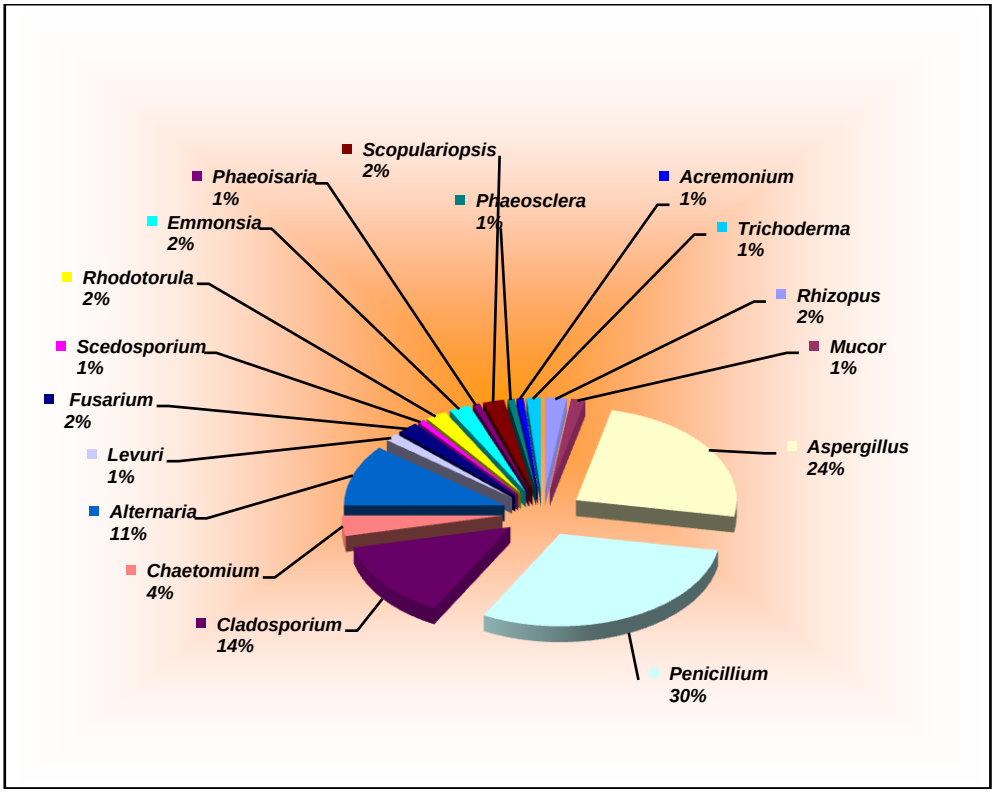


Fig. no. 1 Main fungal genera identified

Table no.2 Main genera and fungal species identified in the indoor spaces

Library USAMV - 5 indoor spaces	Swab sampling			Direct plating – 15 minutes		Bulk samples	Adhesive cello type
	Ventilation grill of computers	The area surrounding the ventilation grill of a computer / or any other surface in the building (on cellulosed support)	Filter of an air conditioning system	Near the keyboard	Another area in the examined space		
P19/Central office	**4 Samples** *Rhizopus microsporus* *Mucor spp.* *Penicillium spp./3* *Cladosporium herbarum* *Chaetomium murorum* *Aspergillus niger* *Aspergillus versicolor*	**1 Sample** *Penicillium thymicola* *Penicillium spp./2* *Cladosporium herbarum* *Alternaria spp.*	**1 Sample** *Cladosporium cladosporioides* *Aspergillus niger* *Penicillium spp./2* *Aspergillus ochraceus*	**3 Samples** *Cladosporium herbarum* *Fusarium spp.* *Cladosporium spp.* *Emmonsia spp.*			**1 Sample / Ventilation grill of a computer** Insects Spores Inert fragments Mycelium fragments
P20/Lecture hall	**4 Samples** *Aspergillus flavus* *Penicillium spp./3* *Cladosporium herbarum Rhodotorula spp.* *Cadida spp.* *Alternaria spp.* *Fusarium spp.* *Aspergillus spp./2*	**2 Samples** **On surface of paper books** *Aspergillus flavus* *Aspergillus puniceus Penicillium spp./3* *Cladosporium herbarum* *Rhodotorula rubra* *Alternaria alternata* *Alternaria spp.* *Fusarium spp.* *Aspergillus spp./3*/present hulle cells		**5 Samples** *Alternaria alternata* *Emmonsia spp.* *Cladosporium herbarum* *Cladosporium spp.* *Aspergillus spp./2* *Penicillium spp./2* *Yeasts*	**3 Samples** *Cladosp. spp.* *Aspergillus spp./2* *Penicillium spp./3*	**2 Samples** **Paper fragments** *Chaetomium spp.* *Penicillium spp.* *Aspergillus spp.*	
P21/Book storage deposit		**4 Samples** **On surface of paper books** *Cladosp.herbarum* *Aspergillus candidus* *Phaeoisaria spp.(clematitidis)* *Chaetomium murorum* *Acremonium hyalinum* *Aspergillus versicolor Aspergillus fumigatus Aspergillus flavus* *Penicillium spp./3* *Cladosporium herbarum* *Scopulariopsis spp.* *Rhodotorula rubra*	**6 Samples** *Penicillium spp./2* *Aspergillus spp.* *Aspg. candidus* *Trichoderma viride* *Cladosp. herbarum* *Alternaria alternata* *Alternaria spp.* *Fusarium spp.*		**6 Samples** *Cladosp. herbarum* *Aspg. versicolor* *Penicillium spp./2* *Aspergillus fumigatus* *Trichoderma viridae* *Aspergillus flavus* *Penicillium spp./2* *Alternaria spp.* *Scopulariopsis spp.*	**4 Samples** **Analyzing paper fragments** *Chaetomium murorum Aspergillus fumigatus* *Penicillium spp.*	**1 Sample /filtruA.C.** Spores Inert fragments Mycelium fragments
P22/Office near the book storage deposit	**2 Samples** *Phaeosclera dermatioides* *Penicillium spp./5* *Rhizopus oryzae* *Aspergillus spp./2* *Aspergillus niger* *Cladosporium spp.* *Cladosporium herbarum* *Alternaria spp.* *Alternaria alternata*	**1 Sample** *Scedosporium prolificans* *Cladosporium spp.* *Aspergillus fumigatus* *Penicillium spp./4* *Scopulariopsis spp.*		**2 Samples** *Cladosporium herbarum* *Cladosporium spp.* *Alternaria alternata* *Aspergillus fumigatus*			
P24/ Office near the lecture hall	**2 Samples** *Aspergillus flavus* *Penicillium spp./3* *Cladosporium herbarum* *Yeasts* *Alternaria spp.* *Fusarium spp.* *Aspergillus spp./2*	**2 Samples** **On surface of paper books** *Aspergillus flavus* *Penicillium spp./2* *Cladosporium herbarum* *Alternaria alternata* *Alternaria spp.* *Fusarium spp.*		**2 Samples** *Cladosporium herbarum* *Cladosporium spp.* *Aspergillus spp./2* *Penicillium spp./2*	**1 Sample** *Cladosp. spp.* *Aspergillus spp./2* *Penicillium spp./3*		

Fig. no. 2 Discrete and irregularly shaped spot, stain, or colored or discolored area on books paper usually with no visible hyphae or mold structure and insects identified by adhesive cello - type sampling method

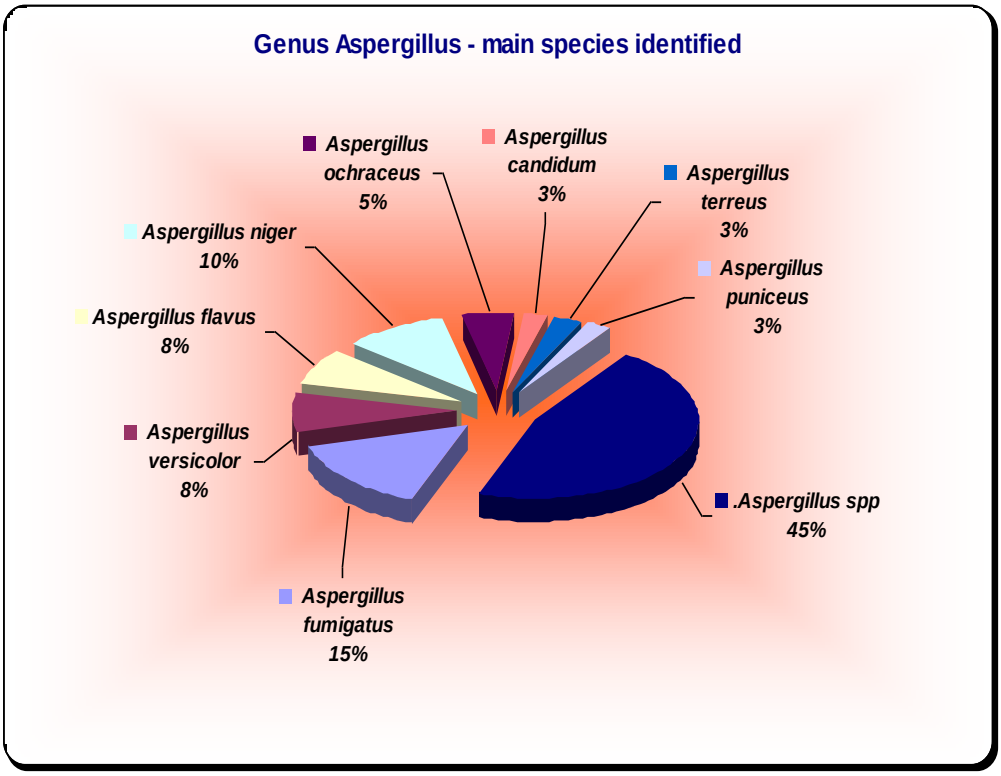


Fig.3 Main fungal species identified in genus Aspergillus

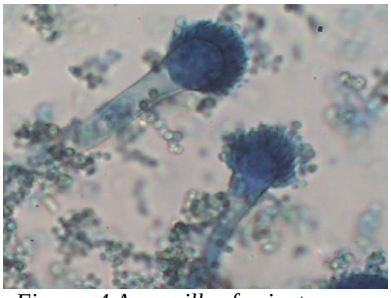


Fig. no. 4 Aspergillus fumigatus

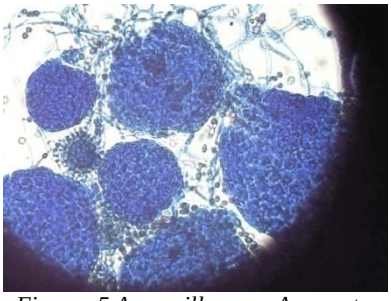


Fig. no. 5 Aspergillus spp. Ascomata

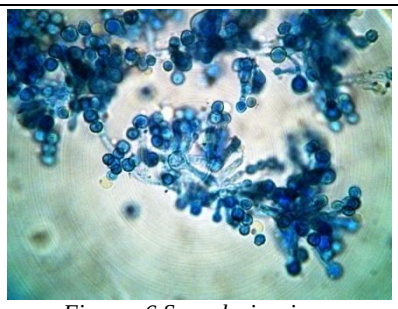


Fig. no. 6 Scopulariopsis spp.

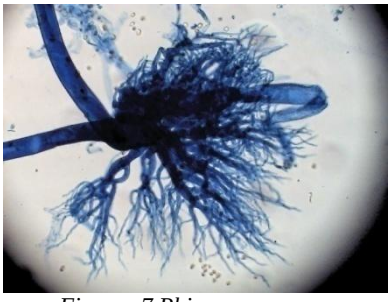


Fig. no. 7 Rhiyzopus oryzae

Fig. No.8 Direct plating,

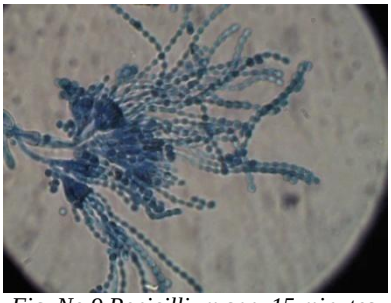


Fig. No.9 Penicillium spp. 15 minutes

Fig. No. 10 Direct plating

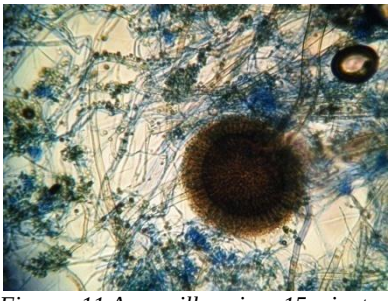


Fig. no. 11 Aspergillus niger 15 minutes

Fig. no. 12 Acremonium spp.

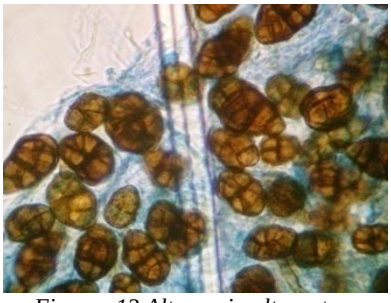


Fig. no. 13 Alternaria alternata.
In pure culture isolation

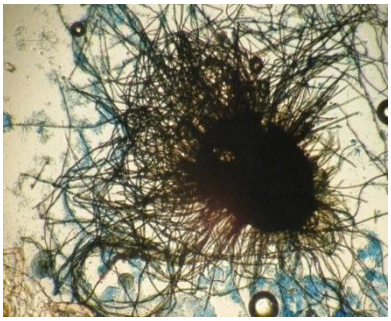


Fig. no. 14 Chaetomium murorum

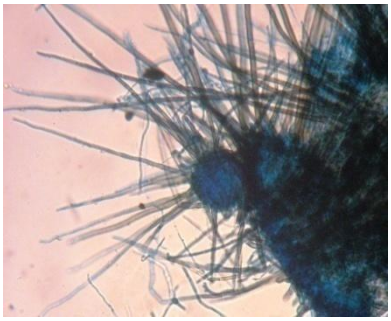


Fig. no. 15 Chaetomium spp.

CONCLUSIONS

- Identification was conducted at the level of the species and, in the cases when this was not possible, at the level of the genus.
- The UFC/m3 of air fitted the value raged between 574 – 1570, meaning that are greater than the values found in all other international scientific research experiments consulted.
- Approximately 10 types of cultures could not be taxonomically classified.
- Approx. 50% of the identified species and genera are known to be allergic and toxic.
- From the perspective of the percentage, we can see that the predominant species belong to the following genera: *Penicillium* (30%), *Aspergillus* (24%), *Cladosporium* (14%), *Alternaria* (11%), *Rhizopus* (2%) şi *Chaetomium* (4%).
- A significant number of isolated pathogene fungi should not have been found in the indoor spaces of the studied buildings
- The majority of the isolated fungal species can affect the health of the employees causing respiratory disfunctions of an allergic or dermatological type.
- The most various species and genus were found on swab samples collected from ventilation grill of a computer, filter of air conditioning system and by direct plating – 15 minutes.

SELECTIVE BIBLIOGRAPHY

1. ACGIH. - Threshold limit values for chemical substances and physical agents on biological exposure indices. 1995 Cincinnati, Ohio, American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
2. Nathanson T - Humidification Systems: Function, Operation and Maintenance. Public Works and Government Services Canada 1995, Ottawa.
3. Alan Hedge – Indoor air quality and biological organism, Science, 2005, 308,73.
4. Seppanen O, Fisk WJ. Association of ventilation system type with SBS Symptoms in office workers. Indoor Air 2002; 12:98–112.
5. Sessa, R., Di, P. M., Schiavoni, G., Santino, I., Altieri, A., Pinelli, S., And Del, P. M., 2002, Microbiological indoor air quality in healthy buildings. New Microbiologica 25(1), 51–56.
6. Szczepanowska, H., and C. M.Lovett, Jr., Fungal stains on paper: Their removal and prevention. In The conservation of Far Eastem art, ed.J. S.Mills, P.Smith, and K.Yamasaki.,1988, London: International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works. 13–14.
7. G. S. De Hoog, J. Guarro, J. Gene, M. J. Figueras, Atlas of Clinical Fungi, CD version - 2005. 11
8. Robert A. Samson and János Varga, Aspergillus systematics in the genomic era, 2007, Studies in Mycology 59, Published and distributed by CBS Fungal Biodiversity Centre, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands. Internet: www.cbs.knaw.nl.
9. Jens C. Frisvad and Robert A. Samson, Polyphasic taxonomy of Penicillium subgenus Penicillium, A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their micotoxins, 2004, Studies In Mycology 49: 1-174

THE VALIDATION PROTOCOL USED IN HAEMAGGLUTINATION INHIBITION TESTS FOR AVIAN INFLUENZA AND NEWCASTLE DISEASE DIAGNOSIS: A PRACTICAL APPROACH

ARDELEAN A.I., SALAGEAN Monica, DUMA Mihaela
DSVSA Cluj-Napoca
adrian.a@mail.dntcj.ro

The present studies have the purpose to in house validation of the haemagglutination inhibition tests (IHA) used for diagnosis in avian influenza (AI) and Newcastle disease (ND). The samples used were chicken positive serum for ND, chicken negative serum for AI, positive control, negative control and serial dilution for positive control. The performance indicators had the fallowing results: repeatability (r) 0.00, intermediate precision (R) 0.00, sensitivity (p+) 1, selectivity (p-) 1, for all tests. Considering these results, the validation protocol fulfills the quality management requirements, and the methods fit the purpose.

Key words: validation, sensitivity, specificity, quality management

To ensure that the results obtained in the laboratory by this assays are valid, we had tried to develop an in house validation protocol. Therefore, we tried to apply the recommendations from ISO 17025: 2005 within the limit of OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

MATERIAL AND METHOD

The samples had tested through H_5N_1 Subtype Type A Avian Influenza Haemagglutinating Antigen ® Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, H_7N_3 Subtype Type A Avian Influenza Haemagglutinating Antigen ® Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SPP Negative Serum ® Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie for AI, and through ND-Test ® S.C. Romvac Company S.A. for ND. The assays made according the manufacturer specification and OIE manual. In the absence of certified positive control sample, it had considered arbitrary the positive control from each kit, and from it made serial dilution. The equipments had calibrated previously.

The samples tested for avian influenza was: no.1 chicken serum negative tested before in 40 replica; no.2 H_5N_1 positive control from the kit in 4 replica; no.3 H_7N_3 positive control from the kit in 4 replica; no.4 negative control from the kit in 8 replica, no.5-14 represented by 10 serial dilution of the H_5N_1positive control 1/1, ½, ¼, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 in 2 replica each; no.15-24 represented by 10 serial dilution of the H_7N_3 positive control 1/1, ¼, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 in 2 replica each. Two different operators tested each a lot with 20 replicas from sample no.1, 2 replicas from samples no. 2 and 4, and 4 replicas from sample no.3. All replicas of the samples 5-24 had tested by the first operator.

The samples tested for Newcastle disease was: no.1 chicken serum positive tested before in 20 replica; no.2 positive control from the kit in 4 replica; no.3 negative control from the kit in 4 replica; no.4 -13 represented by 10 serial dilution of the positive control 1/1, ½, ¼, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 in 2 replica each; Two different operators tested each a lot with 10 replicas from sample no.1, 2 replicas from samples no. 2 and 3. All replicas of the samples 4-13 had tested by the first operator.

The results are dividing in: true positive N_{11}; false positive N_{21}; false negative N_{12}; true negative N_{22}. The performance of the method has been appreciated through: repeatability, intermediate precision, accuracy, sensitivity, specificity, Chi square, linearity, detection limit and quantification limit. For mathematical analysis has used MS Office Excel software.

RESULTS AND DISCUSION

Repeatability (r) expresses the precision under the same operation condition over a short interval of time, and represents the closest extreme in an independent measurement with 95% confidence level.[1].

$$r = t_{5\%}^{n-1} * S_D \qquad [1]$$

$t_{5\%}$ = Student coefficient

S_D = standard deviation

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum (Xi - X)^2}{n-1}} \qquad [2]$$

$$\overline{X} = \frac{\sum Xi}{n} \qquad [3]$$

The confidence interval calculated expressed like a value of mean ± r, for each one of the samples no. 1, 2, 3, 4 in AI and 1,2,3 in ND.

The logical value had transformed in numeric value: each logical false value became value 0 and each true value become value 1. **S_D (standard deviation) =0, 00**, implicit **r (repeatability) =0, 00**, for each set, cu *repeatability limit = 1* (true value) ±0, for either IHA test in avian influenza and Newcastle disease diagnosis.

The calculation of repeatability using the values of haemagglutination inhibition units (HAU) showed the fallowing results for sample no. 1 with **S_D (standard deviation) =0.00**, implicit **r(repeatability)=0,00.**

Intermediate precision (R) had been calculated by multiplying the repeatability with 1.6 an accepted coefficient. The results are qualitative and are expressed like positive and negative. The logical value had transformed in numeric value: each logical false value became value 0 and each true value become value 1. **S_D (standard deviation) =0, 00**, implicit **R (intermediary precision) =0, 00**, for each set, cu *intermediary precision limit = 1* (true value) ±0, for all methods.

The results obtained according the general classification of the samples in H5N1 AI test

The samples status test	The obtained results		Total
	POSITIVE	Negative	
POSITIVE	N_{11}=4	N_{12}=0	$N_{1.}$
Negative	N_{21}=0	N_{22}=24	$N_{2.}$
Total	$N_{.1}$	$N_{.2}$	N= $N_{1.}$ + $N_{1.}$ or $N_{.1}$ + $N_{.2}$
$N_{11=}$ true positive; N_{12} = false negative; N_{21} =false positive; N_{22} =true negative			

The results obtained according the general classification of the samples in H7N3 AI test

The samples status test	The obtained results		Total
	POSITIVE	Negative	
POSITIVE	N_{11}=4	N_{12}=0	$N_{1.}$
Negative	N_{21}=0	N_{22}=24	$N_{2.}$
Total	$N_{.1}$	$N_{.2}$	N= $N_{1.}$ + $N_{1.}$ or $N_{.1}$ + $N_{.2}$
$N_{11=}$ true positive; N_{12} = false negative; N_{21} =false positive; N_{22} =true negative			

The results obtained according the general classification of the samples in ND test

The samples status test	The obtained results		Total
	POSITIVE	Negative	
POSITIVE	N_{11}=24	N_{12}=0	$N_{1.}$
Negative	N_{21}=0	N_{22}=4	$N_{2.}$
Total	$N_{.1}$	$N_{.2}$	N= $N_{1.}$ + $N_{1.}$ or $N_{.1}$ + $N_{.2}$

$N_{11=}$ true positive; N_{12} = false negative; N_{21} =false positive; N_{22} =true negative

The accuracy (AC) is sometimes termed trueness, and result from the comparison of de values to the true value for the sample and had been 100%[4].

The results obtained for serial dilution of the positive control with level of 215.26 HAU for H_5N_1, 1052.63 HAU for H_7N_3 , and 1052.63 HAU for ND

TITER	DIL MP_HAU H5N1	1/	Dilution	Result	HAU
1/1	107,63	1	0,5	POSITIVE	8,00
½	71,75	2	0,33	POSITIVE	12,12
¼	43,05	4	0,2	POSITIVE	20,00
1/8	23,92	8	0,111	POSITIVE	36,04
1/16	12,66	16	0,058	POSITIVE	68,97
1/32	6,52	32	0,03	NEGATIVE	133,33
1/64	3,31	64	0,015	NEGATIVE	266,67
1/128	1,67	128	0,0077	NEGATIVE	519,48
1/256	0,84	256	0,0038	NEGATIVE	1052,63
1/512	0,42	512	0,0019	NEGATIVE	2105,26
TITER	**DIL MP_HAU H7N3**	**1/**	**Dilution**	**Result**	**HAU**
1/1	526,32	1	0,5	POSITIVE	8,00
½	350,88	2	0,33	POSITIVE	12,12
¼	210,53	4	0,2	POSITIVE	20,00
1/8	116,96	8	0,111	POSITIVE	36,04
1/16	61,92	16	0,058	NEGATIVE	68,97
1/32	31,90	32	0,03	NEGATIVE	133,33
1/64	16,19	64	0,015	NEGATIVE	266,67
1/128	8,16	128	0,0077	NEGATIVE	519,48
1/256	4,10	256	0,0038	NEGATIVE	1052,63
1/512	2,05	512	0,0019	NEGATIVE	2105,26
TITER	**DIL MP_HAU ND**	**1/**	**Dilution**	**Result**	**HAU**
1/1	526,32	1	0,5	POSITIVE	8,00
½	350,88	2	0,33	POSITIVE	12,12
¼	210,53	4	0,2	POSITIVE	20,00
1/8	116,96	8	0,111	POSITIVE	36,04
1/16	61,92	16	0,058	NEGATIVE	68,97
1/32	31,90	32	0,03	NEGATIVE	133,33
1/64	16,19	64	0,015	NEGATIVE	266,67
1/128	8,16	128	0,0077	NEGATIVE	519,48
1/256	4,10	256	0,0038	NEGATIVE	1052,63
1/512	2,05	512	0,0019	NEGATIVE	2105,26

$$AC = \frac{N_{11} + N_{22}}{N_{11} + N_{12} + N_{21} + N_{22}} \qquad [4]$$

The Chi-square (^{2}) [5] reveal whether hypothesized results are verified by an experiment, and in our case it are almost absolute 0.00, (must be <3.84).

$$\text{Chi - square} (\ ^2) = \frac{\left(\left|N_{12} - N_{21}\right| - 1\right)^2}{\left(N_{12} + N_{21}\right)} \qquad [5]$$

The sensitivity (p+/SE) [$P(T^{+}|D^{+})$]calculated had been 1, or can be expressed like 100% and reveal the probability that a true positive sample will be tested positive. p+=1**,** SE=100%, either for AI and ND. [6]

The specificity (p-/SP) [$P(T^{-}|D^{-})$]calculated had been 1 or can be expressed like 100% and reveal the probability that a true negative sample will be tested negative. p-=1, SP=100% either for AI and ND. [7]

$$p+=\frac{N_{11}}{N_{1\bullet}} \qquad [6]$$

$$p-=\frac{N_{22}}{N_{2\bullet}} \qquad [7]$$

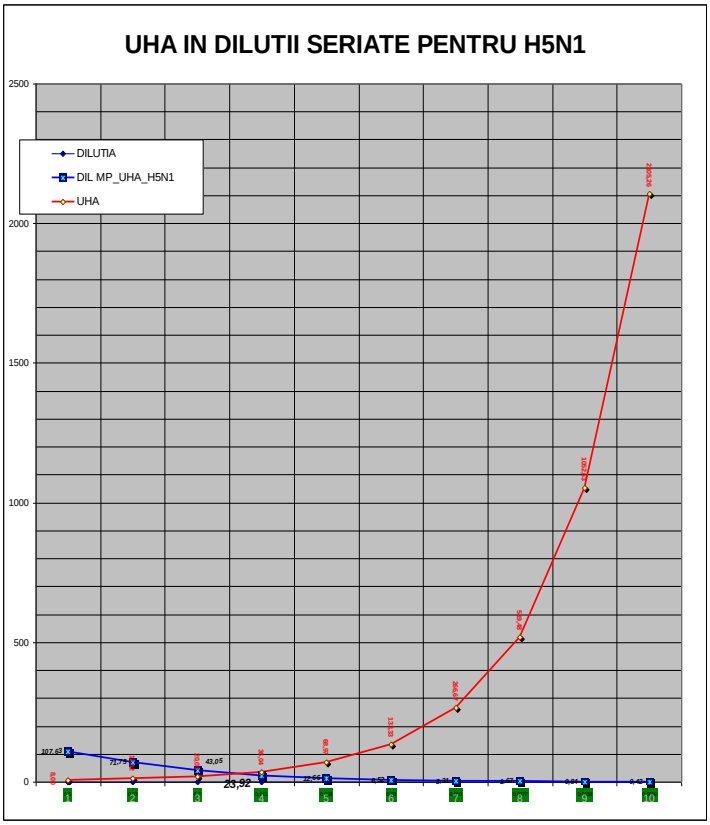


Figure. 1 ***Serial dilution of H_5N_1 AI positive control***

Positive predictive value $Ppv=N_{11}/(N_{11}+N_{21})$ is the proportion of positive test sample it is true positive, and it is 1, either for AI and ND.

Negative predictive value $Npv=N_{22}/(N_{22}+N_{12})$ is the proportion of negative test sample it is true negative, and it is 1, either for AI and ND.

False positive rate pf+ is the proportion of negative instances that were erroneously reported as being positive .It is equal to **1** minus the specificity of the test: pf+=0, either for AI and ND.[9]

False negative rate pf- is the proportion of positive instances that were erroneously reported as being negative .It is equal to **1** minus the sensibility of the test: pf-=0, either for AI and ND.[8]

$$pf-=\frac{N_{12}}{N_{\bullet 1}} \qquad [8]$$

$$pf+=\frac{N_{21}}{N_{\bullet 2}} \qquad [9]$$

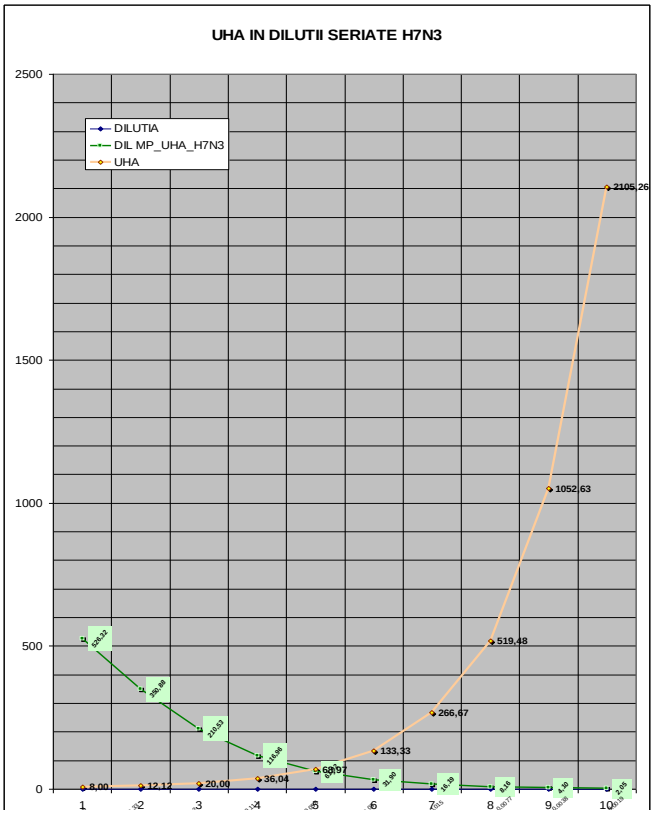


Figure. 2 Serial dilution of H_7N_3 AI positive control

The detection limit had been estabileshed for: H_5N_1 AI at 1/16 serial dilution of positive control at level of 12.66HAU, H_7N_3 AI at 1/16 serial dilution of positive control at level of 61.92HAU, ND at 1/16 serial dilution of positive control at level of 61.92 HAU.

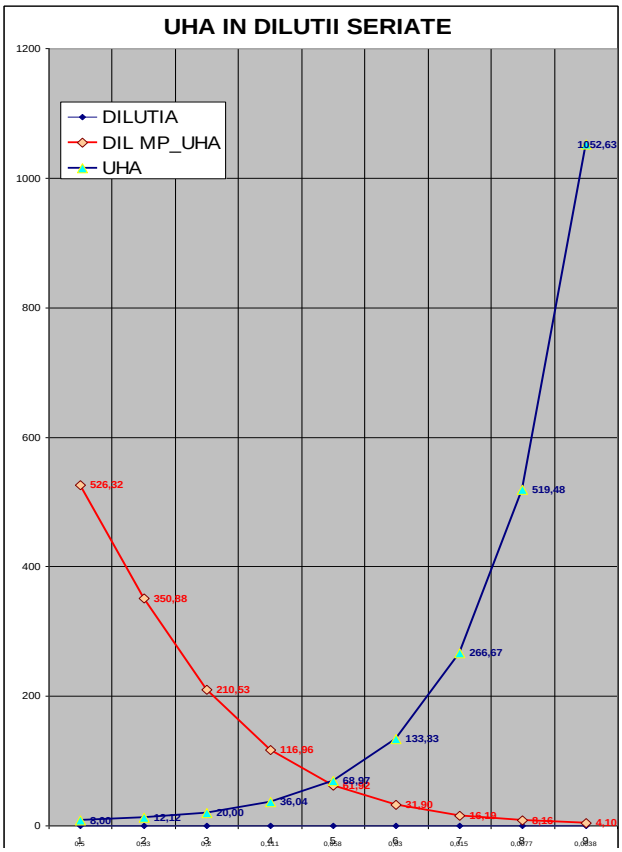


Figure. 3 ***Serial dilution of ND positive control***

The quantification limit had been estabileshed at for: H_5N_1 AI at 1/16 serial dilution of positive control at level of 12.66HAU, H_7N_3 AI at 1/8 serial dilution of positive control at level of 112.96HAU, ND at 1/8 serial dilution of positive control at level of 116.96 HAU.

The results obtained by the serial dilution of the positive control from all the kit, revealed a cvasilinear rising proportional related with the analite concentration, the fact could let to consider that the assays have linearity, more obviously in the area of detection and quantification limit.

CONCLUSION

The protocol revealed that the method is valid, and can be used proper in the laboratory for it purpose.

The values of the standard deviation, repeatability and intermediate precision are low, according with our expectation.

The high sensitivity and specificity is indicator of the high performances of the test.

BIBLIOGRAPHY

1. SR EN ISO 17025: 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
2. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals:2006- CHAPTER 1.1.3.PRINCIPLES OF VALIDATION OF DIAGNOSTIC ASSAYS FOR INFECTIOUS DISEASES

STUDIU DE CAZ PRIVIND FOCARUL DE GRIPA AVIARA DIN LOCALITATEA MALIUC, JUD. TULCEA , DIN ANUL 2005

STUDY REGARDING THE FLU BURNING POINT OF MALIUC, TULCEA, 2005

ARSENE M.
DSVSA Tulcea
arsenemarian@yahoo.com

The study was realized between 07th October and 21st November 2005 in Maliuc, Tulcea where the second flu burning point in Romania has developed. We present the action plan to prevent and control the birds' flu in the situation of a delta of Danube location.

Cunoscuta si sub numele de pesta tipica, pesta europeana sau tifosul exudativ al gainilor, este o boala infectioasa, extrem de contagioasa, caracterizata clinic prin tulburari generale special, grave, respiratorii, digestive si nervoase , insotite de o infiltratie edematoasa a tesutului conjunctiv si cutanat din regiunea capului si gatului, iar morfologic prin diateza hemoragica accentuata si proventriculita hemoragica.

In perioada in care la Ceamurlia de Jos se realize combatrea primului focar de gripa aviara din Romania, la Maliuc, localitate situata pe malul stang la bratului Sulina se inregistrau mortalitati la lebada de vara (Cygnus olor). Pe 14.10. 2005 se confirma de catre Laboratorul Central de Referinta pentru Diagnostic si Sanatate Animala al doilea focar de gripa aviara din tara.

MATERIAL SI METODA

Studiul s-a efectuat in perioada 07.10 – 21.11.2005, in focarul de gripa aviara din loc. Maluic, jud. Tulcea si prezinta modalitatea de actiune in combaterea gipei aviare in conditiile unei localiati din Delta Dunarii.

REZULTATE SI DISCUTII

Metodologia de combatere a gripei aviare era reglementata in tara noastra prin acte normative.

Pasii urmati in focarul de gripa aviara din loc. Maliuc au fost urmatorii:

In ziua de 07.10.2005 au fost aduse la Laboratorul Sanitar Veterinar doua cadavre de lebada dintr-o incinta piscicola din localiatea Maliuc. Impreuna cu subprefectul jud. Tulcea, seful de post de la Politia Maliuc m-am deplasat la ferma piscicola Maliuc si am constatat mortalitate ridicat la lebada. Au fost ridicate probe pentru examen de laborator si s-a discutat cu localmicii.

A doua zi s-a format o echipa de la Directia Sanitara Veterinara si pentru Siguranta Alimentelor Tulcea care s-a deplasat la Maliuc si au luat urmatoarele masuri:

- s-a incheiat la Primarie un protocol de prevenire si combatere a gripei aviare;
- a fost reactivat Comandamentul Antiepizootic Local;
- s-a facut un necesar de materiale;
- s-a format o echipa pentru ecarisarea teritoriului, care a fost instruita si echipata corespunzator;
- au fost adunate, incinerate si ingropate lebedele gasite moarte;
- s-a efectuat dezinfectia la locul recoltarii si ingroparii cadavrelor;
- s-au inspectat gospodariile populatiei si s-a popularizat principalele masuri de prevenire si combatere a gripei aviare;
- au fost recoltate probe si expediate la laborator;
- s-a facut catagrafia gospodariilor si a pasarilor din comuna;
- s-au impus restrictionarea circulatiei oamenilor si animalelor in zona si s-au amenajat dezinfectoare pietonale la debarcader;

In gospodaria familiei Husanu din loc. Vulturu, com Maliuc au fost gasite doua gaini moarte. S-au eutanasiat toate pasarile din gospodarie, s-a efectuat dezinfectia, s-a delimitat perimetrul curtii si s-a instalat dezsainfector pietonal la intrarea/iesirea din gospodarie. Au fost recoltate probe si expedeiate la laborator.

In perioada 09. – 13. 10. 2005 s-a continuat:

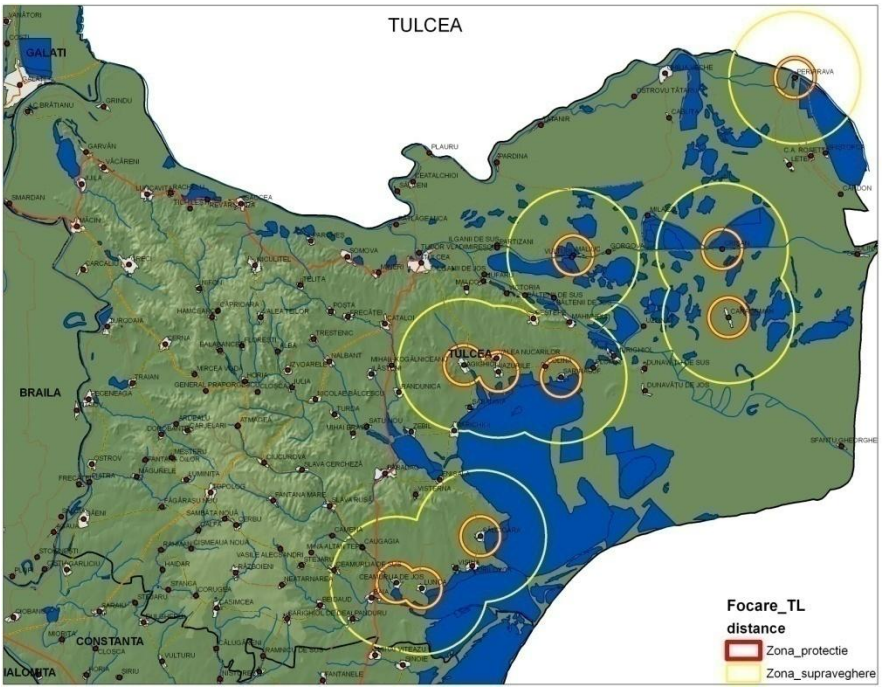
- adunarea lebedelor moarte, incinerarea si dezinfectia;
- recoltarea de probe: cadavre, sange, tampoane traheale, cloacale si fecale, apa;
- popularizarea pericolului pe care in reprezinta gripa aviara si principalele masuri de prevenire si combatere prin afise, vizite la scoala, biserica;
- supravegherea intrarilor/iesirilor din localitate;
- dezinfectia navelor care aduc alimente, butelii sau personal implicat in focar;
- supravegherea pasarilor salbatice si domestice, efectuarea de monitorizari;
- s-au intocmit rapoarte de activitate zilnice privind situatia din zona;

In data de 14.10.2005 a fost emis buletinul de analiza care confirma suspiciunea de gripa aviara la lebada maliuc si la gaina la Vulturu, com. Maliuc si au fost luate urmatoarele masuri:

- convocarea Comandamentului Antiepizaootic Judetean si Local,
- stabilirea planului de masuri pentru combaterea bolii, cu termene si responsabilitati,
- declararea oficiala a bolii,
- ancheta epidemiologica,
- stabilirea zonei de protectie si supraveghere si hartile (fig.1),
- intocmirea listei cu materiale necesare combaterii bolii,
- stabilirea echipelor de ucidere si dezinfectie
- Uciderea pasarilor s-a realizat in perioada 14 – 17.10.2005. pasarile ucise au fost arse si ingropate. Au fost ucise 3508 pasari din 76 de gospodarii. S-au intocmit fisele de evaluare in vederea despagubirilor pentru pasarile ucise.

Prima dezinfectie s-a realizat pe 16 – 19.10.2005, dezinfectia a doua 20 – 21.10.2005, iar a treia dezinfectie in 27 – 28.10.2005. Dezinfectia s-a realizat cu atomizoare si un auto-dezinfector, substantele folosite: Aldezin, Deo-sept si Virbaccid.

In data de 04.11. 2005 au fost introduce pasarile santinela care au fost monitorizate in permanenta, iar in data de 17.11.2005 au fost recoltate probe de la pasarile santinela. Rezultatul fiind negative pentru gripa aviara, in data de 21.11.2005 s-a stins bolala prin act sanitar veterinar si au fost ridicate restrictiile.



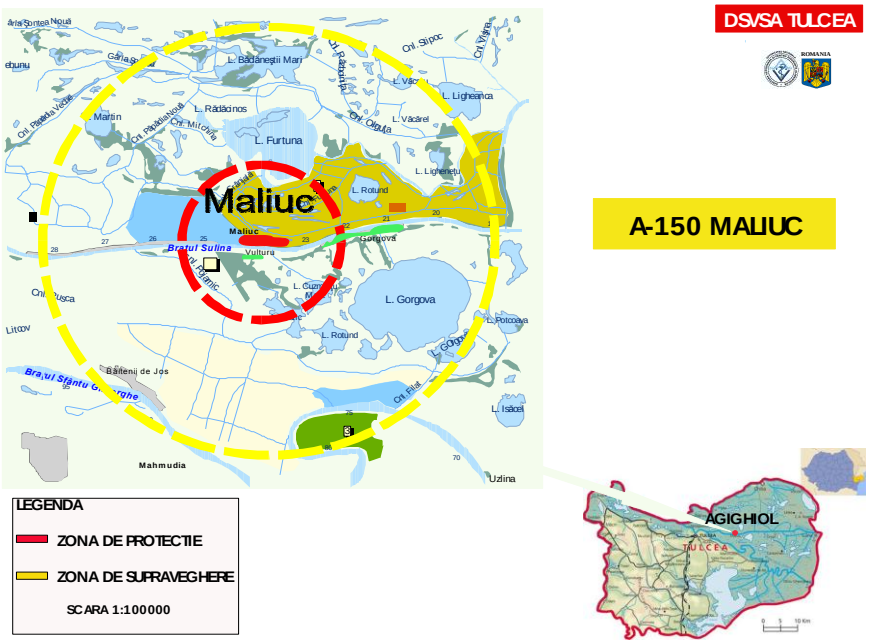


Fig. 1 Focarul de gripa aviara de la Maliuc

CONCLUZII:

1. Cauza apartitei gripei aviare la pasarile domestice a fost coabitarea acestora cu lebedele bolnave.
2. Combatrea bolii in localitatile din Delta Dunarii se realizeaza cu dificultate si nu poate urmari fidel planul de continegra pentru gripa aviara datorita particularitatilor locale: cai de acces pe apa, sistemul extensive de cresterea, pasarile salbatice
3. Combatera bolii si evitarea raspandirii se poate realize prin masuri rapide si corecte.

BIBLIOGRAFIE:

1. **Arsene M., Arsene Marinela, Savuta Ghe., T. Perianu, (2006),** Aspecte clinice in gripa aviara la lebada de vara (Cygnus olor) – Lucrari stiintifice, USAMV Medicina Veterinara Vol. 49 (8), Ed. Ion Ionescu de la Brad Iasi, pag. 774 – 779;
2. **Arsene M., Arsene Marinela, Savuta Ghe., T. Perianu, (2006),** Aspecte clinice in gripa aviara la gaina – Lucrari stiintifice, USAMV Medicina Veterinara Vol. 49 (8), Ed. Ion Ionescu de la Brad Iasi, pag. 780 – 784;
3. **Maftei D., Siomca O., Avram M., Bria P., Tertis M., Arsene M., (2008)** Rolul pasarilor migratoare in evolutia gripei aviare pe teritoriul judetului Tulcea, Workshop 7-8 feb. 2008, Tulcea;
4. **Perianu Tudor, (2005)** - Boli infectioase ale animalelor. Viroze II Editura Universitas XXI Iasi;
5. **Ord. nr. 98 din 07 oct. 2005** privind aprobarea Planului de contingenta al Romaniei pentru influenta aviara;
6. **Ord. Nr. 311 din 08 august 2001** pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind diagnosticul, profilaxia, supravegherea si combaterea influentei aviare.

ROLUL PASARILOR MIGRATOARE IN EVOLUTIA INFLUENTEI AVIARE PE TERITORIUL JUDETULUI TULCEA

THE ROLE OF THE BIRDS IN THE EVOLUTION OF THE INFLUENCE OF BIRDS FLU IN TULCEA

ARSENE M., MAFTEI D., ARSENE Marinela
DSVSA Tulcea
arsenemarian@yahoo.com

The study was realized in between November 2005 and November 2007 in Tulcea, following the birds role in the transmission the the flu to the poultry of the delta of Danube. We studied the flight track of the birds and the places where the flu was discovered. The 11 flu burning points are situated on the flight track of the birds.

Studiul a fost efectuat in perioada noiembrie 2005 – noiembrie 2007 in judetul Tulcea, urmarindu-se rolul pasarilor migratoare in aparitia gripei aviare la pasarile domestice din Delta Dunarii. Au fost studiate rutele de migratie ale pasarilor salbatice si locurile de aparitie a focarelor de boala. Cele 11 focare sunt situate pe traseul de migratie al pasarilor salbatice.

In urma studiilor se poate spune ca gripa aviara la pasarile domestice se poate datora contactului cu pasarile salbatice de-a lungul cailor de migratie si in apropierea locurilor unde pasarile migratoare se opresc sa manance si sa-si recapete energia necesara continuarii zborului sunt cele mai expuse contactului cu virusul purtat de unele pasari salbatice infectate.

In zona in care a aparut primul focar de gripa aviara din Romania (Ceamurlia de Jos), respectiv a lacului Golovita se intalnesc doua rute de migratie, ceea ce justifica (prin numarul mare de pasari care trec prin zona), aparitia primului focar, dar si a unui numar mare de focare care s-au inregistrat in timpul epizootiei 2005-2006.

Exista doua motive majore pentru care interesul general pentru gripa aviara a crescut foarte mult in ulima vreme. Primul ar fi acela ca toate cercetarile intreprinse dupa 1970 au dus la concluzia ca pasarile constituie un imens si diversificat rezervor de virusuri gripale, de la care acestea trec din cand in cand la alte animale si la om, provocand adevarate pandemii.

Faptul ca an de an pasarile migratoare, venind din nordul Siberiei si Kazahstan, poposesc la noi, in lacurile din Delta Dunarii, fac ca riscul aducerii unor boli deosebit de grave, care prin raspandirea lor in populatiile de pasari domestice, sa provoace pierderi economice, putand merge pana la afectarea sanatatii oamenilor, sa fie ridicat.

In contextul izbucnirii unor focare in partea asiatica a Federatiei Ruse, actiunile de supraveghere pentru influenta aviara au fost intensificate inca de la inceputul anului 2005, iar din luna august au inceput pregatiri tot mai intense ale autoritatilor veterinare din Romania si mai ales ale celor din judetul Tulcea, care au culminat cu organizarea unei simulari la care au participat mai multe judete aflate pe directia de migratie a pasarilor salbatice. Toate aceste pregatiri erau organizate in contextul multiplelor avertizari facute de comunitatea stiintifica, care semnalau faptul ca Delta Dunarii este o zona cu un mare potential de risc pentru evolutia viitoare a acestei boli.

MATERIAL SI METODA

Studiul s-a efectuat in perioada noiembrie 2005 – noiembrie 2007, perioada in care in judetul Tulcea au evoluat 11 focare de gripa aviara. S-a urmarit rolul pasarilor migratoare in aparitia bolii

REZULTATE SI DISCUTII

In data de 07 oct. 2005 Laboratorul National de Referinta confirma primul focar de gripa aviara din Romania in loc. Ceamurlia de Jos. Data aparitiei primului focar este data la care virusul H5N1 este considerat o amenintare directa pentru Europa.

Datele privind evolutia focarelor de gripa aviara in judetul Tulcea pot fi consultate in anexa 1.

Ultimul focar de gripa aviara a fost declarat in data de 27 noiembrie 2007 in localitatea Murighiol la o gospodarie aflata in apropierea luciul de apa. In jurul localitatii se afla lacurile : Saraturi, Ghiolul Petrei, Porculet si Ghiolul Murighiol.

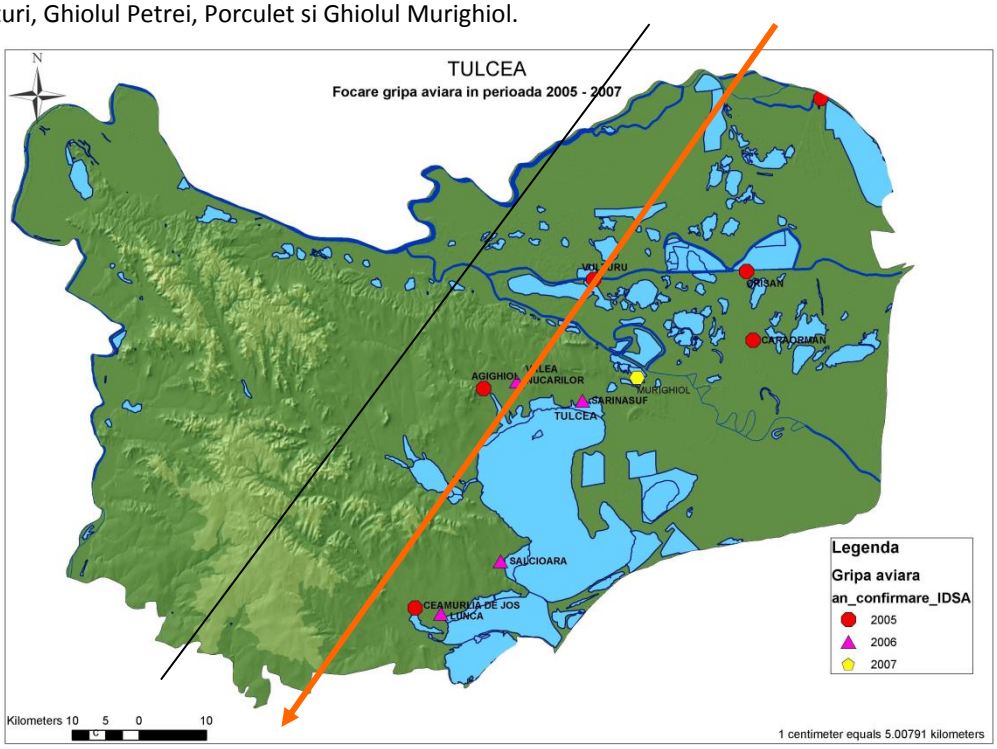


Fig.1 Distributia focarelor de gripa aviara din Tulcea 2005 - 2007

Pe harta din fig. 1 se poate observa aşezarea acestor 11 focare pe un culoar situat pe traseul de migraţie a pasărilor sălbatice. Sapte localitati se afla pe malul unui complex de lacuri si in apropierea unor zone agricole, iar 4 localitati se afla chiar in mijlocul Deltei Dunarii, inconjurate de apa si in mijlocul unei faune ornitologice diversa.

Din punct de vedere climatologic focarele s-au inregistrat in sezonul rece octombrie 2005 – martie 2006 perioada in care in zona deltei exista un mare numar de pasari migratoare.

Analizand evolutia focarelor din punct de vedere al conditiilor climatice se poate constata ca: focarele care au evoluat in perioadele de timp in care se inregistrau frecvent temperaturi pozitive peste 10 ˚C, chiar mai ridicate, acopereau o suprafata mai mare din cadrul acelei benzi (distanta dintre focare era mai mare), pe cand in perioadele in care temperatura era mai scazuta focarele sunt grupate in functie de apropierea de suprafete de apa unde pasarile sa se adaposteasca pe timpul noptii si la adapost de vant, precum si in functie de existenta in apropiere de aceste adaposturi a unor culturi agricole pe care pasarile migratoare sa gaseasca hrana necesara, fara a fi nevoite sa zboare mult timp pentru a ajunge acolo. Aceste focare sunt grupate pe harta in partea de nord si in cea de sud a lacului Razim.

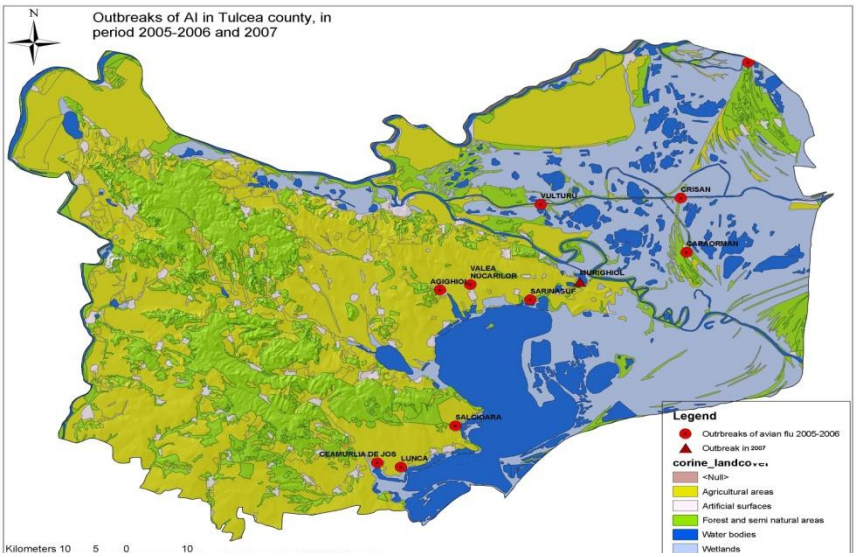


Fig. 2 Harta cu zonele cultivate din jud. Tulcea

De asemenea, numarul focarelor este mai mare in unitate de timp in aceste perioade reci, probabil datorita concentrarii pasarilor in acele locuri.

Ca o observatie suplimentara se poate mentiona faptul ca in lunile decembrie, ianuarie, cand vremea a fost foarte rece, pasarile salbatice nefacand deplasari mari, nu au aparut noi focare, iar odata cu inregistrarea unor temperaturi mai ridicate aria lor de deplasare in cautarea hranei s-a marit, au zburat si deasupra localitatilor, cand probabil fecale au ajuns in anumite gospodarii si atunci numarul focarelor a crescut.

De asemenea acest lucru sugereaza si faptul ca pe parcursul iernii virusul a ramas in regiune, odata cu pasarile care l-au adus, ceea ce inseamna ca riscul transmiterii la pasarile care nu migreaza a fost foarte mare.

Totusi lipsa focarelor in regiune dupa data de 14 martie, indica clar ca pasarile salbatice locale nu au fost contaminate, deci cel putin pana in prezent influenta aviara nu este endemica in aceasta regiune de mare risc.

Focarele care au aparut in restul tarii ulterior acestei date, pot fi datorate pasarilor salbatice care s-au intors din sud, atat celor aflate in pasaj, cat si celor care raman pe parcursul verii pe teritoriul Romaniei.

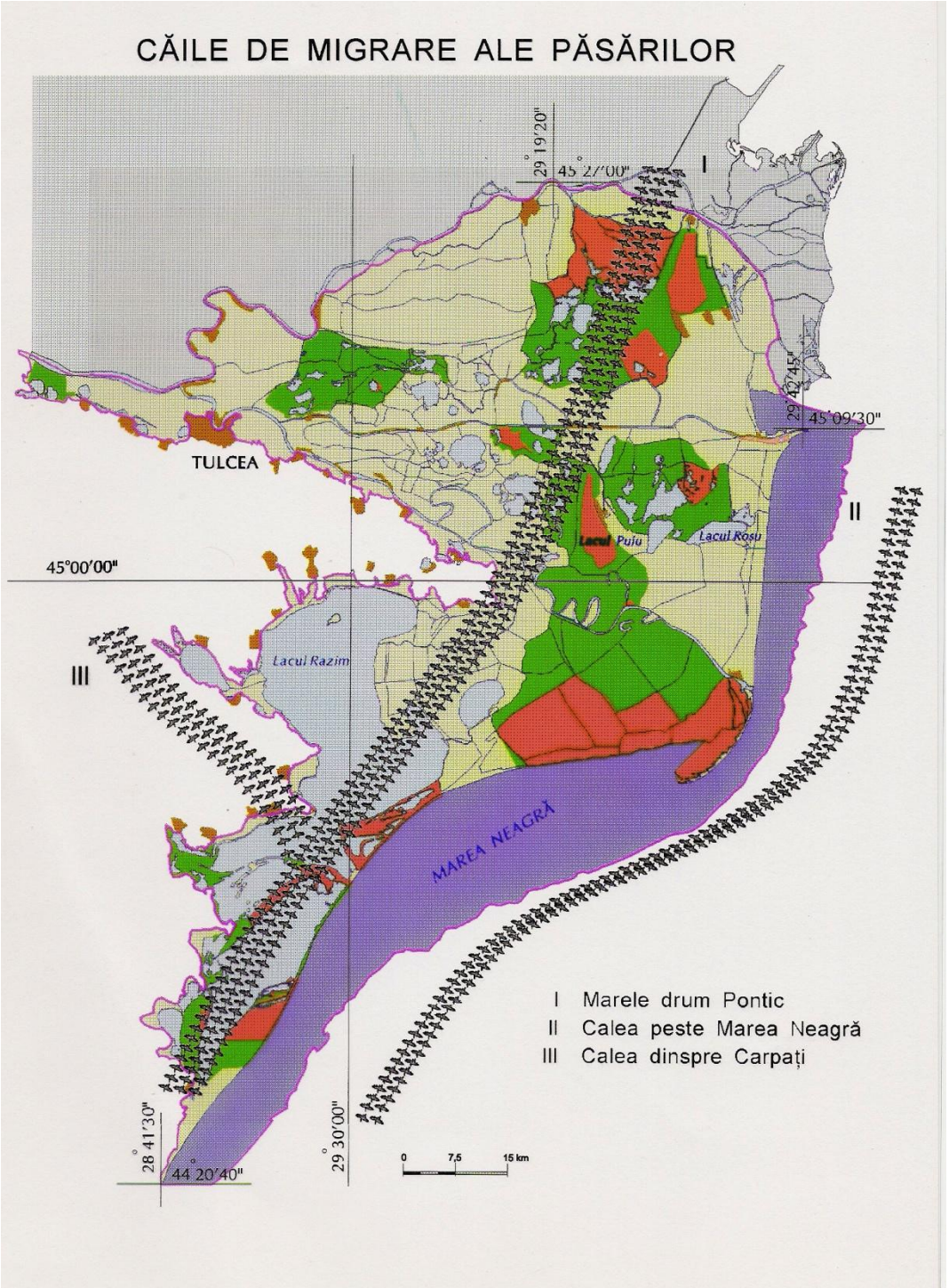


Fig. 3 Caile de migratie ale pasarilor

Se poate observa tendinta de evolutie pe directia NE-SV si incadrarea in acea banda, care corespunde cu traseul de migratie al unor pasari migratoare (Fig. 3). Tendinta de diseminare pe o axa mai apropiata de cea E-V inregistrata la nivelul restului focarelor din Romania, chiar daca totusi se mai poate observa o usoara inclinare NE-SV se poate explica prin faptul ca in judetele invecinate se gasesc imense zone cultivate si de asemenea si numeroase resurse de apa, fapt ce favorizeaza ca un numar mai mare de pasari salbatice sa faca popas in drumul zborului catre sud, spre zone mai calde si de asemenea existenta unei alte rute de migratie, sau poate indica faptul ca harta de migratie nu este

atat de exacta, in sensul ca suprafetele pe care se inregistreaza zborurile de migratie sunt in fapt mult mai mari si de aceea ele cuprind zone atat de mari si ca de fapt harta de migratie mentionata nu indica de fapt decat niste directii, nu si dimensiunea exacta a migratiei.

Tot din harta de migratie se poate observa ca in zona in care a aparut primul focar (Ceamurlia de Jos), respectiv a lacului Golovita se intalnesc doua rute de migratie, ceea ce justifica poate, datorita numarului mare de pasari care trec prin zona, aparitia primului focar, dar si a unui numar mare de focare care s-au inregistrat in timpul epizootiei 2005-2006.

O alta observatie care se poate extrage de aici este ca utilizand evolutia focarelor de gripa aviara in cadrul pasarilor domestice, putem aprecia si intelege mai exact migratia pasarilor salbatice, fapt care ne poate fi de ajutor in viitor in alcatuirea programelor de monitorizare, precum si acelor de combatere impotriva unor boli cu transmiterem prin intermediul pasarilor salbatice.

Cu toate ca harta focarelor (Fig. 1) ne poate indica vizual existenta unor clustere, analiza (by estimating Anselin's local indicator of spatial autocorrelation statistic (ArcGIS™ 9.0. Spatial Statistics), nu confirma existenta unor clustere in cadrul judetului Tulcea, ceea ce poate fi interpretat si ca rezultat al faptului ca pe teritoriul judetului, chiar si pe teritoriul Deltei Dunarii, boala nu a difuzat pe cale terestra, prin intermediul omului, sau al altor vectori, ci doar pe calea aerului, fiind diseminata de catre pasarile salbatice.

E drept ca in anumite situatii (focarele de la Ceamurlia, Agighiol si Sarinasuf) omul sau stransa vecinatate dintre gospodarii si libera circulatie a pasarilor au fost cu siguranta factori ce au condus la aparitia mai multor curti infectate in cadrul aceleiasi localitati.

CONCLUZII:

1. Influenta aviara inalt patogena aparuta la pasarile domestice se poate datora contactului cu pasarile salbatice, mai ales la primele cazuri aparute intr-o regiune noua.
2. Pasarile domestice de apa care traiesc de-a lungul traseelor de migratie a pasarilor salbatice (ca si la locurile de destinatie) si in apropierea locurilor unde pasarile migratoare se opresc sa manance si sa-si recapete energia necesara continuarii zborului sunt cele mai expuse contactului cu virusul purtat de unele pasari salbatice infectate.
3. Utilizand evolutia focarelor de gripa aviara in cadrul pasarilor domestice, putem aprecia si intelege mai exact migratia pasarilor salbatice, fapt care ne poate fi de ajutor in viitor in alcatuirea programelor de monitorizare, precum si a celor de combatere impotriva unor boli cu transmiterem prin intermediul pasarilor salbatice.
4. In zona in care a aparut primul focar de gripa aviara din Romania (Ceamurlia de Jos), respectiv a lacului Golovita se intalnesc doua rute de migratie, ceea ce justifica (prin numarul mare de pasari care trec prin zona), aparitia primului focar, dar si a unui numar mare de focare care s-au inregistrat in timpul epizootiei 2005-2006
5. Pe teritoriul Deltei Dunarii, boala nu a difuzat pe cale terestra, prin intermediul omului sau al altor vectori, ci doar pe calea aerului, fiind diseminata de catre pasarile salbatice.

BIBLIOGRAFIE:

1. **Maftei D., Siomca O., Avram M., Bria P., Tertis M., Arsene M., (2008)** Rolul pasarilor migratoare in evolutia gripei aviare pe teritoriul judetului Tulcea, Workshop 7-8 feb. 2008, Tulcea;
2. **Arsene M., Arsene Marinela, (2007),** Post-crisis surveillance for avian influenza in Romania – Lucrari Stiintifice, USAMV Medicina Veterinara Vol. 50(9), Ed. Ion Ionescu de la Brad Iasi, pag. 456;
3. **Maftei D., Dragnia C., Tertis M., Avram M., Bria P., Arsene M., (2008)** Primul caz de infectie cu virusul gripei aviare la pisica in Romania, Workshop 7-8 feb. 2008, Tulcea;

OBSERVATII PRIVIND DISTRIBUTIA SEROTIPULUI LEPTOSPIRA WOLFFI LA OM SI ANIMALE IN JUDETUL TULCEA

OBSERVATIONS REGARDING THE DISTRIBUTION OF THE SEROTYPE LEPTOSPIRA WOLFFI TO PEOPLE AND ANIMALS IN TULCEA DISTRICT

ARSENE Marinela
DSVSA Tulcea
aricicca@yahoo.com

The studies were held in between 2004-2007 on human and animal serum assay.

The essays were examined in the State Sanitary Veterinary laboratory of Tulcea by the microaglutinare liza reaction.

After finishing the studies we discovered the presence of the stem of Leptospira wolffi in people and animals in the humid zone of Tulcea, where the surface of the localities is covered mostly of water.

LEPTOSPIROZA constituie un grup de boli infectocontagioase comune omului şi multor specii de mamifere domestice şi salbatice, evolueaza cu un tablou clinic foarte variat şi dependent de specie, stare fiziologică, ca şi de serotipul de leptospiroza.

Leptospiroza este o boala transmisibila de larga răspândire, întâlnita pe toata suprafaţa globului.

Este produsă de germeni din genul Leptospira , tradusă clinic prin stări de septicemie, icter, hemoglobinurie, tulburări nervoase, renale, iar la femelele gestante prin avorturi .

Rezervorul de germeni in leptospiroza este reprezentat de animale de diferite specii salbatice sau domestice.

De asemenea, compozitia solului, flora si microflora apelor de suprafata, exercita influente importante asupra leptospirelor favorizand sau limitand supravetuirea lor .

Caile de transmitere, de la animalul purtator la alte animale si om, sunt foarte variate. O atentie deosebita merita apa, solul si alimentele contaminate, si in al doilea rand vectorii.

S-a demonstrat ca intre calea de transmisie a infectiei si modalitatile de infectare a organismelor receptive (animale si om) exista o stransa interrelatie.

Infectia, atat cea umana, cat si cea animala, se poate realiza in trei moduri:

- Direct- de la animal la animal, de la animal la om si chiar de la om la om ;
- Indirect- prin intermediul apei, solului si a alimentelor contaminate;
- Prin vectori.

MATERIAL SI METODA

Testarea serului de animale si uman s-a efctuat in perioada anilor 2004-2007 in cadrul sectiei de Leptospiroza a Laboratorului Sanitar Veterinar Tulcea.

Din setul de diagnostic , in cadrul sectiei de Leptospiroza pentru testarea serului de sange am folosit urmatoarele serotipuri de leptospire:

- L. pomona
- L. tarassovi
- L. icterohaemorrhagiae
- L. canicola
- L. hebdomadis
- L. wolffi
- L. hardjo

Modul de lucru:

Serul de cercetat se dilueaza in solutie fiziologica sterila :

- 490 µl ser fiziologic steril + 10 µl ser de cercetat = dilutia 1/50
- Cu micropipeta se aspira 100 µl ser diluat in prima etapa la care se adaoga 100 µl ser fiziologic steril rezultand dilutia 1/100.
- Serurile se dilueaza in progresie geometrica : 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 etc.

- Din dilutia 1/50 se aspira cu pipeta Pasteur si se repartizeaza pe lame atatea picaturi cate serotipuri de Leptospira vor fi investigate. Pentru fiecare din aceste picaturi se repartizeaza cate o picatura de volum egal de cultura de leptospire extrasa din eprubeta la flacara, cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile. Cultura de leptospire folosita trebuie sa indeplineasca urmatoarele conditii:
- inainte de utilizare in reactie culturile vor fi verificate pentru aglutinabilitate spontana (ca atare si in prezenta solutiei fiziologice de lucru) si specifica(in prezenta serurilor tip, omologate)
- sunt admise pentru lucru culturile de 6-14 zile in stare pura (necontaminate cu bacterii sau miceti) care sunt suficient de mobile, de dense(100-200 elemente pe un camp microscopic), care nu aglutineaza spontan si care aglutineaza in prezenta serului specific de tip la titrul indicat de producator
- culturile necorespunzatoare vor fi eliminate.
- preparatele se acopera cu lamela si se incubeaza cca. 30minute la temperatura camerei , ferite de razele solare.
- Citirea reactiei se face la microscopul cu camp intunecat , urmarind aglutinarea leptospirelor in campul microscopic.
- Aglutinarea se evidentiaza prin agregarea leptospirelor in gheme cu aspect stelat sau de păianjen, mobile datorita extremitatilor libere in miscare.
- Cand serurile contin concentratii mari de anticorpi, se produce fenomenul de liza exprimat prin imobilizarea, pierderea, conturului si fragmentarea leptospirelor. Prin prelungirea timpului de reactie, in campul microscopic raman doar mici puncte granulare, luminescente reprezentand ultimele resturi ale leptospirelor lizate.

REZULTATE SI DISCUTII

In cadrul unui studiu epidemiologic privind leptospiroza la animalele de interes economic – bovine, suine, cabaline- si la om am urmarit serotipul intalnit la fiecare specie de animale cat si la oameni

Numarul de probe care l-am supus examenului serologic prin tehnica RMAL in perioada 2004 – 2007 a fost urmatorul:

Numarul de probe care l-am supus examenului serologic prin tehnica RMAL in perioada 2004 – 2007 a fost urmatorul:

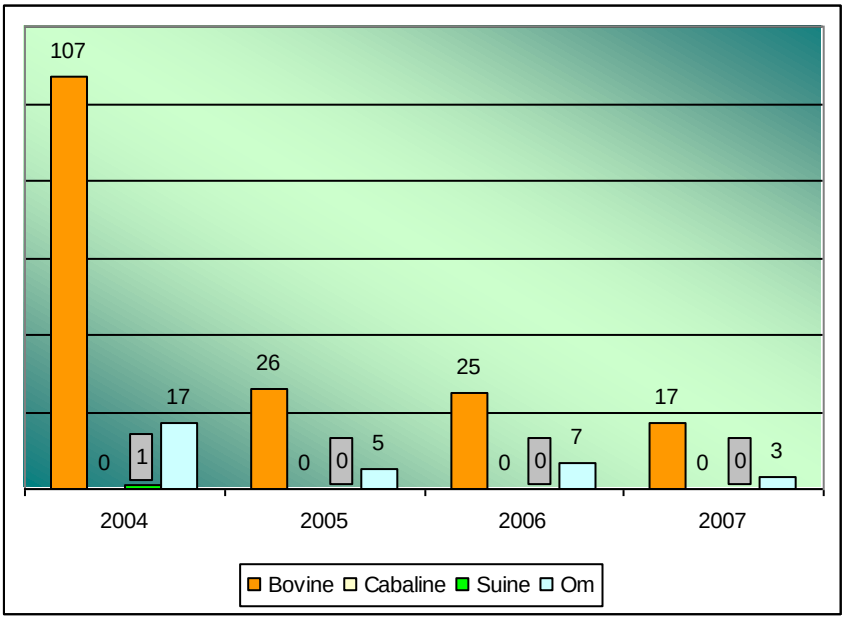
Tabelul 1

Anul	Bovine	Cabaline	Suine	Om
2004	2360	0	290	109
2005	1903	838	111	33
2006	1802	826	118	81
2007	1688	773	110	68
total	7753	2437	629	291

Numarul de cazuri pozitive de leptospiroza aparute in perioada 2004-2007 sunt:

Tabelul 2

Anul	Bovine	Cabaline	Suine	Om
2004	107	0	1	17
2005	26	0	0	5
2006	25	0	0	7
2007	17	0	0	3
total	175	0	1	32



Cel mai frecvent serotip intalnit la bovine a fost L. Wolffi, la suine L. Icterohaemorrhagiae si L. Pomona, la cabaline L. Pomona(rezultatele au fost dubioase cu titru de 1/400). Au reactionat serologic pozitiv la bovine cu titru cuprins intre 1/200-1/3200. Bovinele serologic pozitive la L. wolffi provin din zonele de balta ale judetului Tulcea.

In urma examinarii probelor de sange uman am obtinut urmatoarele rezultate in perioada 2004-2007:

Tabelul 3

Anul	probe lucrate	pozitive	negative
2004	109	17	92
2005	33	5	28
2006	81	7	74
2007	68	3	65
total	291	32	259

In urma analizelor la probele de sange uman am intalnit serotipul L.wolffi in urmatoarele localitati:

Tabelul 3

Nr.crt	Serotipul	Localitatea	Ocupatia
1.	L. wolffi	Chilia Veche	Muncitor agricol
2.	L. wolffi	Murighiol	operator
3.	L. wolffi	Isaccea	pescar
4.	L. wolffi	Sulina	elev
5.	L. wolffi	Dunavatu de jos	pescar

CONCLUZII

1. de leptospiroza se pot imbolnavi atat oamenii cat si animalele
2. persoanele suspicionate de boala provin din zone cu o cantitate de apa mare, balti etc.
3. majoritatea persoanelor bolnave au venit in contact cu mediile contaminate prin meseria care o au(pescari, ingrijitori de animale, gradinarii, copii ce se scalda in diverse balti din apropierea satelor etc)
4. s-a remarcat predominanta serotipului L. wolffi la bovine si L. Icterohaemorrhagiae, L. Wolffi, L. canicola la om.
5. acolo unde exista boala la animale exista si cazuri umane de leptospiroza

6. boala este intalnita in tot cursul anului, dar mai ales in anotimpurile calde.
7. incepand cu anul 2004 si pana in 2007 ne-am confruntat cu un anotimp mai secetos din care am constatat o reducere semnificativa a cazurilor de leptospiroza atat la animale cat si la om

BIBLIOGRAFIE

1. BERCEA L, - LEPTOSPIROZELE ANIMALELOR DOMESTICE, BUCURE$T1, ED. AGRO-SILVICA., 1969
2. I.D.S.A.- GHID DE IMUNOLOGIE TEORETICA SI PRACTICA , BUCURESTI, 2001
3. PERIANU T., - BOLI INFECTIOASE ALE ANIMALELOR BACTERIOZE, VOL. I., 1996
4. RADULESCU RUXANDRA, GELA PETRICEANU, VERONICA CONSTAN'TINESCU- INFORMATII EPIDEMIOLOGICE PRIV1ND LEPTOSPIROZA LA ANIMALE IN PERIOADA ULTIMELOR 10 ANT, 1985 - 1995, AL III -LEA SIMPOZION OMAGIAL L.C.S.V.D. , 1996

STUDIUL CAZURILOR SEROLOGIC POZITIVE LA BOVINE CU TULPINA LEPTOSPIRA WOLFFI IN LOCALITATILE DIN DELTA DUNARII

THE STUDY OF THE CASES SEROLOGIC POSITIVE ON THE BOVINE WITH THE STEM OF LEPTOSPIRA WOLFFI IN THE LOCATIES OF DELTA OF DANUBE

ARSENE Marinela, ARSENE M.
DSVSA Tulcea
aricicca@yahoo.com

The studies were held in between 2004-2007 on a number of 7753 bovine serum essays coming from different localities of the Delta of Danube.

The essays were examined in the State Sanitary Veterinary laboratory of Tulcea by the microaglutinare liza reaction.

After finishing the studies we discovered that the predominant serotype is L. wolffi and that it`s frequently meet where the surface of the localities is covered mostly of water.

Out of a total of 7753 bovine serum essays, 175 had a positive reaction and 124 were strange.

Leptospirozele constitue un grup de boli infectioase datorate unor agenti patogeni denumiti leptospire, din familia Spirochaetaceae.

Astazi sunt cunoscute numeroase leptospire patogene, care se diferentiaza intre ele in primul rand serologic si prezinta patogenitate diferita pentru animalele de laborator si pentru animalele rezervoare naturale de leptospire.

Stabilirea ulterioara, a incidentei infectiei cu leptospire la aceste animale si apoi la multe alte specii de animale, a fundamentat constatarea ca leptospirozele sunt zoonoze.

Modul de infectie este legat de biologia leptospirelor . Nerezistand la conditii de mediu cu uscaciune si aciditate , leptospirele pot supravietui numai in ape sau soluri umede cu ph usor alcalin .

MATERIAL SI METODA

Testarea serului de bovine s-a efctuat in perioada anilor 2004-2007 in cadrul sectiei de Leptospiroza a Laboratorului Sanitar Veterinar Tulcea.

Din setul de diagnostic , in cadrul sectiei de Leptospiroza pentru testarea serului de sange am folosit urmatoarele serotipuri de leptospire:

- L. pomona
- L. tarassovi
- L. icterohaemorrhagiae
- L. canicola
- L. hebdomadis
- L. wolffi
- L. hardjo

Modul de lucru:

Serul de cercetat se dilueaza in solutie fiziologica sterila :

- 490 µl ser fiziologic steril + 10 µl ser de cercetat = dilutia 1/50
- Cu micropipeta se aspira 100 µl ser diluat in prima etapa la care se adaoga 100 µl ser fiziologic steril rezultand dilutia 1/100.
- Serurile se dilueaza in progresie geometrica : 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 etc.
- Din dilutia 1/50 se aspira cu pipeta Pasteur si se repartizeaza pe lame atatea picaturi cate serotipuri de Leptospira vor fi investigate. Pentru fiecare din aceste picaturi se repartizeaza cate o picatura de volum egal de cultura de leptospire extrasa din eprubeta la flacara, cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile. Cultura de leptospire folosita trebuie sa indeplineasca urmatoarele conditii:

- inainte de utilizare in reactie culturile vor fi verificate pentru aglutinabilitate spontana (ca atare si in prezenta solutiei fiziologice de lucru) si specifica(in prezenta serurilor tip, omologate)
- sunt admise pentru lucru culturile de 6-14 zile in stare pura (necontaminate cu bacterii sau miceti) care sunt suficient de mobile, de dense(100-200 elemente pe un camp microscopic), care nu aglutineaza spontan si care aglutineaza in prezenta serului specific de tip la titrul indicat de producator
- culturile necorespunzatoare vor fi eliminate.
- preparatele se acopera cu lamela si se incubeaza cca. 30minute la temperatura camerei , ferite de razele solare.
- Citirea reactiei se face la microscopul cu camp intunecat , urmarind aglutinarea leptospirelor in campul microscopic.
- Aglutinarea se evidentiaza prin agregarea leptospirelor in gheme cu aspect stelat sau de păianjen, mobile datorita extremitatilor libere in miscare.
- Cand serurile contin concentratii mari de anticorpi, se produce fenomenul de liza exprimat prin imobilizarea, pierderea, conturului si fragmentarea leptospirelor. Prin prelungirea timpului de reactie, in campul microscopic raman doar mici puncte granulare, luminescente reprezentand ultimele resturi ale leptospirelor lizate.

REZULTATE SI DISCUTII

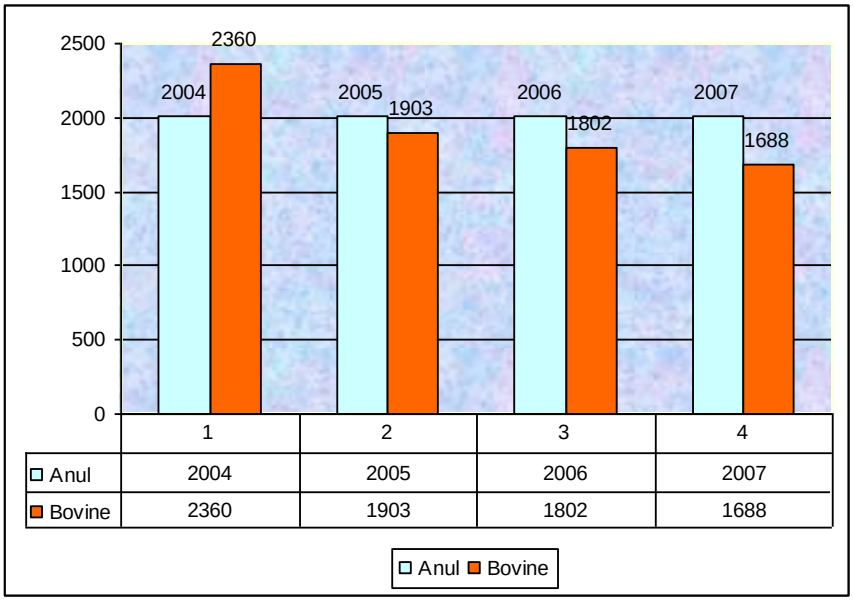
In cadrul unui studiu epidemiologic privind leptospiroza la animalele de interes economic – bovine am urmarit :

1. numarul de cazuri aparute in fiecare an
2. distributia geografica a cazurilor serologic pozitive

Din cele 7753 probe un numar de 175 de probe au reactionat pozitiv la serotipul L.wolffi si 124 de probe au fost dubioase .

Numarul de probe care l-am supus examenului serologic prin tehnica RMAL in perioada 2004 – 2007 a fost urmatorul:

Tabelul 1

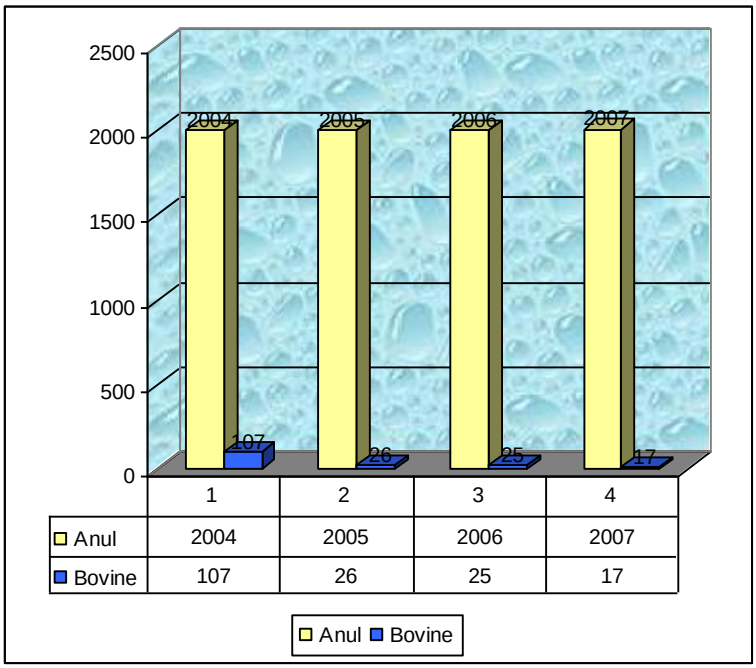


Studiul a fost efectuat pe intreg judetul Tulcea si a cuprins majoritatea localitatilor .

Fig. 1

Numarul de cazuri pozitive de leptospiroza aparute in perioada 2004-2007 sunt:

Tabelul 2



Rezultate pozitive s-au inregistrat in localitatile:

Tabelul 3

Nr.crt	Localitatea	Nr. cazuri Bovine
1.	Nalbant	2
2.	Murighiol	16
3.	Chilia-Veche	51
4.	Tudor Vladimirescu	3
5.	Ceatalchioi	1
6.	Sulina	27
7.	Sarinasuf	2
8.	Isaccea	5
9.	Iazurile	2
10.	Dunavatu de jos	11
11.	Cardon	4
12.	Pardina	15
13.	Ceamurlia de jos	9
14.	Letea	13
15.	Balta Ivanova	10
16.	Crisan	2
17.	Jurilovca	2
18.	Mineri	0

CONCLUZII

1. din totalul de 7753 probe de ser de bovine , 175 au reactionat pozitiv si 124 au fost dubioase
2. s-a remarcat predominanta serotipului L. wolffi la bovine
3. frecventa mai mare a cazurilor de leptospiroza la bovine , comparativ cu alte specii de animale domestice se explica prin faptul ca bovinele convietuiesc in cirezi si care pot pasuna in zone mai mlastinoase (iazuri) unde se pot gasi leptosire
4. solul poluat poate sa duca la infectii, deoarece leptospirele patrund in organism prin solutii de continuitate, tegumente, mucoase
5. frecventa crescuta a imbolnavirilor este in zona umeda a judetului Tulcea acolo unde suprafata localitatilor este acoperita in proportie mare de apa.

BIBLIOGRAFIE

1. BERCEA L, - LEPTOSPIROZELE ANIMALELOR DOMESTICE, BUCURE$T1, ED. AGRO-SILVICA., 1969
2. I.D.S.A.- GHID DE IMUNOLOGIE TEORETICA SI PRACTICA , BUCURESTI, 2001
3. PERIANU T., - BOLI INFECTIOASE ALE ANIMALELOR BACTERIOZE, VOL. I., 1996
4. RADULESCU RUXANDRA, GELA PETRICEANU, VERONICA CONSTAN'TINESCU- INFORMATII EPIDEMIOLOGICE PRIV1ND LEPTOSPIROZA LA ANIMALE IN PERIOADA ULTIMELOR 10 ANT, 1985 - 1995, AL III -LEA SIMPOZION OMAGIAL L.C.S.V.D. , 1996

STRATEGII DE SUPRAVEGHERE A FeLV ÎN ROMÂNIA

STRATEGIES OF FeLV SURVEILLANCE IN ROMANIA

BARAITAREANU S.1, BĂRĂITĂREANU Ancuţa Paula2, DANEŞ Doina1, BERCEA Ion1
[1]FMV Bucureşti
[2]ANSVSA.

Feline leukemia virus (FeLV) is member of the Retroviridae family, and may establish persistent infections in domestic cat (Felis catus). Morbidity and mortality rates are high in domestic cats worldwide. Accordingly, the everyday veterinary practice should aim to detect these retroviruses in all cats that come to the practitioner for the first time in order to control the infection. To investigate the prevalence of FeLV in domestic cats in Romania, we propose two epidemiosurveillance screening models. Those models have the main purpose to identify the prevalence and incidence for feline leukemia virus in the population of cats in Romania.

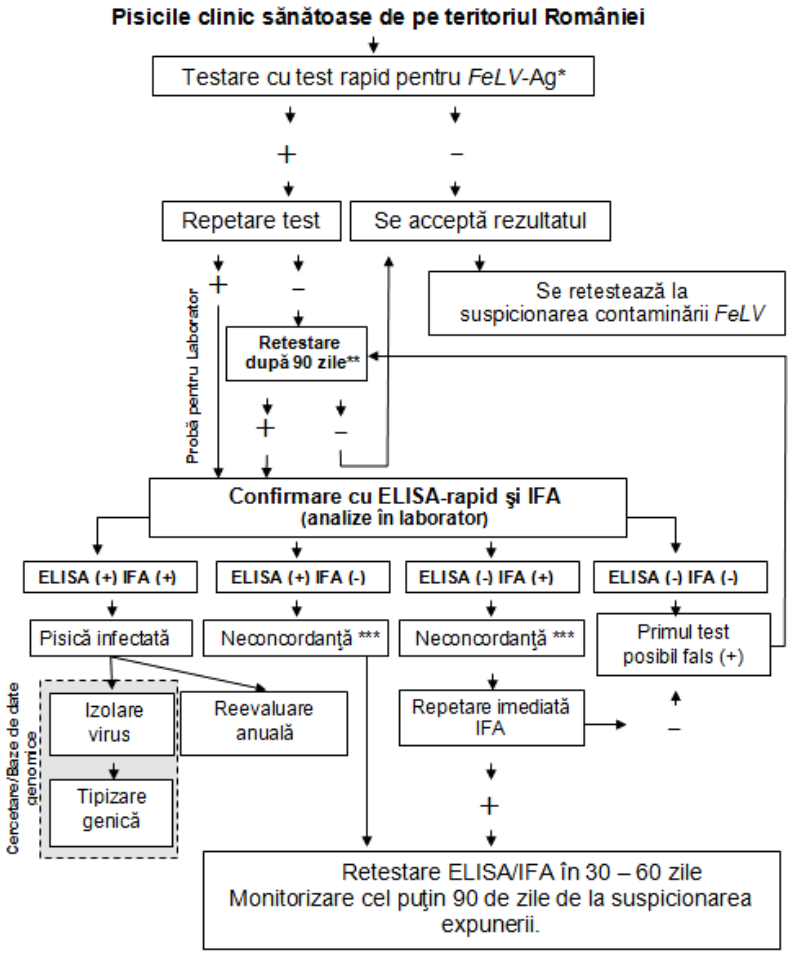
Key words: feline, leukemia, virus, epidemiological surveillance, Retroviridae

FeLV (8) este un retrovirus de importanţă particulară pentru medicina veterinară (6, 7) fiind utilizat ca model pentru cercetările tumorale (5,8), acesta determinând la pisicile domestice imunodeficienţă şi boală neoplazică (4). Imunosupresia expune pisicile la infecţii secundare ale aparatului respirator, anemie, infecţii bucale şi afecţiuni cutanate. Boala neoplazică se manifestă ca limfom sau leucemie.

Pe plan mondial prevalenţa *FeLV* este de 1-4%, dar poate atinge 13% la pisicile prezentate la veterinar cu diferite afecţiuni şi peste 30% (evoluţie endemică) la pisicile care trăiesc în colectivităţi (crescătorii, pensiuni). Cel mai frecvent infecţia este raportată la reproducători şi grupa de vârstă 1-6 ani. Investigaţiile retrospective asupra bolii canceroase presupun şi estimarea riscului relativ, necesar în stabilirea cotei de influenţă a factorului de risc testat, aşa cum este în *FeLV* aprecierea riscul de exprimare clinică la suprainfecţii. Populaţia de pisici libere are un risc de expunere de 50%, cu 1 - 2% risc pentru viremia persistentă. Proporţia pisicilor din crescătorii sau alte aglomeraţii similare (menajerii, pensiuni) contaminate este de 70 - 100%, din care 30 - 50% fac viremie persistentă (4, 7, 8).

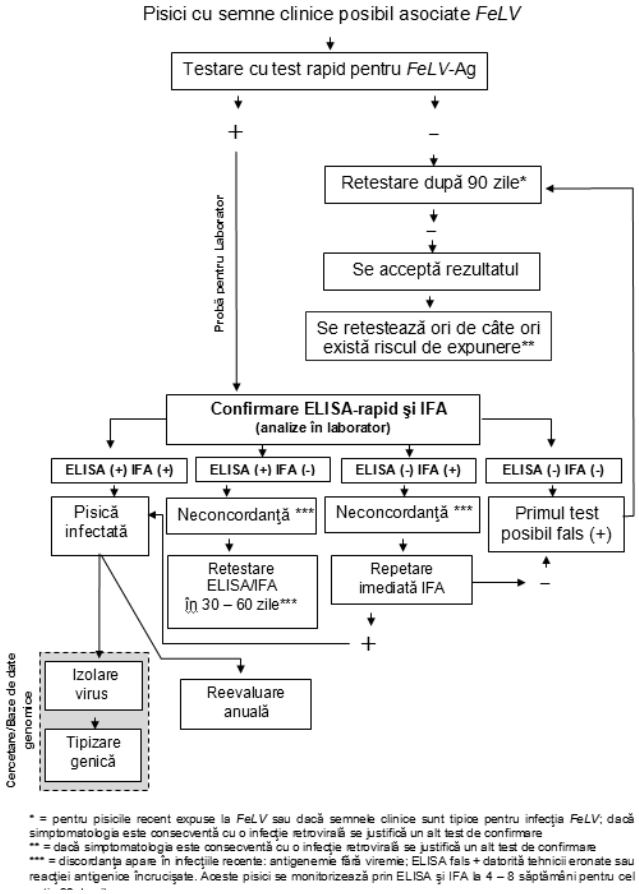
Acumularea şi sistematizarea informaţiilor privind factorii de risc ai oncopatiilor va fi valorificată prin stabilirea unei conduite eco-onco-profilactice judicioase (1).

Particularităţile patogenetice ale infecţiei *FeLV*, aşa cum sunt ele cunoscute la această dată, alături de cunoştinele acumulate în studiile epidemiologice derulate pe plan internaţional şi naţional au permis creionarea unor principii de monitorizare şi diagnostic epidemiologic, aplicabile în populaţia de pisici din România. Primele diagrame de monitorizare a *FeLV* au fost prezentate de noi în mai 2006 (2), perioadă în care literatura de specialitate nu semnala prezenţa acestui virus în România. Odată cu apariţia primelor cazuri pozitive (2) informaţiile epidemiologice colectate de la aceste cazuri au permis îmbunătăţirea programelor de control (schemele 1 şi 2).



* = evaluarea riscului infecţiei pe baza anamnezei nu este absolută
** = pentru siguranţă maximă retestarea trebuie făcută la 90 de zile postexpunere
*** = discordanţe datorate infecţiilor recente (antigenemie fără viremie); ELISA fals + datorită tehnicii eronate sau reacţiei antigenice încrucişate.

Schema 1. Programul de control FeLV la pisicile clinic sănătoase de pe teritoriul României



Schema 2. Programul de control al FeLV la pisicile bolnave de pe teritoriul României

BIBLIOGRAFIE

1. Bărăităreanu S, Bărăităreanu AP, Pavel IC, Balint E, Daneş D, Manolescu N. Epidemiological screening study of Feline Leukemia Virus Romanian Journal of Comparative Oncology and Technology Transfer, No.12 sept.2006, p.813. ISSN 1584-6547.
2. Bărăităreanu S, Soare T. Preliminary Results In Confirmation Diagnostic Of The First Episode Of Feline Leukaemia Virus Disease Identified In Bucharest Faculty Of Veterinary Medicine. Scientific Works, C Series, Vol. XLIX. 2006; 161-168
3. Bărăităreanu S., Bărăităreanu AP, Daneş D,Bercea I. Epidemiopravegherea oncoretrovirozelor la feline. Al V-lea Simpozion Naţional Aniversar al Institutului de Diagnostic şi Sănătatea Animală „40 ani de la înfiinţare", 9-10 mai 2006.
4. Barr C. Margaret in Tilley LP, F.W.K. (2002) Smith The 5 Minute Veterinary Consult. Canine and Feline. Lippincott Williams & Wilkins ed., 588-589.
5. Essex, M. E. (1982). Feline leukemia: a naturally occurring cancer of infectious origin. Epidemiologic Reviews 4, 189-203.[Medline]
6. Hardy, W. D.Jr & McClelland, A. J. (1977). Feline leukemia virus. Its related diseases and control. Veterinary Clinics of North America .7: 93-103.[Medline]
7. Hoover, E. A., Olsen, R. G., Hardy, W. D.Jr, Schaller, J. P., Mathes, L. E., Cockerell, G. L. (1975). Biologic and immunologic response of cats to experimental infection with feline leukemia virus. Bibliotheca Haematologica. 43:180-183.[Medline]
8. Jarrett, W. F. (1975). Cat leukemia and its viruses. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine 19:165-193.[Medline]

MANAGEMENTUL PATOLOGIEI RESPIRATORII INFECTIOASE LA TINERETUL SUIN

YOUNG SWINE MANAGEMENT FOR INFECTIOUS RESPIRATORY PATHOLOGY

BARAITAREANU S.[1], BĂRĂITĂREANU Ancuţa Paula[2], COBZARIU D.[1], BALABAN A.[3], CAMPEANU M.V.[1], DANEŞ Doina [1]

[1]F MV Bucureşti

[2]ANSVSA.

[3]SC Ferme Plus SRL

Patologia uzual intalnita la tineretul suin, atât cei sugari cât si cei intarcati, in sistemul de crestere intensiv este orientata pe respirator si/sau digestiv. Iar aceasta se constituie in principala cauza a mortalitatii si afectarii performantelor ulterioare ale indivizilor afectati. De aceea mentinerea sanatatii efectivelor de porcine se obtine prin respectarea masurilor profilactice generale la care se adauga, pentru unele boli, si programele imunoprofilactice integrate. Un punct nevralgic in exploatarea intensiva a porcului este sectorul maternitate, spatiu in care sunt cazate animale in stari fiziologice particulare, care solicita o atentie sporita (scroafe ce urmeaza sa fete, purceii cu grad redus de imunitate, purceii in alaptare).

In prezenta lucrare, in urma analizei complexe a patologiei infecto-contagioase din sfera respiratorie utilizând datele anatomopatolgice si de laborator (ELISA) s-a urmarit identificarea principalelor cauze ale morbiditatii si mortalitatii la tineret.

Cuvinte cheie: Complex respirator porcin, management, ELISA, anatomopatologic, epidemiosupraveghere

In populaţia de suine bolile respiratorii determina pierderile economice cele mai importante. Evaluarea statusului imun fata de principalii agenti infectiosi (bacterieni si virali) ce actioneaza primar sau secundar asupra aparatului respirator se constituie intr-o activitate profilactica deosebit de importanta. Datele colectate prin anchete epidemiologice, examene clinice si anatomopatologice furnizeaza suficiente informaţii in orientarea diagnosticul spre evoluţia unui complex respirator porcin, totuşi ramân multe necunoscute ce se transpun in probleme manageriale la nivelul industriei de profil. Corelarea datelor de mai sus cu investigaţiile serologice prin teste ELISA destinate atât diagnosticului de confirmare cat si evaluarii statusului imun post-vaccinal este o activitate practicata uzuala.

Material si metoda

Populaţia de suine analizata a fost grupata in 32 loturi, acestea provenind din 9 societaţi comerciale diferite. Probele de ser au fost recoltate randomizat din hale in care s-au semnalat intr-o masura mai mare afectiuni respiratorii. In paralel cu testarea serologică prin tehnica ELISA au fost efectuate si o serie de examene anatomopatologice.

Din ferma I au fost recoltate 60 probe (Purcei la inţarcare – 20 probe, Grasuni 90 -110 zile – 20 probe, Grasuni de 140 -150 zile – 20 probe), din ferma II au fost recoltate 61 probe (Purcei la inţarcare – 11 probe, Grasuni 90 -120 zile – 20 probe, Grasuni de 140-150 zile – 20 probe, Scrofiţe – 10 probe), din ferma III au fost recoltate 38 probe (Purcei la inţarcare – 13 probe, Grasuni 110 zile – 10 probe, Grasuni 130-150 zile – 15 probe), din ferma IV au fost recoltate 82 probe (Purcei la inţarcare – 20 probe, Grasuni 110-120 zile – 20 probe, Grasuni 160-180 zile – 20 probe, Scroafe – 22 probe), din ferma V au fost recoltate 51 probe (Purcei la inţarcare – 12 probe, Grasuni 75-60 zile – 26 probe, Grasuni 110-125 zile – 13 probe, Grasuni 160-170 zile – 13 probe, din ferma VI au fost recoltate 60 probe (Grasuni 130 zile – 20 probe, Grasuni 170 zile – 20 probe, Grasuni 185 zile – 20 probe), din ferma VII au fost recoltate 65 probe (Purcei la inţarcare – 20 probe, Grasuni 110 zile – 20 probe, Grasuni 130-150 zile – 25 probe), din ferma VIII au fost recoltate 80 probe (Purcei la inţarcare – 20 probe, Grasuni 110-120 zile – 20 probe, Grasuni 160-180 zile – 20 probe, Scroafe – 20 probe). din ferma IX au fost recoltate 80 probe (Purcei la inţarcare – 20 probe, Grasuni 90 -120 zile – 20 probe, Grasuni de 140-150 zile – 20 probe, Scrofiţe – 20 probe).

Pentru evaluarea statusului imun al efectivelor de suine introduse in studiu au fost utilizate urmatoarele kituri de diagnostic ELISA: HerdChek Pseudorabies Virus gB Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., USA); CHEKIT APP-ApxIV Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., USA); HerdChek Micoplasma Hyopneumoniae Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., USA); HerdChek Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., USA); HerdChek Swine Influenza Virus Antibody Test Kit – H1N1 (IDEXX Laboratories, Inc., USA); HerdChek Swine Influenza Virus Antibody Test Kit – H3N2 (IDEXX Laboratories, Inc., USA); HerdChek Swine Salmonella Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., USA).

Protocoale de lucru utilizate au fost cele specifice Laboratorului de Serologie al Facultații de Medicina Veterinara Bucureşti, aceste protocoale au ținut cont de recomandarile producatorului (IDEXX Laboratories, Inc., USA), de echipamentul utilizat şi particularitățile constructiv-organizatorice ale spațiilor de lucru.

Rezultate si discutii

In baza anchetei epidemiologice şi a tabloului clinico-lezional atenția s-a focalizat pe cercetarea statusului imun fața de posibila infecție cu: *Actinobacillus pleuropneumoniae, Virusul Boli Aujeszky, Virusul Influenza Suin, Salmonella spp., Virusul Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* şi *Mycoplasma hyopneumoniae*.

In ultima etapa a cercetarii s-a orientat activitatea spre studierea in dinamica a evoluției bolilor mai sus amintite, urmarindu-se obținerea unor informații cât mai realiste referitoare la impactul economic al patologiei respiratorii asupra exploatațiilor de suine din România. Rezultatele obținute completeaza astfel datele obținute de catre partenerii din cadrul proiectului de cercetare, şi permite in acelaşi timp o analiza comparativa a rezultatelor experimentale cu cele din practica de teren. Investigațiile de laborator au pus un accent deosebit pe evaluarea serologica a efectivelor de suine incluse in cercetare. Acestea s-au adresat unor categorii diferite de suine ce apartin tuturor sectoarelor de exploatare a suinelor plecându-se de la scroafele de reproducție şi pâna la porcii la ingraşat. In urma investigațiilor complexe efectuate in efectivele de suine incluse in cercetarea noastra au fost obținute rezultatele prezentate sintetic in tabele de mai jos.

Rezultatele evaluarii prin ELISA a statusului imun fața de H1N1 la purcei imediat dupa ințarcare a evidențiat un status imun negativ de 51% si de 49% al pozitivilor cu o tendința de de mentinere a procentului pozitivilor la purceii din ingrasatorii, dar cu o crestere evidenta a poyitivilor in efectivul de scroafe (78%). O situație similara cu cea intâlnita si in studii anterioare, dar la valori procentuale diferite comparativ cu cele observate la tulpina H1N1 este inregistrata la virusul influenței H3N2. La purceii dupa ințarcare 97,2% din rezultate au fost negative iar la cei din perioada de finisare 67% şi la scrofițele 49%. Cu toate ca ambele tulpini de virus al influenței au fost depistate in fermele de porci investigate, serotipul H1N1 este mult mai frecvent intâlnit comparativ cu serotipul H3N2.

Din datele obținute prin ELISA cu trusa de diagnostic *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit (IDEXX Inc., USA) se rețin rezultatele pozitive semnificative, in procent de 30% la purcei imediat dupa ințarcare, 12% la cei in perioada de ingraşare, 17% la cei aflați in finisaj şi de 69% la tineretul femel de inlocuire. La aceste rezultate se adauga şi aproximativ 6% rezultate incerte care sugereaza o evoluție activa a infecției micoplasmice in unele efective.

Situația a fost altfel abordabila in cazul evaluarii statusului imun fața de virusul PRRS. Fermele incluse in cercetare au beneficiat de investiile din primele faze ale cercetarii, ele dispunând de programe de profilaxie a PRRS adresate, in cadrul unora din ferme, intregului efectiv de suine, indiferent de categoria de exploare sau de vârsta. Aceasta colaborare a avut ca efect imbunatațirea evidenta a statusului imun. Iar numar semnificativ de rezultate negative nu a mai fost identificat. Rezultatele obținute la testul ELISA pentru PRRS au fost: 51% purcei testați la ințarcare negativi, 13% purcei testați la ințarcare pozitivi, 29% din scrofițe negative.

Evaluarea prin test ELISA a statusului imun fața de *Actinobacillus pleuropneumoniae* la porcii incluşi in cercetare a scos in evidența un numar ridicat de rezultate pozitive la toate categoriile de porci testate: 43% purcei la inarcare pozitivi, 20% porci in perioada de ingraşare pozitivi , 19,7% porci la finalul perioadei de ingraşare pozitivi, 68% din tineretul femel de inlocuire pozitive. La aceste rezultate se adauga aproximativ 3% probe cu rezultat incert.

In urma utilizarii testului ELISA pentru evaluarea statusului imun faţa de virusul bolii Aujeszky au fost obţinute urmatoarele rezultate: 2,1% din purceii testaţi la momentul inţarcarii au fost negativi, 96,9% din purceii testaţi la momentul inţarcarii au avut rezultate pozitive, 1% din purceii testaţi la momentul inţarcarii au avut rezultate incerce (recomandare recontrol), 8% din porcii testaţi in perioada de testare au avut rezultate negative, 91% din porcii testaţi in perioada de testare au avut rezultate pozitive, 1% din porcii testaţi in perioada de testare au solicitat recontrol, 8,5% din porcii aflaţi in perioada finala de ingraşare au avut rezultate negative, 88% din porcii aflaţi in perioada finala de ingraşare au avut rezultate pozitive, 3,6% din porcii aflaţi in perioada finala de ingraşare au avut rezultate care recomandau recontrolul, 1% din tineretul femel de inlocuire a avut rezultate negative şi 99% din tineretul femel de inlocuire a avut rezultate pozitive.

Testarea suinelor prin ELISA pentru evaluarea statusului imun faţa de *Salmonella sp.* A furnizat urmatoarele rezultate: 68% din din purceii testaţi la momentul inţarcarii au fost negativi, 32% din purceii testaţi la momentul inţarcarii au avut rezultate pozitive, 82% din porcii testaţi in perioada de testare au avut rezultate negative, 18% din porcii testaţi in perioada de testare au avut rezultate pozitive, 22% din porcii aflaţi in perioada finala de ingraşare au avut rezultate negative, 78% din porcii aflaţi in perioada finala de ingraşare au avut rezultate pozitive, 1,5% din tineretul femel de inlocuire a avut rezultate negative şi 98,5% din tineretul femel de inlocuire a avut rezultate pozitive.

Statusul imun al efectivului de scroafe joaca un rol major in protejarea sugarilor fata de o serie de agenti patogeni sau potential patogeni. Posibilitatea evolutiei unor infectii inaparente poate determina in sectorul maternitate aparitia unor afectiuni din cele mai variate din care cele de tip respirator ocupa un rol major mai ales daca nu sunt respectate conditiile de microclimat. Dupa cum se prezenta si in prima parte a acestei lucrari, in maternitatile de scroafe, mai mult ca in alte sectoare din ferma, asigurarea parametrilor de microclimat la valori cat mai apropiate de optim este o conditie hotaratoare pentru realizarea unor indicatori de productie ridicati.

Influenta majora a microclimatului asupra sugarilor si scroafelor cazate in aceste sectoare este explicata prin aceea ca aici se gasesc animale cu sustem imun insuficident dezvoltat sau a caror stare fiziologica le dau o sensibilitate mult mai mare. Purcei incepand din prima zi de fatare si pana la intarcare solicita asigurarea unor conditii tehnologice deosebite pentru a putea sa-si mentina starea de sanatate, sa creasca si sa se dezvolte normal.

Principalul factor de microclimat ce crează probleme in maternitate este temperatura. Asigurarea acesteia este necesara in special pentru purceii sugari al caror sistem de termoreglare este deficitar in primele 5-6 zile de viata. Din datele colectate la examenul anatomopatologic şi corelarea acestora cu rezultatele de laborator se concluzioneaza ca neasigurarea intervalului termic optim influenteaza direct si hotarator starea de sanatate si realizarea unor sporuri normale de crestere (neuniformitate in dezvoltare).

In unele unitati s-a constatat ca, prin nerespectarea confortului termic, pierderile prin mortalitate la purceii sugari pot atinge in primele 5-6 zile de viata 60% din pierderile totale ce se inregistreaza de la nastere pana la intarcare. De aceea, atentia ce se acorda acestei categorii de suine a crescut considerabil.

Alti factori de microclimat ce se repercuteaza in mod negativ asupra purceilor sunt umiditatea si gazele nocive. Valorile crescute ale acestora favorizeaza pe de o parte cresterea incarcaturii microbiene din adapost, a fermentatiilor, aparitiei mucegaiurilor, iar pe de altă parte o crestere a sensibilitatii animalelor. Din rezultatele obtinute la testele serologice nu se poate incrimina un anumit agent patogen in morbiditatea si mortalitatea sectoarelor investigate, dar rolul microflorei oportuniste dezvoltate prin nerespectarea conditiilor de microclimat este sustinut de anatomopatologie. Mentinerea valorilor in limite normale in compartimentele de maternitate se realizeaza printr-o ventilatie corespunzatoare si eliminarea cauzelor care pot genera umiditate ridicata si incarcatura mare de gaze nocive.

Concluzii

1. Leziunile purceilor cu afecţiuni respiratorii sunt extrem de polimorfe, iar corelarea acestora cu testele ELISA orienteaza spre o etiologie polimicrobiana asociata deficientelor de microclimat din sectoarele de exploatare.
2. Circulatia in efectiv a unor tulpini *Influenza* recomanda monitorizarea evolutiei acestora in efectiv prin investigatii serologice periodice.
3. Chiar daca in programele de profilaxie specifica aplicate in fermele luate în studiu sunt incluse produse imunoprofilactice fata de unii din agentii patogeni, efectele nefavorabile produse de circulatia în efectiv al altor virusuri sau bacterii patogene sunt resimtite prin reducerea ratei de reconversie a furajelor si a sporului mediu zilnic.
4. Se recomanda introducerea unor actiuni imunoprofilactice sau ajustarea schemelor de vaccinare deja implementate in efectivele de scroafe. Prin asigurarea unui titru de anticorpi corespunzatori la scroafe, purceii vor fi protejati prin anticorpii colostrali de posibilele infectii cu germeni patogeni (ex.: PPRSv, *Mycoplasma, Actinobacillus*).
5. Sectorul maternitate este un punct de maxima importanta in managementul sanitar veterinar destinat prevenirii patologiei respiratorii infectioase. Deficientele acestui sector afecteaza direct rentabilitatea exloatarii fiecarui lot de purcei.

Bibliografie

1. Burns, K. Swine veterinarians resolve to eliminate the PRRS virus. Journal of the American Veterinary Medical Association. 228 (9), pp. 1315-1316. 2006.
2. Cadar, D., Cságola, A., Dán, A., Deim, Z., Spînu, M., Miclăuş, V., Köbölkuti, L., (...), Tuboly, T. Porcine circovirus type 2 and associated diseases in Romania--short communication. Acta veterinaria Hungarica 55 (1), pp. 151-156. **2007**
3. Dinu I. SUINICULTURĂ. Tratat de crestere a suinelor. Ed. Coral Sanivet, Bucuresti 2002.
4. Elbers, A.R.W., De Jong, M.F., Wellenberg, G.J. Risk factors for clinical signs of PMWS and PDNS in pigs in the Netherlands: A case-control study. Tijdschrift voor Diergeneeskunde 131 (9), pp. 318-325. **2006**.
5. Grau-Roma, L., Segalés, J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. Veterinary Microbiology 119 (2-4), pp. 144-151. **2007**.
6. Truszczyński, M., Pejsak, Z. Postweaning multisystemic wasting syndrome of swine. Medycyna Weterynaryjna 63 (5), pp. 499-502 **2007**

IMPLEMENTAREA MODELULUI DELAWARE TECH DE INSTRUIRE A TEHNICIENILOR DE LABORATOR IN ROMANIA

IMPLEMENTATION OF DELAWARE TECH MODEL FOR TECHNICIAN LABORATORY EDUCATION IN ROMANIA

BARAITAREANU S.[1], STONE Carla Sydnei [2], DANEŞ Doina[1]
[1]FMV Bucureşti
[2]Delaware Technical & Community College, USA

*Necesitatea instruirii personalului cu studii medii din domeniul medical veterinar ce opereaza in laboratoarele de profil a impus gasirea unei solutii de instruire profesionala care sa indeplineasca deopotriva cerintele angajatorilor din reteaua sanitara veterinara de stat si sectorul privat. Instruirea acestora, precum si a medicilor veterinari, biologilor, bochimistilor sau altor profesii conexe este la aceasta data posibila prin crearea unui sistem de instruire orientat pe dezvoltarea aptitudinilor psiho-somatice necesare in laborator. Curricula este adaptata la cerintele pietii si adaptabila la particularitatile fiecarui angajator prin includerea in colectivul de elaborare si modificare a curiculei a reprezentantilor din unitatile de stat si private alaturi de cei din mediul academic. Aceasta forma de instruire coodonata de Centrul de Instruire in Diagnosticul de Laborator Veterinar (*http://www.ciplv.go.ro*) functioneaza la acest moment in cadrul USAMV Bucuresti la Facultatea de Medicina Veterinara.*

Cuvinte cheie: educatie, tehnician de laborator veterinar, dezvoltare institutionala, invatamant, cercetare

Pentru a raspunde cerintelor Romaniei in ceea ce priveste cresterea numarului de manageri, supervizori, veterinari, tehnicieni in laboratoarele de testare si diagnostic foarte bine pregatiti şi calificati au fost demarate lucrarile de dezvoltare a unui Centru de Instruire in Diagnosticul de Laborator Veterinar, destinat mariri capacitatii de instruire a Universitatii de Stiinte Agronomice si Medicina Veterinara Bucuresti (USAMV Bucureşti, Romania). Prin acest Centru de Instruire s-a urmarit cresterea calitatii şi numarului tehnicienilor, veterinarilor şi altor specialisti angajati sau care vor sa se angajeze in laboratoarele de diagnostic din industria alimentara, din cea de creştere a animalelor, in companii farmaceutice, precum şi in alte sectoare ce necesita folosirea unui personal foarte bine pregatit şi calificat. Centrul a fost construit pe experienta USAMVB in furnzarea educației şi pregatiri profesionale post-universitare continue adresata medicilor veterinari angajați in reteaua nationala sanitara veterinara de stat precum si in industria privata. Corpul de instructori este extrem de flexibil. In functie de obiectivele fiecarui modul acesta poate fi compus din cadre didactice universitare, experți practicieni din reteaua de stat şi industrie, precum şi instructori certificati international.

Cu sprijinul DTCC, cadrele didactice din USAMVB au elaborat o curricula pentru intruirea in diagnosticul de laborator veterinar. Universitatea a construit şi echipat în colaborare cu USDA-USAID şi sub coordonarea University of Delaware și DTCC, USA) un laborator de diagnostic si testare pentru animale in campusul Facultatii de Medicina Veterinara Bucureşti.

La acest moment sunt dezvoltate si operationale patru module de instruire.

Primul modul se intituleaza *Bazele practicii in laboratorul sanitar veterinar* si are sase discipline. Practica in laboratorul veterinar este un curs ce trateaza aspecte generale ale practicii in laboratorul sanitar veterinar, abordand aspecte legate de siguranta activitatii de laborator si buna practica de laborator. Atat la orele de curs cat si in practica de laborator vor fi abordate notiunile fundamentale legate de utilizare a echipamentelor specifice de laborator, intretinerea si administrarea bazelor de date din laborator. Cursul Managementul calitatii in laboratorul veterinar prezinta procedurile specifice de management al calitatii in laboratoarele sanitare veterinare, descrie standarde, ghiduri, referinte si proceduri utilizate in vederea acreditarii laboratoarelor. In cadrul acestui curs se fac aplicatii practice de intocmire a documentatiei necesare autorizarii laboratoarelor. Prelevarea probelor este cea mai sensibila etapa in diagnosticul de laborator. Adesea rezultatele eronate incrimineaza fie modalitatea de recoltare fie proba utilizata. Cursul Prelevarea probelor ia in considerare o serie de principii generale legate de colectarea, ambalarea, transportul si prezervarea

probelor. Activitatea practica presupune dezvoltarea deprinderilor psihomotorii de utilizare a instrumentarului specific utilizat la recoltarea diferitelor probe. Cursul Chimie si biochimie I abordează notiunile de baza utilizate in chimia si biochimia de laborator veterinar la care se adauga dezvoltarea abilitatilor de manipulare a echipamentelor si reactivilor specifici din laboratoare, inclusiv conditiile de depozitare ale acestora. Cursul Biotehnologii de diagnostic ale bolilor infectioase si producerea vaccinurilor descrie procedurile biotehnologice indispensabile diagnosticul de certitudine al bolilor infectioase si in producerea de vaccinuri sau alte produse biologice. Cursantii au posibilitatea de a invata cum sa opereze cu o serie de metode de biologie moleculara utilizate curent in laboratoarele din Romania. Cursul Diagnostic bacteriologic si antibiograme prezinta notiuni legate de cultivarea, izolarea, efectuarea frotiurilor si colorarea acestora, precum si evaluarea proprietatilor chimice necesare identificarii bacteriilor. Activitatea desfasurata la lucrarile practice presupune pe langa izolare si identificare si evaluarea antibiorezistentei bacteriilor analizate.

Cel de al doilea modul este *D**iagnostic si sanatate animala,*** **acesta** este compus din cinci materii ce trateaza diagnosticul sanitar veterinar uzual practicat în tara noastra pentru confirmarea prin diagnostic de laborator a suspiciunii de boala sau in supravegherea epidemiologica a animalelor. Cursul Diagnosticul de laborator al bolilor infectioase in comertul international prezinta metodele de diagnostic recomandate pentru comertul international in domeniul patologiei infectioase. Lucrarile practice au ca obiectiv dobandirea abilitatilor psihomotorii necesare in efectuarea metodelor de diagnostic prezentate la orele de curs: manipularea, conservarea şi prepararea probelor, siguranta manipulării, controlul calitatii şi utilizarea instrumentarului specific (hote, microscoape, incubatoare, frigidere/congelatoare, ELISA, PCR). Cursul Diagnosticul de laborator al bolilor parazitare acopera metodele de diagnostic utilizate curent în laboratoarele de diagnostic precum si metodele recomandate pentru comertul international pentru patologia parazitara. Cursul Hematologie si biochimie clinica are o componenta dominant practica. Obiectivul principal este acumularea cunostintelor specifice hematologiei si analizelor biochimice din cadrul laboratoarelor din clinicile veterinare. Baza materiala a laboratorului clinic, similara cu cea din laboratoarele veterinare din Romania, permite utilizarea echipamentelor de laborator specifice si dezvoltarea capacitatii de interpretare a rezultatelor obtinute. Disciplina ce tratează aspectele legate de Citologia vaginala si examenul materialului seminal dispune de o baza materiala moderna fiind posibila efectuarea investigatiilor specifice si corelarea in timp real a rezultatului obtinut in laborator cu datele clinice. Cursul acopera practic investigatiile de baza utilizate in laboratorul veterinar in vederea identificarii stadiului ciclului estral, in determinarea caracteristicilor materialului seminal si ale spermatozoizilor si in detectarea afectiunilor subclinice si clince ale glandei mamare prin examinarea laptelui. Cursul Diagnosticul toxicologic are ca scop dezvoltarea deprinderilor cognitive si abilitatilor psihomotorii pentru laboratorul de toxicologie veterinar. Sunt tratate atat intoxicatiile cu metale grele cat si intoxicatiile cu medicamente la animale.

Modulul trei *Igiena alimentelor* contine cinci discipline. Cursul Diagnosticul de laborator al toxiinfectiilor alimentare trateaza metodele utilizate in diagnosticul de laborator al bolilor transmise prin alimente cu impact major asupra sanatatii publice. Cursantii vor fi capabili sa recolteze problele necesare efectuarii metodele specifice laboratoarelor din unitatile de industrie alimentara, sa opereze cu echipamentele specifice acestor laboratoare si sa administreze bazele de date si sistemele de alerta specifice. Cursul Microbiologie alimentara ia in considerare diagnosticul microbiologic general utilizat in laboratoarele din industria alimentara si de stat destinate evaluarii microbiologice a alimentelor. La lucrarile practice se va pune accent pe utilizarea testelor de diagnostic rapid a zoonozelor alimentare. Disciplina Diagnosticul fizico-chimic al alimentelor prezinta bazele teoretice si exemplifica prin examenele fizico-chimice activitatile specifice practicate in laboratoarele din industria alimentara. Cursul Expertiza reziduurilor din alimente prezintă tehnicile utilizate in analiza reziduurilor din alimenele. Dupa absolvire cursantii vor fi capabili sa prezinte substantele cu efect anabolizant si modul de identificare a reziduurilor substantelor interzise din alimentele, precum si modul de evaluare a reziduurilor de medicamente si alti contaminanti. Cursantii modulului Contaminarea radioactiva a alimentelor vor fi capabili la absolvirea cursului sa descrie metodele utilizate in evaluarea contaminarii radioactive a produselor alimentare de origine animala si metodele

utilizate pentru evaluarea radioactiva a furajelor pentru animale. Un capitol aparte este destinat evaluarii radioactive a apei si impactul acesteia asupra sanatatii animale si umane.

Ultimul modul de instruire dezvoltat in cadrul acestui centru este ***Igiena mediului si bunastarea animalelor.*** **Acest modul cuprinde patru materii.** Cursul Medicina Veterinara Preventiva focalizeaza in epiemiologia animala costurile unei boli endemice si epidemice, controlul sau eradicarea de catre serviciile sanitar veterinare de stat si relatia dintre medicina veterinara si industrie. Descrie noi tehnici de diagnostic, inregistrare, evaluare si control a bolilor in populatiile de animale si cele mai moderne metode utilizate de epidemiologia veterinara. La finalizarea acestei materii cursantii vor fi capabili sa descrie modalitatea de efectuare a expertizei pasunilor si pajisitilor naturale, precum si modul cum se face expertiza furajelor Absolventii vor fi capabili sa descrie modalitatile de dezinfectie, dezinsectie si deratizare profilactica şi de necesitate. Cursul Chimie si biochimie II acopera informatiile de baza necesare in analiza chimica si biochimica a solului. Vor fi abordate notiuni de termodinamica, cinetica, echilibru chimic, acizi si baze, relatia oxidare-reducere, electrochimie, chimie nucleara si moleculara. Notiunile teoretice vor fi exemplificate in cadrul orelor de laborator. La finalizarea acestui modul cursantii vor fi capabili sa descrie si sa aplice pricipiile fizico-chimice in studierea atractiilor intermoleculare si proprietatile lichidelor si solidelor. Vor aplica legea solubilitatii si vor descrie particularitatile fizice si chimice ale solutiilor. In cadrul cursului Microbiologia mediului sunt prezentate tehnicile si metodele utilizate in testarea microbiologica a apei potabile, apei menajere si apei de suprafata. De asemenea acest curs ia in considerare tehnicile si metodele utilizate in evaluarea microbiologica a aerului si solului precum si metodele fizico-chimice ca proceduri analitice de testare si/sau evaluare a compozitiei aerului si solului testat in cadrul protocoalelor de evaluare a calitatii decontaminarii sau a bunastarii animalelor. Cursantii vor fi capabili sa descrie modul de recoltare a probelor de apa, sol si aer destinate investigatiilor microbiologice de laborator, vor fi capabili sa efectueze analize microbiologice utilizand o gama variata de metode atat manuale cat si automatizate. Vor fi capabili sa opereze cu baze de date utilizand softuri dedicate pentru evaluarea calitatii muncii. Cursul Analize fizico-chimice ale mediului descrie tehnici si metode utilizate in supravegherea fizica si chimica a calitatii mediului inconjurator cu impact in bunastarea animalelor. Sunt descrise modalitatile de efectuare a recoltariilor de apa, aer si sol pentru expertiza fizico-chimica precum si modul de manipulare si prezevare a acestor probe. Cursantii vor fi capabili sa discute despre rolul evaluarii fizico-chimice a mediului in mentinerea bunastarii animalelor si vor efectua teste si analize utilizand o gama variata de metode si metodologii. Cursantii vor fi capabili sa descrie masurile de securitate care se impun in laboratoarele care manipuleaza substante chimice, sa utilizeze echipamentul de protectie personal precum si echipamentele specifice acestor laboratoare.

Spatiile centrului de instruire si curricula sunt folosite si la consolidarea instruirii studentilor, masteranzilor, doctoranzilor si in cercetarea stiintifica.

Centrul de Instruire in Diagnosticul de Laborator Veterinar este primul de acest gen din Romania şi se constituie intr-un model de instruire in practica de laborator veterinar.

DIAGNOSTIC SI TRATAMENT IN PASTEURELOZA

DIAGNOSIS AND TREATMENT IN PASTEURELOSIS

CAPLAN Dana Magdalena[1], IVANA Simona[2], IPATE Iudith[3]
[1]I.N.C.D.M.I. Cantacuzino, Bucureşti
[2]FMV Bucureşti
[3]Institutul de Studii şi Cercetari pentru Biodiversitate Agrosilvica, Bucureşti

Pasteurella species are pathogens of several species of animals (mammalians and birth) as well as humans, to which cause serious.

P. multocida, the specie most frequently associated with humans infections, is a small cocobacilary and rod-shaped organism which can be differentiated from other Pasteurella species on the basis of indole, urease, and ornithine decarboxylase rections.

All Pasteurella species are susceptible to penicillins, cephalosporins, tetracyclines, macrolides. P. multocida is resistant to vancomycin and clindamicin.

Key words: Pasteurella spp., diagnosis, treatment

Speciile genului *Pasteurella,* aflate, datorită heterogenitaţi genului, într-o continuă remaniere taxonomică, sunt grupate în specii *sensu stricto* (*P. multocida* ssp. *multocida* , *P. multocida* ssp. *septica, P. multocida* ssp. *gallicida, P. canis*, *P.stomatis, P. dagmatis, P. gallinarum, P. volantium, P. avium, P. langaa, Pasteurella* sp.A, *Pasteurella* sp.B*)* si specii cu taxonomie incertă (*P. pneumotropica, P. aerogenes, P. bettyae, P. caballi, P. mairii, P. testudinis, P. lymphangitidis, P. trehalosi).*

Pasteurelele, germeni comensali la nivelul tractului respirator superior sau digestiv al diverselor animale si păsări, pot produce infecţii de tip zooantroponoze, omul devenind ocazional gazdă accidentală pentru unele specii, ca urmare a contactului cu animalele (Tabel 1).

P. multocida este patogenul cel mai sever implicat în infecţiile unor specii animale, ca şi pentru om.

Tabel 1
Specii de Pasteurella implicate in infecţii umane

Specia	Gazde naturale	Infecţii umane, circumstanţe, localizări
Pasteurella multocida	Nasofaringe si cavitatea bucală. Patogen primar implicat in septicemia hemoragică a bovi- deelor, holera păsărilor, variate pasteureloze ale altor animale. Patogen secundar : pneumonii la variate specii (capre, oi, vite, porci).	Este posibil portajul naso- faringian. Infecţii ale plăgilor muş- cate de animale, infecţii sistemice.
P. pneumotropica	Câini, pisici, şobolani, şoareci: tract respirator. Infecţii ale tractului respirator inferior, abcese.	Meningită, endcardită, bac- teriemii, artrite, osteomi- elite, infecţii ale plăgilor, celulite, pneumonie, peri- tonită.
P. aerogenes	Porc : parte a florei orofaringiene şi intestinale. Ocazional izolată de la iepuri si cobai.	Rar infecţii ale plăgilor muşcate de porc domestic şi sălbatic, cobai.
P. canis	Cavitatea orala: câini (biovarul 1), vite (biovarul 2).	Infecţii ale plăgilor muş- cate de câini.
P. stomatis	Nasofaringe: câini si pisici	Infecţii ale plăgilor muş- cate de câini si pisici.
P. dagmatis	Câini, pisici: flora cavităţii orale	Infecţii ale plăgilor muş- cate de câini, pisici, ale altor plăgi la pacienţi în contact cu animalele.
P. bettyae (CDC grup HB-5 / P. bettii)	?	Izolată din: infecţii ma- terno-fetale (lichid amni- otic, placentă, sângele nou-născuţilor).

Infecţiile umane pot include :

- infecţii localizate, cum sunt celulite, apcese, adenite- acestea putând progresa spre osteomielită, dacă osul subjacent a fost penetrat de muşcătura de câine sau de pisică ;
- infectii pulmonare cronice, în care *P. multocida* poate fi patogen primar sau asociat cu alte micro-organisme;
- infectii sistemice sau meningită.

Majoritatea plăgilor infectate sunt produse prin muşcătură sau zgârietură de la pisici sau câini. 69% din pacienţii de la care a fost izolată *P. multocida* au avut contact cu animale sau ţesuturi animale.

Metode de identificare

Caracteristici culturale

Speciile genului *Pasteurella* sunt pretenţioase nutritiv, putâd fi izolate pe agar 5% sânge berbec sau agar-chocolat.

Dupa incubare 24 ore la 37°C, coloniile sunt mici de 0,5-1-2mm, smooth, convexe, nonhemolitice. Coloniile de *P. multocida* sunt cenuşi-gălbui, prunifică uşor mediul şi degajă un miros caracteristic din cauza producerii de indol în cantitate mare.După 3-5 zile la 37°C, coloniile ajung la diametrul de 5-6 mm, cu inele concentrice, centrul se brunifică, periferia rămânând cenuşiu-gălbuie, strălucitoare, transparentă.

Tulpinile izolate din tractul respirator pot forma colonii mucoide.

Pe agar MacConky pasteurelele nu cultivă, exceptie făcând unele tulpini de *P.pneumotropica* şi, variabil, *P. aerogenes, P. trehalosi, P. bettyae*.

P. bettyae este singura specie capnofilă, desvoltându-se în prezenta unei înalte concentraţii de bioxid de carbon.

Caracteristici microscopice

Pasteurelele apar ca bacili Gram negativi, scurţi/cocobacili de 0,3-1/1-2µm, cu aspect polimorf, predominând formele cocale.

Pe frotiurile din prelevate patologice (necroptice) germenii au tendinţa de a fixa colorantul bipolar.

Caracteristici biochimice

Majoritatea tulpinilor de *Pasteurella* sunt oxidazo şi catalazo pozitive, reduc nitraţii la nitriţi. Produc reacţii acide pe mediul TSI (triple sugar iron), ca rezultat al activitaţii fermentative.

Caractere adiţionale pentru *P. multocida* includ (Tabel 2) : producerea de indol, fermantarea glucozei şi a zaharozei fără formarea de gaz, frecvent reacţii negative în fermentarea lactozei şi maltozei, reacţia ureazei negativă şi reacţia ornitindecarboxilazei pozitivă.

P. multocida poate fi diferenţiată de *P.pneumotropica* (rar implicată în infecţii umane) prin reacţiile pentru urează, maltoză şi manită, iar faţă de *P. aerogenes* prin reacţiile indol, gaz din glucoză, urează şi creşterea pe agar MacConkey.

Reacţiile pentru catalază, nitraţi, zaharoză, indol şi uree diferenţiază aceşti germeni faţă de alţi bacili Gram negativi, imobili, fermentativi, care pot fi oxidazo pozitivi şi nu cresc pe agar MacConkey (Tabel 3).

Sensibilitatea la antibiotice

Toate speciile genului *Pasteurella* sunt sensibile la o gamă largă de antibiotice:

peniciline, cefalosporine, tetracicline.

Penicilina G este cel mai activ antibiotic, atingând la unele tulpini de *P. multocida* niveluri ale CMI de la 0.049 la 0.39 µg/ml. Alte peniciline cu activitate bună *in vitro* includ ampicilina, amoxicilina, amoxicilina + acid clavulanic. Penicilinele stafilococice, ca oxacilina, nu sunt active şi, deci, nu sunt recomandate în tratamentul infecţiilor cu *Pasteurella.*

Cefalosporinele, în special cele de ultimă generaţie, şi-au demonstrat activitatea *in vitro* asupra *P. multocida.* Cefalexin, cefaclor şi cefadroxil, din cauza nivelului mare al CMI, nu pot fi utilizate în tratamentul infecţiilor. Cefalosporinele orale, cefuroxim şi cefixim, alături de cele

parenterale, incluzând ceftriaxona şi cefoperazona, au o excelentă activitate *in vitro* şi pot constitui substituienti ai penicilinei.

Aminoglicozidele au o activitate moderată până la slabă, astfel că nu pot fi administrate.

Dintre macrolide, cele cu activitate indelungată – azitromicina, claritromicina, roxitromicina şi diritromicina sunt mai eficiente decât eritromicina sau clindamicina, la care au fost evidentiate nivele mari ale CMI.

P. multocida este rezistentă la vancomicină şi clindamicină. Rezistenţa la penicilină este mai rară (prin producere de β-lactamază mediată plasmidic).

Tabel 2

Caracteristici biochimice ale principalelor specii de Pasteurella

Specia / Caracteristici	*P. multocida* (n = 306)		*P. pneumotropica* (n = 107)		*P. aerogenes* (n = 16)	
	Semn	% poz	Semn	% poz	Semn	% poz
Hemoliza (zonă clară)	-	0	-	0	-	0
Mobilitate	-	0	-	0	-	0
Catalază	+	98	+	100	+	100
Oxidază	+	97	+	99	+	100
Creştere pe MacConkey	-	2 (1)	v	36 (17)	+	100
Gaz din glucoză	-	0	-	0	+	100
Acid din : Glucoză	+	100	+	97 (3)	+	100
Lactoză	-	8	v	14 (39)	v	19 (38)
Zaharoză	+	100	+	97 (3)	+	94
Manită	v	78	-	2 (1)	-	6
Maltoză	-	2	+	97 (3)	+	100
Xiloză	v	67	+	76 (19)	v	81
Citrat Simmons	-	0	-	0	-	0
Urează	-	0	+	95 (1)	+	100
Reducerea nitriţilor	+	99	+	100	+	100
Indol	+	99	+	90	-	0
TSI coloană, acidifiere	+	99	+	97	+	100
TSI pantă, acidifiere	+	98 (1)	+	100	+	94
Hidroliza gelatinei	-	0	-	0	-	0
Hidroliza esculinei	-	0	-	0	-	0
Arginindehidrolaza	-	0	-	0	-	0
Lizindecarboxilaza	-	0	v	33	-	0
Ornitindecarboxilaza	+	94	+	100	v	88

Simboluri: + = ≥90% reacţii pozitive în 1-2 zile; - = ≥90% reacţii negative; v = >10% - <90% reacţii pozitive.

Numerele din paranteză indică procentajul reacţiilor întârziate (3 sau > zile)

Tabel 3

Diferenţierea genului Pasteurella faţă de alţi germeni cu caractere morfotinctoriale şi exigenţe nutritive asemănătoare

Genuri şi specii	Capofilia	Creştere pe Mac Conkey	Mobilitate		Spori	Oxidaza	Catalaza	TSI acid:	
			37°C	22°C				Pantă	Coloană
Pasteurella aerogenes	-	+	-	-	-	+	+	+	+
P. bettyae	+	d	-	-	-	d	-	+	+
P. multocida	-	d	-	-	-	+	+	+	+
P.pneumotropica	-	d	-	-	-	+	+	+	+
Pasteurella, alte specii	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Mannheimia haemolytica	-	+	-	-	-	+	(+)	+	+
Actinobacillus hominis	-	-	-	-	-	+	-	+	+
A. actinomycetemcomitans	+	d	-	-	-	(-)	+	+	+
A. suis	-	+	-	-	-	(+)	(+)	+	+
A. ureae	-	d	-	-	-	+	d	+	+

Genuri şi specii		Capnofilie	Creştere	Mobilitate		Sp.	Oxidaza	Catala	TSI acid:	
Actinobacillus, alte specii		-	+	-	-	-	(+)	d	+	+
Capnocytophaga: *C. gingivalis* , *C.ochracea*, *C..sputigena(DF-1)*		+	-	-	-	-	-	-	d	d
C.canimorsum, *C. cynodegmi (DF-2)*		+	-	-	-	-	+	+	(-)	(-)
Grupele CDC	DF-3	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	EF-4a	-	d	-	-	-	+	+	-	d
	EF-4b	-	d	-	-	-	+	+	-	-
Cardiobacterium hominis		+	-	-	-	-	+	-	+	(+)
Eikenella corrodens		+	-	-	-	-	+	-	-	-
Kingella		-	v	-	-	-	+	-	v	v
Streptobacillus miniliformis		+	-	-	-	-	-	-	d	d
Haemophilus aphrophilus		+	-	-	-	-	-	-		
Yersinia		-	+	-	+	-	-	+	-	+
Clostridium spp. Gram- variabile		-	-	+	+	+	-	-		
Bacillus spp. Gram- variabile		-	-	+	+	+	v	+		
Enterobacteriaceae		-	+	v	v	-	-	+	v	+
Vibrionaceae		-	+	+	+	-	+	+	v	+

Simboluri: + = ≥90% tulpini pozitive ; (+) = 80-89% tulpini pozitive ; d = 21-79% tulpini pozitive ; (-) = 11-20% tulpini pozitive ; - = ≥90% tulpini negative ; v = caracter variabil cu specia ; spaţiile albe indică lipsa datelor sau date nesemnificative

Tratament

Deoarece plăgile produse prin muşcătură de animal sunt frecvent polimicrobiene, incluzând *S. aureus,* specii de streptococi, germeni anaerobi, alături de specii de *Pasteurella,* tratamentul de primă intenţie trebuie să se adreseze acestor bacterii, până la elucidarea culturilor.

Antibioticele de elecţie sunt penicilina, amoxicilina sau ampicilina şi cefalosporinele cu spectru larg (cefotaxim, cefuroxim, ceftazidim, cefoperazona). Acestea pot fi utilizate în tratamentul infecţiilor septicemice şi a localizărilor interne. Durata terapiei : minimum 10-14 zile.

Pacienţii cu afectarea structurilor profunde (tenosinovite, artrite) trebuie să fie spitalizaţi şi trataţi parenteral. În cazul infecţiilor supurative se impun drenajul şi debridarea.

În osteomielită, drenajul se asociează cu tratamentul antibiotic. În infecţiile osoase cu *Pasteurella* terapia antimicrobiană trebuie continuată până la 4-6 săptămâni.

În cazul infecţiilor transcutanate se impune toaleta şi antisepsia plăgii.

Profilaxia antimicrobiană după muşcătura de animal se recomandă, deoarece rata culturilor pozitive este mare. Se administrează oral, în cure scurte de 5 zile, amoxicilina 875 mg + acid clavulanic 125 mg, de 2 ori pe zi (antibiotic activ faţă de *S. aureus,* streptococi, germeni anaerobi şi *Pasteurella*).

BIBLIOGRAFIE

1. C. PÂNZARU – Identificarea genurilor *Pasteurella, Mannheimia, Actinobacillus* – în D.Buiuc şi M. Neguţ (editori) – Tratat de Microbiologie Clinica, ed. a II-a, Ed. Medicala, Bucuresti , pp. 859-868 (2008).
2. W.M. JANDA, R. MUTTERS – *Pasteurella, Mannheimia, Actinobacillus, Eikenella, Kingella, Capnocytophaga*, other gram-negative rods – in Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th edn., Bacteriology vol.1, Hodder Arnold, London, pp.1650-1658 (2005)
3. J.J. ZURLO – *Pasteurella* Species - in G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin (eds.): Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of Infectous Diseae, 5th edn., Churchill Livingstone, Philadelphia, vol.2, pp.2402-2406 (2000).
4. B. HOLMES, M.J. PICKETT, and D.G. HOLLIS – *Pasteurella* – in P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller et al. (eds.): Manual of Clinical Microbiology, 7th edn., A.S.M. Press, Washington D.C., pp.632-637(1999).
5. R.E. WEAVER and D.G. HOLLIS – Gram-Negative Fermentative Bacteria and *Francisella tularensis* – in E.H. Lennette – Manual of Clinical Microbiology, 3rd edn., A.S.M. Press, Washington D.C., pp.242-262 (1980).

CONTRIBUŢII LA STUDIUL MASTITELOR CLINICE LA OI ŞI CAPRE

BOGOLIN I.[1], VASIU C.[2]
[1]DSVSA Bistriţa Năsăud
[2]FMV Cluj-Napoca

The researches were effectuated on three mixed flocks of ovine and goats (a total of 874 sheep and 399 goats) from Bistrita Nasaud County, in which different forms of mastitis were diagnosed. Clinical examination of 92 sheep and 69 goats showed general modifications as well as clinical signs, with localization at the mammary gland. The majority of the mammary infections started with hyperthermia (41-42 ºC), deviation, inappetence, sometimes anorexia. In some cases, at approximately 2-3 days, appeared nodes the size of a rice – corn grain at the mamelon level. Sometimes (mostly in goats), the nodes opened expressing a hemorrhagic pus content, after which a dark colored crust or vesicles were formed on the mamelon. Shortly after the lesions appeared, the udder swallowed, became warm, sensitive, painful with violet skin. Milk was modified, with graduate decrease in volume to no secretion. Approximately 20% from the sheep and 30% from the goats had purulent mastitis with fistulae abscesses. Incidence of clinical mastitis was of 10.52% in sheep herds and 17.29% in goats with mortality of 4.71% in sheep and 6.52% in goats. Following bacteriological exam, most frequent isolated bacteria were Staphylococcus aureus, followed by Streptococci, coagulazo - negative staphylococci (CNS), Escherichia coli, Citrobacter spp., Arcanobacterium pyogenes and Corynebacterium pseudotuberculosis.

Incidenţa mastitelor clinice este, în majoritatea turmelor de oi şi capre, de sub 5%, dar aceasta poate să ajungă, uneori, la 30 sau chiar la 50%. Pierderile provocate de mastite sunt importante datorită mortalităţii sau sacrificărilor, care la oi poate să ajungă la 7% din cazuri. La cele două specii patologia mamară este principala cauză pentru sacrificarea din motive sanitare, îndeosebi în primele două-trei luni de lactaţie (12). Staphilococcus aureus, streptococii sau germenii patogeni oportunişti cauzează, în general, mastite (3, 7, 9, 11). Persistenţa infecţiei în perioada de repaus mamar, după evoluţia mastitelor clinice, nu este bine studiată, procentul este apreciat ca fiind mare (15), putând chiar depăşii 60% la rumegătoarele mici (2). În prezenta lucrare sunt sintetizate rezultatele referitoare la studiul clinic al mastitelor la oi şi capre, în judeţul Bistriţa Năsăud.

MATERIALE ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe 92 de oi şi 69 de capre, care au fost supuse unui examen general şi unui examen minuţios al glandei mamare, înainte şi după muls, deoarece presiunea execitată de lapte împiedică palparea în întregime a structurilor glandei mamare şi dă o idee falsă privind consistenţa acesteia. S-a recurs la inspecţia de la distanţă a glandei mamare, la inspecţia şi palparea superficială a acesteia, la palparea profundă a glandei mamare şi a limfonodurilor retromamare precum şi la examenul laptelui într-un vas de culoare închisă (5, 13, 5).

Izolarea şi identificarea speciilor bacteriene implicate în producerea infecţiilor mamare s-a realizat prin următoarele metode: O.I.E. 1.4 SR ISO 688-1/A1/2005, pentru genul Staphilococcus şi Micrococcus; OIE 1.24 pentru genul Streptococcus sp; SR EN ISO 7932/2005, pentru Bacillus cereus; SR ISO 16649-2/2002, pentru Escherichia coli; SR ISO21528-2/2004, pentru enterobacteriaceae. Speciile din genul Corynebacterium şi Arcanobacterium s-au izolat pe agar cu sânge de oaie în atmosferă de CO_2 şi confirmate prin teste biochimice. Au fost luate în studiu numai culturile în care s-au constatat una sau cel mult două tipuri de colonii dintre care una predominantă (când s-au izolat mai mulţi germeni s-au repetat analizele).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În majoritatea cazurilor animalele au prezentat hipertermie (41-42º C), abatere, inapetenţă, rareori anorexie, o uşoară şchiopătură la membrele posterioare şi/sau modificări respiratorii (tabelul 1).

Din datele prezentate în tabelele 2 şi 3 se constată că, în majoritatea cazurilor, infecţia a fost localizată doar la o jumătate a glandei mamare, cu diminuarea secreţiei sau chiar absenţa acesteia.

Tabelul 1 Rezultatele examenului general efectuat la 92 oi şi 69 capre cu mastite clinice.

Specia	hipertermie	abatere	inapetentă	anorexie	şchiopături	tahipnee
Ovine	69	67	78	14	29	11
Caprine	48	61	57	12	27	7

Tabelul 2 Rezultatele examenului general al glandei mamare la la 92 oi şi 69 capre cu mastite clinice.

Specia	Localizarea infecţiei		Secreţia lactată	
	ambele jumătaţi	o jumătate	absentă	prezentă diminuată
Ovine	41	51	17	75
Caprine	32	37	11	58

Tabelul 3 Rezultatele obţinute la inspecţia, palparea superficială şi profundă a glandei mamare la 92 oi şi 69 capre cu mastite clinice.

Specia	Modificări ale glandei mamare sau a jumătăţii afectate							
	induraţie	noduli	abcese	rece	caldă	sensibilă	dureroasă	tumefiată
Ovine	47	49	48	23	78	83	68	86
Caprine	36	31	30	15	61	58	50	63

Uneori la aproximativ 2 -3 zile apăreau noduli de mărimea unui bob de orez sau de porumb la nivelul mamelonului. În unele cazuri (în special la capre) nodulii se deschideau lăsând să se scurgă un conţinut hemoragico-purulent, după care treptat se forma o crustă negricioasă ((figura 1, figura 2).

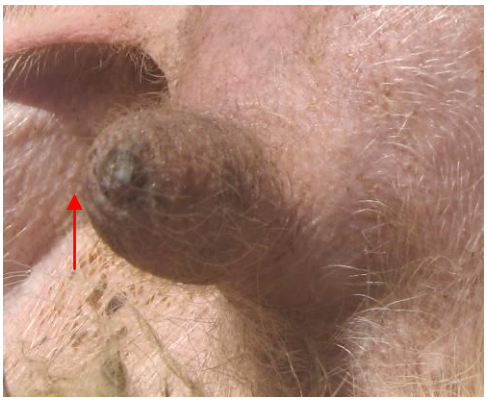


Fig.1 Telită ulceroasă cu proliferare de

Fig. 2 Telită necrotico-ulcerativă la capră ţesut de neoformaţie la oaie.

La puţin timp după apariţia leziunilor, mamela se tumefia, era caldă, sensibilă, dureroasă cu pielea violacee (figura 3). După aproximativ trei săptămâni de la debut, la aproximativ 20% din oi şi 28% din capre, s-au evidenţiat mastite purulente, cu abcese care fistulizau (figurile 4 şi 5) sau mastite gangrenoase (figura 6) la 7,60% din oi.

Fig. 3 Mastită la oaie – forma acută (mamela tumefiată cu pielea violacee).

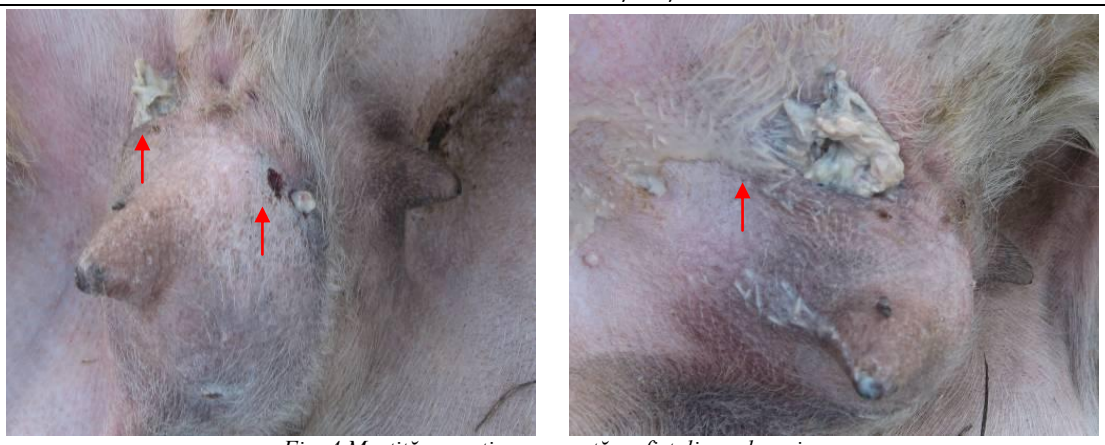


Fig. 4 Mastită necrotico-supurată cu fistulizare la oaie.

Fig. 5 Mastită supurată cu abcese multiple şi fistulizare la capră.

Fig.6 Mastită gangrenoasă la oaie: sfacelare şi cicatrizare.

Nodulii nedeschişi involuau, iar cei care se deschideau, prin vindecare lăsau cicatrice care uneori obstruau orificiul papilar (figura 7).

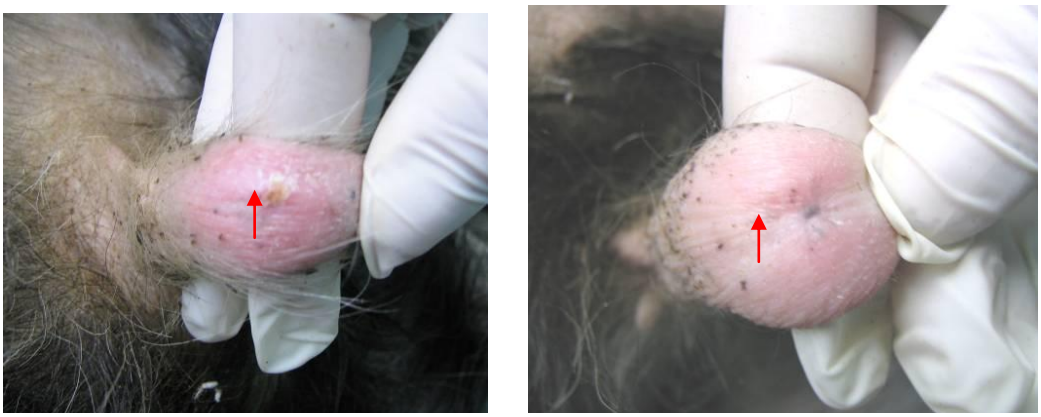


Fig. 7 Telită sclerozantă şi cu obstrucţia orificiului papilar la capră.

Tabelul 4 Rezultatul examenul macroscopic al laptelui la 92 oi şi 69 capre cu mastite clinice.

specia	Aspectul laptelui						
	aparent normal	grunjos, coaguli	Culoarea			Consistenţa	
			roşietică	gălbuie	galben-verzuie	apoasă	vâscoasă, purulentă
Ovine	12	80	22	28	42	21	71
Caprine	6	63	14	25	24	20	49

Laptele a fost modificat macroscopic la 86,95% din oi şi la 91,30% din capre (tabelul 4), scăzând treptat până la dispariţie la 18,47% din oi şi la 15,94% din capre (tabelul 2). La animalele trecute prin boală producţia de lapte a revenit la aproximativ o treime din cea iniţială.

Prin examenul clinic nu am putut stabili diagnosticul etiologic, deşi anumiţii agenţi patogeni au fost cu certitudine responsabili de producerea unor manifestări specifice care ne-au orientat spre diagnostic, a cărui certitudine s-a stabilit numai prin examen bacteriologic (tabelul 5).

Staphilococcus aureus a fost principalul agent responsabil de producerea mastitelor clinice la oaie şi capră. În general infecţiile s-au manifestat sub forma unor simple mastite, caracterizate prin tumefierea mamelei şi mulgerea unui lapte grunjos, rareori apărând mastite gangrenoase. Evoluţia a fost de obicei acută, mai rar subacută şi cronică. La aproximativ 65 % din cazuri s-au semnalat tulburări generale. Rezultate asemănătoare au fost obţinute şi de alţi autori (1, 3, 6, 13, 18).

Stafilococii coagulazo-negativi (SCN) au fost responsabili în general de producerea mastitelor subclinice la oaie şi capră, dar au fost implicaţi şi în mastite clinice. Manifestările au fost generale şi/sau locale (prezenţa unor depozite grunjoase în lapte, reacţia limfonodurilor în unele cazuri, microabcese în ţesutul glandular şi interstiţial, induraţii sau fibroze cu evoluţie spre cronicizare), aspecte semnalate şi de alţi autori (4, 6, 13).

Tabelul 5 Rezultatele analizelor bacteriologice efectuate la oile şi caprele cu mastite clinice.

Germeni izolaţi	oi*		capre**		nr./ % animale afectate			
	nr./ %		nr./ %		Oi		Capre	
Staphylococcus aureus	38	39,58	26	35,13	38	41,30	26	37,68
Streptococcus spp.	16	16,66	11	14,86	16	17,39	11	15,94
SCN	18	18,75	17	22,97	14	15,21	12	17,39
Escherichia coli	9	9,37	7	9,45	9	9,78	7	10,14
Citrobacter spp.	0	0,00	2	2,70	0	0,00	2	2,89
Arcanobacterium pyogenes	8	8,33	5	6,75	8	8.69	5	7,24
Corynebacterium spp.	7	7,29	6	8,10	7	7.60	6	8,69
Total oi şi capre examinate					92		69	

* La 4 analize bacteriologice s-au izolat 2 germani în acelaşi timp (SCN)

** La 5 analize bacteriologice s-au izolat 2 germani în acelaşi timp (SCN)

Corynebacteriile, germeni patogeni minori, au fost responsabili de producerea mastitelor clinice la oaie şi capră, dintre care pe primul loc s-a situat *C. pseudotuberculosis.* HIRSH (8) semnalează prezenţa de abcese la nivelul limfonodurilor retromamare şi destul de rar adevărate mastite în care au fost implicate corynebacteriile.

Arcanobacterium pyogenes a produs infecţii la nivelul glandei mamare cu formarea de abcese de dimensiuni mari, asociate cu o secreţie lactată purulentă, de culoare verde gălbui, fără cuaguli, aspecte prezentate şi în literatura de specialitate (4, 6, 8).

Escherichia coli a provocat mastite de tip gangrenos, cu evoluţie acută, asemănătoare cu cele produse de *S. aureus*.

În producerea mastitelor au fost implicaţi şi streptococii. DEVILLECHAISE (6) şi CONTRERAS (4) au izolat de la rumegătoarele mici şi alţi germeni: *Brucella, Pseudomonas, Pasteurella, Aspergillus, Nocardia asteroides* etc.

Nu s-au făcut analize pentru izolarea micoplasmelor având în vedere costul ridicat şi faptul că animalele selecţionate pentru studiu au fost vaccinate împotriva agalaxiei contagioase a oilor şi caprelor şi nu au prezentat simptome specifice acestei boli (localizare mamară, oculară, articulară etc.). Absenţa semnelor clinice nu ne permite însă, să excludem starea de purtători de micoplasme.

CONCLUZII

1. Incidenţa mastitelor clinice a fost de 10,52% în turmele de ovine şi de 17,29% în turmele de caprine.
2. Mortalitatea în turmele examinate a fost de 4,71% la oi şi de 6,52% la capre.
3. Oile şi caprele cu mastite clinice au prezentat atât modificări în starea generală cât şi la nivelul glandei mamare, fiind în funcţie de agentul bacterian implicat.
4. Principalul germen responsabil de producerea mastitelor clinice la oile şi caprele examinate a fost *Staphylococcus aureus*.
5. De la oile cu mastite clinice s-a izolat *Staphylococcus aureus* (39,58%), stafilococi coagulazo-negativi (18,75%), streptococi (16,66%), Escherichia coli (9,37%), Arcanobacterium pyogenes (8,33%), Corynebacterium pseudotuberculosis (7,29%).
6. Mastitele clinice la capre au fost produse de Staphylococcus aureus (35,13%), stafilococi coagulazo-negativi (22,97%), streptococi (14,86%), Escherichia coli (9,45%), Corynebacterium pseudotuberculosis (8,10%), Arcanobacterium pyogenes (6,75%), Citrobacter spp. (2,70%).

BIBLIOGRAFIE

1. BERGONIER, D., BERTHELOT, X., 2003, New advances in Epizootiology and control of ewe mastitis, Livest. Prod Sci. 79, 1–16.
2. BERGONNIER, D., BLANC, M.C., FLEURY, B., LAGRIFFOUL, G., BARILLET, F., BERTHELOT, X., 1997, Les mammites des ovins et des caprins laitiers: étiologie, épidémiologie et contrôle. Renc. Rech. Rum., 4, 251-260.
3. CALAVAS, D., BUGNARD, F., DUCROT, C., SULPICE P., 1998, Classification of the clinical types of disease affecting nursing ewes, Small Rumin. Res. 29, 21–31.
4. CONTRERAS, A., LUENGO, C., SANCHEZ, A., CORRALES, J.C., 2003, *The role of intramammary pathogens in dairy goats.* Livestock Production Science, 79, 273-283.
5. DAVID, V., DE CREMOUX, R., 2000, *Palpation et observation de la mamelle*. Réussir La Chèvre, 237, 27-29
6. DEVILLECHAISE, P., 1996, *Mammites de la chèvre*. Supplément Technique n°54 à la Dépêche Vétérinaire, 27-30.
7. HAENLEIN, G.F.W., 2002, Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity, Small Rumin. Res. 45, 163–178.
8. HIRSH, D.C., MACLACHLAN, N.J., WALKER, R.L., 2004, *Veterinary microbiology. Second Edition*. Blackwell Publishing, Oxford, 536 pp.
9. KIRK, J., GLENN, J., 1996, Mastitis in ewes. Compend Contin Educ Pract Vet, 18, 582–590.
10. KOEHLE, O, 1997, *Contribution au diagnostic des mammites sub cliniques staphylococciques chez la chèvre: étude comparée de critères cliniques et biologiques*. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 177 pp
11. LAFI, S.Q., Al MAJALI, A.M., ROUSAN, M.D., ALAWNEH, J.M.,1998, Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan, Prev. Vet.Med., 33, 171–181.
12. MALHER, X., SEEGERS, H., BEAUDEAU, F., Culling and mortality in large dairy goat herds managed under intensive conditions in western France, Livest. Prod. Sci. 71 (2001) 75–86.
13. MATTHEWS, J, 1999, *Diseases of the goat, 2nd edition*. Blackwell Science. Oxford, 266 pp.
14. MERCIER, P., 2001. Les mycoplasmoses des caprins. Réussir La Chèvre, 246, 30-32.
15. SARATSIS, P., LEONTIDES, L., TZORA, A., ALEXOPOULOS, C., FTHENAKIS, G.C., 1998, Incidence risk and aetiology of mammary abnormalities in dry ewes in 10 flocks in Southern Greece, Prev. Vet. Med., 37, 173–183.
16. WATSON, D.J., BUSWELL, J.F, 1984, Beecham mastitis series. Modern aspects of sheep mastitis. Br. Vet. J. 140, 529–534.
17. WINKELMANN, J. (2005) *Schaf- und Ziegenkrankheiten, 3. Auflage*. Eugen Ulmer KG, Stuttgart, 130 pp.
18. ZILUAGA, I., ROMEO, M., MARCO ,J., 1998, Prevalencia, patogenicidad y epidemiologia de los microorganismos implicados en procesos mamiticos del ganado ovino, Ovis 59, 27–49.

UTILIZAREA NUMĂRULUI DE CELULE SOMATICE ÎN DIAGNOSTICUL MASTITELOR SUBCLINICE LA OVINE

BOGOLIN I.[1], VASIU C.[2]
[1]DSVSA Bistriţa Năsăud
[2]FMV Cluj-Napoca

Our study was realized on 126 primiparous sheep from flocks in which the number of somatic cells from the collection milk was higher than 1.000.000 cells/ml. The first control was made between the 8-th and 20-th day of lactation (mean of 14 days), whereas the next controls at intervals of approximately 30 days. Numeric evaluation of somatic cells was done using the rapid fluoro-opto electronic method SR ISO 13366-3/2001. In the cases where the limit of 750.000 somatic cells/ml was overcome, as well as at the end of the lactation period, we collected milk samples to determine if in these cases infection occurred, and if so, of what origin (Staphylococcus aureus, another Staphylococcus type or other germs). In 100% of bacteriological examined samples, at least one type of bacteria was isolated. In 51.59% from the sheep in lactation we confirmed an infection of the mammary gland. From the total of diagnosed mammary infections, 72.22% were produced by non-aureus Staphylococcus, 11.11% by Staphylococcus aureus and 16.67% by other bacterial flora (Streptococcus spp. 1.58%, Enterococcus spp. 0.79%, Escherichia coli 1.58%, Enterobacter spp. 0.79%, Corynebacterium spp. 0.79%, Arcanobacterium pyogenes 1.58% and Bacillus spp. 9.52%). In 56.52% from primiparous sheep with increased number of somatic cells we diagnosed intramammary infections. In 69.23% from the sheep with number of somatic cells smaller than 750.000 cells/ml, mammary gland was healthy at the end of lactation. Somatic cells number can be used in diagnose of subclinical mastitis in ovine, if a rapid and competitive milk control is available.

Mastitele subclinice pot fi diagnosticate, fie individual prin examen bacteriologic şi numărarea celulelor somatice, fie (estimate) în funcţie de numărul de celule somatice din laptele de colectură.

La nivel individual, în funţie de dinamica celulelor somatice, pragurile propuse de diferite studii sunt cuprinse între 200.000 şi 1.500.000 celule/ml., cel mai frecvent fiind folosite pragurii de sub 500.000 celule/ml. (5, 6, 11, 12). Unii autori sugerează utilizarea a două praguri, 140.000 celule/ml şi respectiv 340.000 celule/ml., pentru a face diferenţa între glanda mamară sănătosă şi cea infectată (12). SUAREZ (13), propune utilizarea a două praguri, 244.000 celule/ml şi 1.000.000 celule/ml., pentru diferenţierea între infecţiile intramamare cu germeni patogeni minori şi cu germeni patogeni majori.

La nivel de turmă numărul de celule somatice din laptele de amestec permite stabilirea unui diagnostic epidemiologic indispensabil pentru punerea în practică a unui plan de combatere a mastitelor (2, 3). Numărul celulelor somatice, din laptele de colectură, poate fi corelat pozitiv cu proporţia infecţiilor intramamare, dar trebuie să se ţină cont de factorii care contribuie la modificarea acestuia (2, 3, 10).

La ora actuală nu există prevederi legislative în Comunitatea Europeană, cu privire la numărul de celule somatice la oaie. În Statele Unite ale Americii limita legală pentru numărul celulelor somatice la oaie a fost stabilită la 750.000 celule/ml., însă crescătorii frecvent nu pot respecta această limită (4). În cercetările noastre s-a luat în considerare limita de 750.000 celule/ml., pentru probele recoltate individual şi de 1.000.000 celule/ml., pentru laptele de colectură. În acest context ne-am propus să verificăm dacă pragul de 750.000 celule somatice/ml. poate fi utilizat, în condiţii practice, la diagnosticul mastitelor subclinice la oi. Pentru îndeplinirea acestui deziderat s-a recurs la: determinarea numărului de celule somatice din laptele de colectură; stabilirea nivelului individual al numărului de celule somatice la ovinele primipare; examinarea bacteriologică a laptelui provenit de la oile primipare la care numărul de celule somatice a fost mai mare de 750.000 celule/ml. (presupunând că au glanda mamară infectată) şi examinarea bacteriologică în perioada de repaus mamar a probelor recoltate de la oile care au avut crescut numărul de celule somatice.

MATERIALE ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe 126 de oi primipare selectate din patru turme, din judeţul Bistriţa Năsăud, la care media geometrică a numărului de celule somatice din laptele de colectură a fost mai mare de 1.000.000 celule/ml. Oile au fost grupate în diferite loturi, în funcţie de numărul celulelor somatice/ml. astfel: **lotul N1,** 53 oi, la care nu s-a depăşit niciodată pragul de 750.000 celule somatice/ml.; **lotul E1,** 37 oi, care la analizele efectuate au avut de cel puţin două ori mai mult de 750.000 celule somatice/ml.; **lotul F1,** 22 oi, care la analizele efectuate au avut mai puţin de 750.000 celule somatice pe perioada lactaţiei, cu excepţia ultimelor două controale; **lotul M1,** 14 oi, care la analizele efectuate au avut mai mult de 750.000 celule somatice/ml., iar la examenul clinic s-au pus în evidenţă mastite clinice.

S-au recoltat probe de lapte (amestec din cele două mamele) de la primiparele din turmele aflate în studiu, cu scopul de a determina numărul de celule somatice şi pentru efectuarea examenului bacteriologic.

Primul control, privind numărul de celule somatice, s-a făcut între a 8 a şi a 20 a zi de lactaţie (media de 14 zile), iar următoarele la un interval de aproximativ 30 zile. Evaluarea numerică a celulelor somatice s-a efectuat prin metoda rapidă, fluoro opto electronică, ISO 13366-3/2001.

Examenul bacteriologic al probelor de lapte s-a efectuat în primele 24 ore de la recoltare la L.S.V.S.A. Bistriţa, Institutul de Diagnostic şi Sănătate Animală Bucureşti şi/sau Institutul de Igienă şi Sănătate Publică Veterinară Bucureşti.

Izolarea şi identificarea speciilor bacteriene implicate în producerea infecţiilor mamare s-a realizat prin următoarele metode: O.I.E. 1.4 SR ISO 688-1/A1/2005, pentru genul Staphilococcus şi Micrococcus; OIE 1.24 pentru genul Streptococcus sp; SR EN ISO 7932/2005, pentru Bacillus cereus; SR ISO 16649-2/2002, pentru Escherichia coli; SR ISO21528-2/2004, pentru enterobacteriaceae. Speciile din genul Corynebacterium şi Arcanobacterium s-au izolat pe agar cu sânge de oaie în atmosferă de CO_2 şi confirmate prin teste biochimice.

Au fost luate în studiu numai culturile în care s-au constatat una sau cel mult două tipuri de colonii dintre care una predominantă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabelul 1 sunt prezentate media geometrică a numărului total de germeni, determinată pe o perioadă de două luni, precum şi media geometrică a numărului de celule somatice, determinată pe o perioadă de 3 luni. Din datele prezentate reese că media geometrică a valorilor obţinute la numărarea celulelor somatice, din laptele de colectură, este crescută comparativ cu valorile prezentate de către alţi autori (2, 9), cu excepţia celor prezentate în Italia (Sardinia), confirmându-se că în turmele de ovine examinate sunt prezente infecţii mamare.

Tabelul 1 Rezultatele privind numărul total de germeni (N.T.G.) şi numărul de celule somatice pentru laptele de colectură provenit de la oi.

Exploataţia	N.T.G. la 30°C/ml.*	Număr celule somatice/ml**
O1	1.756.000	1.214.000
O2	1.685.000	1.107.000
O3	2.158.000	1.241.000
O4	2.245.000	1.175.000
O5	1.738.000	963.000
O6	1.639.000	839.000
O7	1.485.000	796.000
O8	1.512.000	857.000
Media aritmetică	**1.777.250**	**1.023.000**

* media geometrică determinată pe o perioadă de duoă luni, cu cel puţin două probe pe lună

** media geometrică determinată pe o perioadă de trei luni, cu cel puţin o probă pe lună (după modelul de la vaci)

Din primele patru turme s-au selectat cele 126 oi primipare, de la care s-au recoltat probe de lapte, pentru determinarea numărului de celule somatice şi efectuarea examenului bacteriologic.

Numărarea celulelor somatice (figura 1) evidenţiază că: 42,06% din oi (lotul N1) au avut numărul de celule somatice mai mic de 750.000 celule/ml. pe toată perioada lactaţiei; 29,37% din oi (lotul E1) au avut numărul de celule somatice mai mare de 750.000 celule/ml. la cel puţin două

controale efectuate; 17,46% din oi (lotul F1) au avut numărul de celule somatice mai mare de 750.000 celule/ml. numai la sfârşitul perioadei de lactaţie; 11,11% din oi (lotul M1) au avut numărul de celule somatice mai mare de 750.000 celule/ml. pe toată perioada de lactaţie şi au prezentat la nivelul glandei mamare modificări cu exprimare clinică.

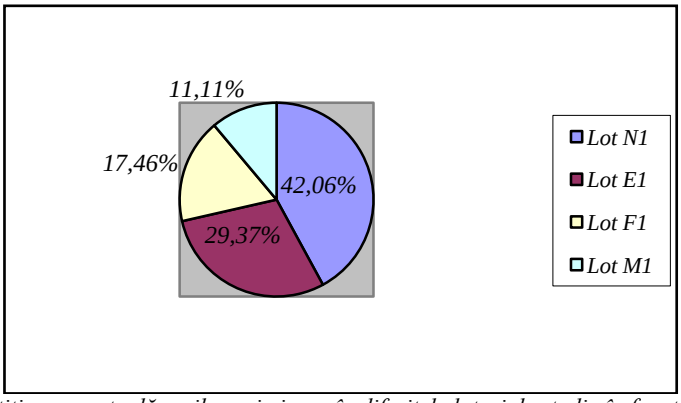


Fig. 1 Repartiţia procentuală a oilor primipare în diferitele loturi de studiu în funcţie de numărul celulelor somatice/ml.

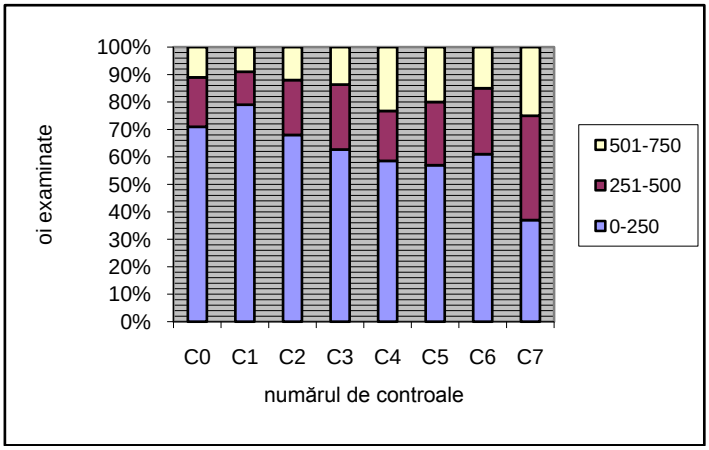


Fig. 2 Repartiţia procentuală a oilor din lotul N1 în funcţie de numărul de celule somatice (media aritmetică x 1000 celule/ml) de la fiecare control.

La majoritatea oilor din lotul N1 (figura 2), cu excepţia ultimului control, numărul de celule somatice a fost mai mic de 250.000 celule/ml. pe toată durata lactaţiei. Rezultate asemănătoare s-au obţinut şi la oile din lotul F1 (figura 3), cu excepţia ultimei perioade de lactaţie când numărul de celule somatice a fost crescut. La oile din lotul E1 (figura 4) numărul de celule somatice a fost crescut pe toată perioada de lactaţie. După al treilea control, la majoritatea oilor din acest lot, numărul de celule somatice a fost mai mare de 750.000 celule/ml. la un procent semificativ înregistrându-se valori de peste 1.500.000 celule/ml.

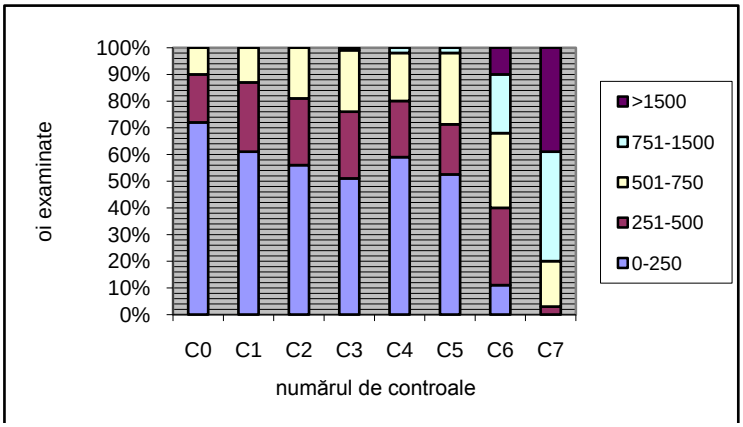


Fig. 3 Repartiţia procentuală a oilor din lotul F1 în funcţie de numărul de celule somatice (media aritmetică x 1000 celule/ml) de la fiecare control.

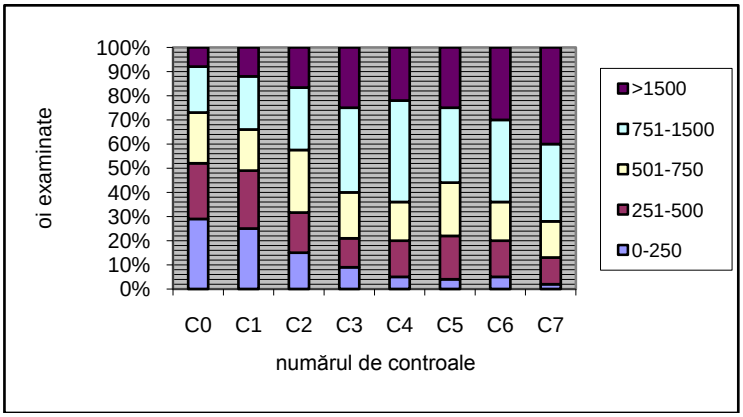


Fig. 4 Repartiţia procentuală a oilor din lotul E1 în funcţie de numărul de celule somatice (media aritmetică x 1000 celule/ml) de la fiecare control.

La aproximativ 16% din oile examinate (lotul N1, F1 şi E1) numărul de celule somatice a fost cuprins între 500.000 şi 750.000 celule/ml.

Oile la care s-au diagnosticat mastite clinice au avut crescut numărul de celule somatice (figura 5). La aproximativ 11%, numărul celulelor somatice a fost cuprins între 750.000 şi 1.000.000 celule/ml., la 69% între 1.000.000 şi 2.000.000 celule/ml. iar la 20% a fost mai mare de 2.000.000 celule/ml., ajungându-se până la 3.240.000 celule/ml.

În perioada de lactaţie, 72,22% din infecţiile mamare au fost produse de stafilococii non aureus, 11,11% de Staphylococcus aureus şi 16,67% de germani din alte specii decât stafilococii, iar în cea de repaus mamar, 69% din infecţii au fost produse de stafilococii non aureus, 12% de Staphilococcus aureus şi 19% de germeni din alte specii.

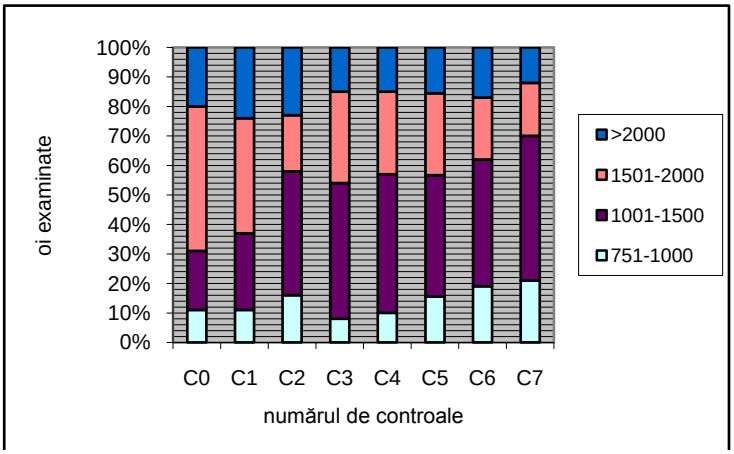


Fig. 5 Repartiţia procentuală a oilor din lotul M1 în funcţie de numărul de celule somatice (media aritmetică x 1000 celule/ml) la fiecare control.

În perioada de lactaţie, 72,22% din infecţiile mamare au fost produse de stafilococii non aureus, 11,11% de Staphylococcus aureus şi 16,67% de germani din alte specii decât stafilococii, iar în cea de repaus mamar, 69% din infecţii au fost produse de stafilococii non aureus, 12% de Staphilococcus aureus şi 19% de germeni din alte specii.

Analizând datele din tabelul 2 constatăm că la 26 oi (20,63%) glanda mamară a fost sănătoasă la sfârşitul perioadei de lactaţie, la 69 oi (54,75%) glanda mamară a fost infectată cu stafilococi non aureus, la 12 oi (9,52%) cu Staphylococcus aureus şi la 19 oi (15,08%) cu alţi germeni. La compararea rezultatelor cu cele prezentate în alte studii (1, 3, 5 ,9, 11, 12) trebuie avut în vedere faptul că oile, de la care s-au recoltat probe pentru examenul bacteriologic, au avut mai mult de 750.000 celule/ml. şi provin din turme la care acest parametru, la laptele de colectură, a fost mai mare de 1.000.000 celule/ml.

Tabelul 2 Rezultatele examenului bacteriologic din perioada de repaus mamar în funcţie de profilul celular al oilor.

Rezultatele bacteriologice	absenţa germenilor	stafilococi non aureus	Staphylococcus aureus	alţi germeni	total
Lot N1	20	25	0	8	53
Lot E1	4	25	2	6	37
Lot F1	2	18	0	2	22
Lot M1	0	1	10	3	14
Total	**26**	**69**	**12**	**19**	**126**

Din rezultatele prezentate se constată că numărarea celulelor somatice poate fi utilizată pentru a diagnostica o inflamaţie a glandei mamare, cu condiţia ca la interpretare să se ţină cont de factorii noninflamatori care influenţează numărul de celule somatice. Cu toate acestea în anumite perioade parametrii enunţaţi, la pragul de 750.000 celule/ml. nu se corelează, respectiv de la: 62,25% din oile, care au avut numărul celulelor somatice sub pragul stabilit (la majoritatea cuprins între 500.000 şi 750.000 celule/ml.), s-a izolat cel puţin un germen în perioada de repaus mamar (în general germeni patogeni minori); 10,81% din oile care au avut crescut numărul celulelor somatice şi un examen bacteriologic pozitiv în perioada de lactatie (lotul E1), nu s-au izolat germeni în perioada repausului mamar; 9,09% din oile care au avut crescut numărul celulelor somatice la sfârşitul perioadei de lactaţiei (lotul F1) nu s-au izolat germeni în perioada repausului mamar. Aceste aspecte au fost constatate şi în alte studii (2, 7, 8).

CONCLUZII

1. Numărul celulelor somatice poate fi utilizat în diagnosticul mastitelor subclinice la ovine, dacă se efectuează un control al laptelui rapid şi performant.
2. Numărul crescut al celulelor somatice din laptele de colectură poate să constitue un prim indiciu a prevalenţei infecţiilor mamare în turma respectivă.
3. Din toate probele de lapte recoltate de la oile primipare la care numărul de celule somatice a fost mai mare de 750.000 celule/ml. s-au izolat germeni bacterieni.
4. La 76,92% din oile primipare care au avut glanda mamară sănătoasă la sfărşitul perioadei de lactaţie numărul de celule somatice a fost mai mic de 750.000 celule/ml.
5. 62,32% din oile primipare la care glanda mamară a fost infectată în perioada de repaus mamar au avut numărul de celule somatice peste limita stabilită.
6. Numărul crescut al celulelor somatice nu s-a corelat întotdeauna cu infecţia glandei mamare, respectiv 23,08% din oile la care glanda mamară a fost sănătoasă în perioada de repaus mamar au avut numărul de celule somatice mai mare de 750.000 celule/ml.
7. De la 62,25% din oile care au avut numărul celulelor somatice mai mic de 750.000 celule/ml., s-a izolat cel puţin un germen în perioada de repaus mamar (stafilococi non aureus).

BIBLIOGRAFIE

1. Albenzio, M., Taibi, L., Muscio, A., Sevi, A., 2002, Prevalence and etiology of subclinical mastitisin intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk, Small Rumin. Res., 43, 219–226.
2. Bergonier, D., Berthelot, X., 2003, New advances in Epizootiology and control of ewe mastitis, Livest. Prod Sci. 79, 1–16.
3. Bergonier, D., Lagriffoul, G., Berthelot, X., Barillet, F., 1996, Facteurs de variation non infectieux des comptages de cellules somatiques chez les ovins et les caprins laitiers, in: Rubino, R. (Ed.), Proceedings of Somaticcells and milk of Small Ruminants, InternationalSymposium, Bella, Italy, Wageningen Pers, Netherlands, 113–135.
4. Droke, E.A., Paape, M.J., Di Carlo, A.L., 1993, Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk, J. Dairy Sci. 76, 1035–1039.
5. Fthenakis, G.C., 1996, Use of somatic cell counts or of indirect tests in milk for the diagnosis ofsubclinical mastitis in ewes, in: Rubino R.(Ed.), Proceedings of Somatic cells and milkof Small Ruminants, International Symposium, Bella, Italy, Wageningen Pers, The Netherlands, 27–29.
6. Gonzalez-Rodriguez, M.C., Gonzalo, C., San-Primitivo, F., Carmenes, P., 1995, Relation ship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. J Dairy Sci., 78, 2753–2759.
7. Hariharan, H., Donachie, W., Macaldowie, C., Keefe, G., 2004, Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a Scottish farm.
8. Lafi, S.Q., Al Majali, A.M., Rousan, M.D., Alawneh, J.M., 1998, Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan, Prev. Vet.Med., 33, 171–181.
9. Lagriffoul, G., Barillet, F., Bergonier, D., Berthelot, X., Jacquin, M., 1999, Relation entre les comptages de cellules somatiques du lait de troupeau et la prévalence des mammites subcliniques des brebis estimée avec les comptages de cellules somatiques individuels, in: Barillet, F., Zervas, N.P. (Eds.), Proceedingsof the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants. Milking and milk production of dairy sheep and goats, Athens, Greece, Wageningen Pers, The Netherlands, 151–156.
10. Menzies, P.I., Ramanoon, S.Z., 2001, *Mastitis of sheep and goats*. Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract., 17, 2, 333-58.
11. Pengov, A., 2001, The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland, J.Dairy Sci., 84, 572–574.
12. Romeo, M., Ziluga I., Marco J., 1998, Diagnóstico in situ de la infección mamaria mediante palpación, california mastitis test y su seguimiento mediante recuento de celulas somáticas, Ovis 59, 61–77.
13. Suarez, V.H., Busetti, M.R., Miranda, A.O., Calvinho, L.F., 2002, Effect of infectious status and parity on somatic cell count and California mastitis test in pampinta dairy ewes, J. Vet.Med. B, 49, 230–234.

RESEARCHES ON THE CORRELATION BETWEEN SOMATIC CELLS NUMBER AND MAMMARY GLAND INFECTION IN GOATS

VASIU C.[1], BOGOLIN I.[2], CRĂCIUN Maria[3], BOLFĂ P.[1]
[1]FMV Cluj-Napoca
[2]D.S.V.S.A Bistriţa Năsăud
[3]L.S.V.S.A.J. Bistriţa

Our study was realized on 94 primiparous goats, selected from flocks in which the number of somatic cells in collected milk was higher than 1.000.000 cells/ml. The first control was made between the 8-th and 20-th day of lactation (mean of 14 days), while the next controls at intervals of approximately 30 days. All samples were examined using numeric evaluation of somatic cells by rapid fluoro-opto electronic method SR ISO 13366-3/2001. In the cases where the limit of 750.000 somatic cells/ml was overcome, as well as at the end of the lactation period, we collected milk samples to determine if in these cases infection occurred, and if so, of what origin (Staphylococcus aureus, another Staphylococcus type or other germs). In 95.30% of bacteriological examined samples from the primiparous goats in which we founded more than 750.000 somatic cells/ml, at least one type of bacteria was isolated. At the end of lactation period 70.21% goats had an infection of the mammary gland. A percentage of 80.30% of the infections were produced by non-aureus Staphylococci, 10.61% by Staphylococcus aureus and 9.09% by non-staphylococcal germs. In 52.83% from the primiparous examined goats, increased number of somatic cells was correlated with the presence of intramammary infections in the mammary repose.

Most of the studies on goats' mammary gland infections are characterized by an increase in the number of somatic cells (1, 2, 7, 11, 12, 13, 14). This increase is close related to the pathogenity of the germ involved (major pathogens produce an increase reaction compared to minor pathogens) and the receptivity of the udder (9). Somatic cells count can be used to diagnose an inflammation of the udder in goats, if we take into account the variability of factors influencing this number: age, stage of lactation, stress, medium conditions, season, race, alimentation, mechanic milking and others (4, 7, 10).

At individual level, depending on the dynamic of somatic cells, there are proposed two approximate methods for the detection of the heath status in mammary gland:

1. Use of punctual thresholds for the correlation of somatic cells number with mammary gland infection: assessment of a medium threshold between 500.000 and 1.000.000 cells/ml (6, 8) or two thresholds (750.000 and respectively 1.750.000 cells/ml) to distinguish between a minor and a major pathogen infecting the mammary gland (7).
2. Use of dynamic thresholds by calculating the average of the last six counts of somatic cells (one control monthly) which are then compared with the previously established limits, or half is considered infected when the threshold is over fulfilled two or three times at six successive controls (7).

In or research we used the limit of 750.000 cells/ml for individually collected samples and 1.000.000 cells/ml for common collected milk. The objective of our study was to correlate the udder infections in mammary repose (key period for the treatment) with the number of somatic cells. In this direction, we aimed to verify if a goat with somatic cells more than 750.000 has or not a mammary gland infection with a pathogen bacteria.

MATERIALS AND METHODS

We selected 94 primiparous goats from three goat flocks (localized in Bistrita Nasaud County) in which the average of somatic cells number in collected milk was over 1.000.000 cells/ml. The goats were grouped in different Lots, depending on the number of somatic cell/ml and the presence of modifications at the udder (clinical mastitis): **lot N2**, formed of 31 goats which never overcome the threshold of 750.000 somatic cells/ml; **lot E2** formed of 39 goats in which the testing showed at least two times more than 750.000 somatic cells/ml; **lot F2** with 17 goats which had less than 750.000 somatic cells/ml during lactation, excepting the last two controls; **lot M2** formed of 7 primiparous goats which had more than 750.000 somatic cells/ml, and clinical exam showed clinical mastitis.

For the laboratory exams we collected milk samples in sterile conditions as possible, as follows: milk samples were collected from primiparous goats in the studied flocks at an interval of 30 days (program designed with the breeders and the collectors), for the somatic cells count; aseptic collection of milk samples each time a goat over fulfilled 750.000 somatic cells/ml for bacteriological exam; aseptic collection of milk samples from all primiparous goats in the mammary repose period.

First count of somatic cells was realized between the 8-th and the 20-th day of lactation, and the next controls at intervals of 30 days. All samples were examined using numeric evaluation of somatic cells by rapid fluoro-opto electronic method SR ISO 13366-3/2001.

Bacteriological exam of milk samples was achieved within the first 24 hours from collection at the Sanitary Veterinarian Laboratory and for Animal Health Bistrita, the Institute of Diagnostic and Animal Health Bucharest and the Institute of Hygiene and Veterinary Public Health Bucharest.

Isolation and identification of bacterial species involved in mammary infections was achieved using the following methods: O.I.E. 1.4 SR ISO 688-1/A1/2005, for Staphylococcus and Micrococcus genus; OIE 1.24 for Streptococcus sp; SR EN ISO 7932/2005, for Bacillus cereus; SR ISO 16649-2/2002, for Escherichia coli; SR ISO21528-2/2004, for Enterobacteriaceae. Species from the genus Corynebaterium and Arcanobacterium were isolated on sheep blood agar in CO_2 atmosphere and confirmed through biochemical tests.

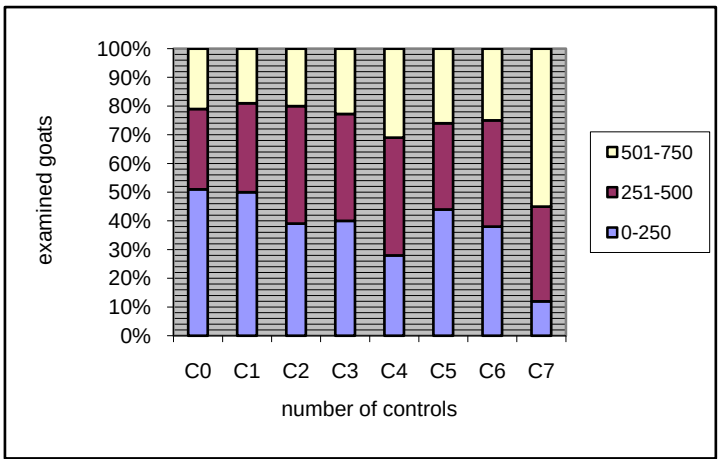
We took into account for our study only cultures in which there were monocultures or the most two types of colonies with a predominant one.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The average of somatic cells in the milk collected from all the flocks in this study was 1.344.830 cells/ml. These results are higher compared to those obtained by Bergonier (4), which found in the collection milk of goat flocks from France, Spain and Italy an average of 1.148.000 – 1.214.000 somatic cells/ml and 1.575.000 in the goats from Sardinia confirming mammary infections in these flocks.

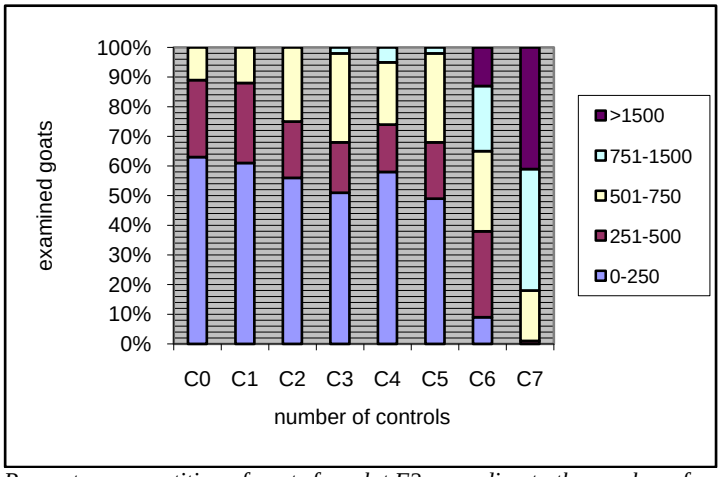
Somatic cells count from the individually collected milk has been done from a mixture of the milk from both mamma, and results were reported individually. The results showed that 32.98% of the goats (lot N2) had less than 750.000 cells/ml over the entire lactation period, 42.55% of the goats (lot E2) had more than 750.000 cells/ml in at least two counts, 17.02% of the examined animals (lot F2) had more than 750.000 cells/ml at the end of lactation, 7.45% of animals (lot M2) had more than 750.000 cells/ml over the entire lactation and presented clinical changes localized at the mammary gland. We noticed an increase of somatic cells number at the goats from all flocks progressing parallel with lactation which should not necessarily be the consequence of a mammary infection.

The majority of goats from lot N2 (picture 1) had less than 500.000 cells/ml over the entire lactation period, excepting the last control.



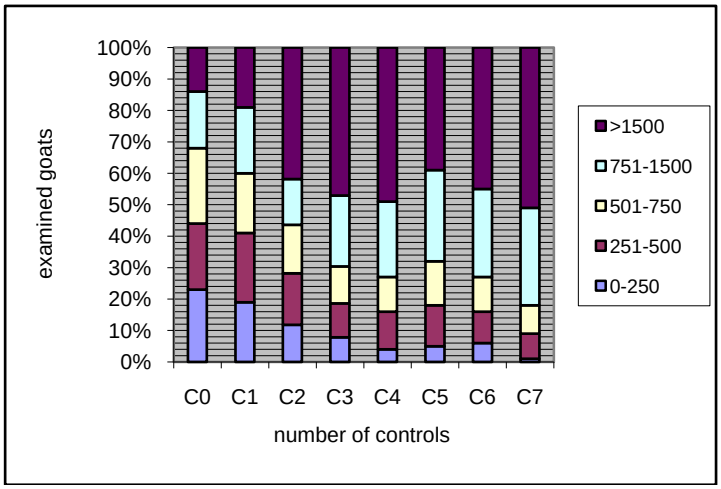
Picture 1: Percentage repartition of goats from lot N2 according to the number of somatic cells (average x 1.000 cells/ml) of each control.

Results are similar in lot F2 (picture 2), excepting the end of lactation when the majority of animals had an increased number of somatic cells (over 750.000 cells/ml).



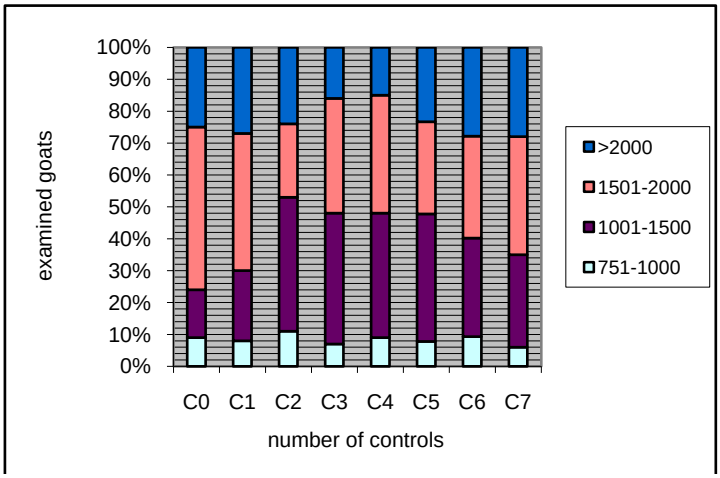
Picture 2: Percentage repartition of goats from lot F2 according to the number of somatic cells (average x 1.000 cells/ml) of each control.

In the goats from lot E2 (picture 3) somatic cells were constantly increased over the entire lactation. After the third control, in the majority of goats the obtained values over 750.000 cells/ml and in 40% of the animals the values were over 1.500.000 somatic cells/ml.



Picture 3: Percentage repartition of goats from lot E2 according to the number of somatic cells (average x 1.000 cells/ml) of each control.

All the animals in lot M2 (picture 4) had an increased number of somatic cells, with values between 1.500.000 and 2.000.000 cells/ml. Approximately 23% of these had more than 2.000.000 cells/ml reaching values over 6.927.000 cells/ml.



Picture 4: Percentage repartition of goats from lot M2 according to the number of somatic cells (average x 1.000 cells/ml) of each control.

The percentage of primiparous goats in which we diagnosed infections of the mammary gland through bacteriological exam was of 48.94% in the lactation period and 70.21% in the mammary repose period. An analysis of the microorganisms which produced udder infections in goats showed that 85.19% were produced by Staphylococci non-aureus, 6.17% by Staphylococcus aureus and 8.64% by other germs. In 5 bacteriological analysis from the lactation period and 28 analysis in mammary repose period, we couldn't isolate pathogen germs, although goats had an increased number of somatic cells.

Data presented in table 1 show that in 28 goats (29.79%) the mammary gland was healthy at the end of lactation, in 53 animals (56.8%) the udder was infected with Staphylococci non-aureus, in 7 goats (7.44%) with Staphylococcus aureus and in 6 animals (6.8%) with other germs.

From the 28 goats which had a healthy mammary gland in the period of mammary repose, a number of 17 (60.71%) had a low number of somatic cells over the period of lactation, 8 animals (28.57%) had a grown number of somatic cells over lactation and 3 (10.71%) had an increase in somatic cells only at the end of lactation. If we consider that the threshold of 750.000 somatic cells/ml is not usable at the end of lactation, we had 8 goats (28.57%) which had an increase in somatic cells, a positive bacteriological exam during lactation and a negative exam during mammary repose.

Table 1
Bacteriological results from primiparous goats in the period of mammary repose according to the cellular profile.

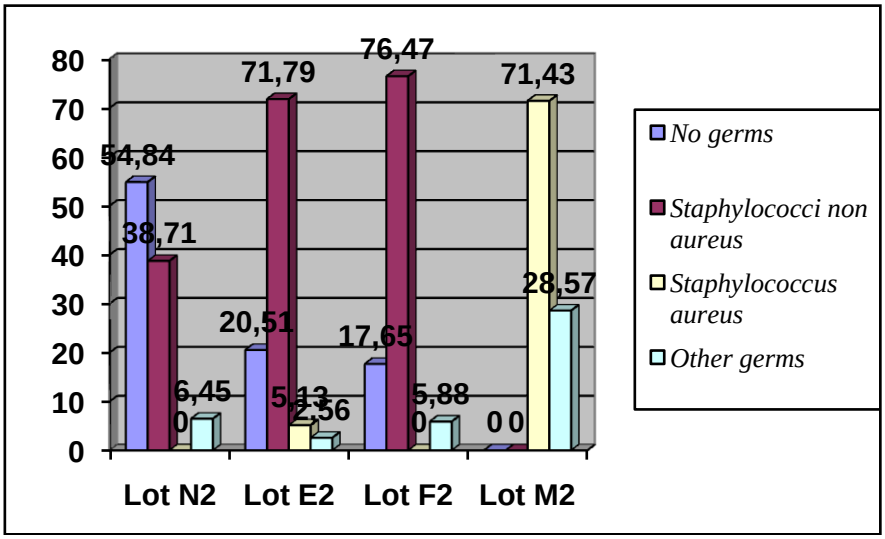
Bacteriological results	Absence of germs	Staphylococci non-aureus	Staphylococcus aureus	Other germs	Total
Lot N2	17	12	0	2	31
Lot E2	8	28	2	1	39
Lot F2	3	13	0	1	17
Lot M2	0	0	5	2	7
Total	28	53	7	6	94

From the 53 goats infected with Staphylococci non-aureus, 12 (22.64%) presented a low number of somatic cells (under 750.000 cells/ml) over the entire lactation period, 28 (52.83%) had an increased number of somatic cells and 13 animals (24.53%) presented an increase in somatic cells only at the end of lactation. The 7 animals infected with Staphylococcus aureus had an increased number of somatic cells (over 2.000.000 cells/ml) and were diagnosed with clinical mastitis. Our results are similar with other epidemiological studies (7, 9).

The correlation between somatic cell count and bacteriological analysis (picture 5), in the goats from the studied lots, has shown that at the end of lactation:

In lot **N2** a percentage of 54.84% (17 out of 31) goats had a healthy mammary gland, 38.71% (12 out of 31) had a mammary gland infection with Staphylococci non aureus, 0% (0 out of 31)with Staphylococcus aureus and 6.54% (2 out of 31) had an infection with other germs;

- In lot **E2**, 20.51% (8 out of 39) of the animals had a healthy mammary gland, 71.79% (28 out of 39) had a mammary gland infection with Staphylococci non aureus, 5.13% (2 out of 39) had an infection with with Staphylococcus aureus and 2.56% (1 out of 39) had an infection with other germs;
- In lot **F2**, 17.65% (3 out of 17) of the goats had a healthy mammary gland, 76.47% (13 out of 17) had a mammary gland infection with Staphylococci non aureus, 0% (0 out of 31)with Staphylococcus aureus and 5.88% (1 out of 17) had an infection with other germs;
- In lot **M2**, no animal had a healthy mammary gland, 71.43% (5 out of 7) had a mammary infection with Staphylococcus aureus and 28.57% (2 out of 22) with other germs.



Picture 5: Results of the bacteriological exam in the mammary repose period according to the cellular profile in the studied goats (%).

CONCLUSIONS

1. Increased number of somatic cells in the commonly collected milk can be used as a first clue of the prevalence of mammary infections in that flock.
2. A correlation between somatic cells and mammary gland infections in goats is difficult to achieve as the milk contains a variable quantity of epithelial cells and the number of somatic cells is increased compared to the one in sheep.
3. The rules proposed by different studies regarding the correlation of somatic cells with mammary gland infection in goats, have a practical appliance only if there is a rapid and efficient milk control.
4. In 95.3% of the goats with more than 750.000 somatic cells/ml at least one germ was isolated.
5. Absence of infection in goats which had an increased number of somatic cells only at the end of lactation is explained by the physiological increase (after the 220th day of lactation the limit of 750.000 is inconclusive).
6. Staphylococci non aureus are the predominant germs to produce mammary infections in goats, with an increase of the number of somatic cells in the period of lactation and mammary repose.
7. The fact that mammary gland was healthy at the end of lactation for the goats that had an increased number of somatic cells and a positive bacteriological exam (Staphylococci non aureus), can be explained through spontaneous recovery.
8. In the case of Staphylococcus aureus spontaneous recovery did not occurred.

REFERENCES

1. BAUDRY, C., 1999, Utilisation des numérations cellulaires individuelles dans le dépistage des infections mammaires subcliniques de la chèvre. L'égide n°14, mars 1999, 3.
2. BAUDRY, C., DE CREMOUX, R., PERRIN, G., 1994, Composition et concentration cellulaire du lait de chèvre au cours de la lactation. Proc Int. Symp. Somatic Cell Counts and Milk of Small Ruminants. Bella, Italy 25 au 27 sept., 23-27.
3. BERGONIER, D., BERTHELOT, X., 1993, Mammites et qualité du lait chez les petits ruminants. Le Point Vétérinaire, 25 (155), 472-475.
4. BERGONIER, D., DE CREMOUX, R., RUPP, R., LAGRIFFOUL, G., BERTHELOT, X., 2003, *Mastitis of dairy small ruminants*. Vet. Res., 34, 1-28.
5. CONTRERAS, A., CORRALES, J.C., SIERRA, D., MARCO, J., 1995, *Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goat*. Small Rum. Res., 17, 71-78.
6. CONTRERAS, A., SIERRA, D., CORRALES, J.C., SANCHEZ, A., MARCO, J., 1996, *Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis*. Small Rumin. Res., 17, 71-78.
7. DE CREMOUX, R., 1995, Relation entre les numérations cellulaires du lait et les infections mammaires chez les chèvres.Thèse Doc Vét., Toulouse, 108.
8. KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D., MANOLKIDIS, K., TSIGOIDA, A., 1992, *Somatic cell counts in relation to infection status of the goat udder.* J. Dairy Res., 59, 21-28.
9. LERONDELLE, C., POUTREL, B., 1984, Characteristic of non-clinical mammary infection of goats. Ann. Rech. Vet., 15, 105-112.
10. LERONDELLE, C., RICHARD, Y., ISSARTIAL, J., 1992. Factors affecting somatic cell counts in goat milk. Small Rum. Res., 8, 129-139.
11. PAAPE, M.J., POUTREL, B., CAPUCO, A.V., CONTRERAS, A., MARCO, J.C., 2001. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. J. Dairy Sci., 84, 237-244.
12. PERRIN, G., BAUDRY, C., 1993, Numérations cellulaires du lait de chèvre.Lait, 73, 489-497.
13. POUTREL, B., DE CREMOUX, R., PILLET, R., HEUCHEL, V., DUCELLIEZ, M., 1994, Relations entre statuts infectieux des mamelles et numérations cellulaires du lait de chèvre. Proc. Int. Symp, Somatic cell counts and milk of small ruminants. Bella, Italy 25 au 27 sept., 122-125.
14. RIVES, C., 1997, Numération cellulaire du lait de chèvre: étude bibliographique et essai préliminaire.Thèse Doc. Vét., Toulouse, 91.

OBSERVATII PRIVIND POLUAREA APEI CU HIDROXID DE SODIU IN JUDETUL TULCEA

OBSERVATIONS REGARDING THE WATER POLLUTION WITH SODIUM HYDROXYDE IN TULCEA DISTRICT

BRIA Gabriela
DSVSA Tulcea
gbria@yahoo.com

The studies were held in between 2004-2007 on the water essays taken from different point of Tulcea district.

The essays were examined in the State Sanitary Veterinary laboratory of Tulcea in the Ecopatology And Environment Protection Section.

After finishing the studies we discovered that the sodium hydroxide pollution in one of the points studied was accidentally, as a result of some appliance washing and the discharge of used water in natural receptors.

Studiul actiunii factorilor poluanti asupra echilibrului ecologic al naturii este de actualitate permanenta . Factorii poluanti afecteaza plantele , animalele si direct sau indirect omul.

Cele mai des intalnite forme de poluare sunt: poluarea apei, poluarea solului, poluarea aerului (atmosferica). Aceste elemente de baza vietii omenesti se pare ca sunt si cele mai afectate de actiunile iresponsabile ale fiintei omenesti. Solul, ca si aerul si apa este un factor de mediu cu influenta deosebita asupra sanatatii. De calitatea solului depinde formarea si protectia surselor de apa, atat a celei de suprafata cat mai ales a celei subterane.

Poloarea apelor afecteaza calitatea vietii la scara planetara. Apa reprezinta sursa de viata pentru organismele din toate mediile. Fara apa nu poate exista viata. Calitatea ei a inceput din ce in ce mai mult sa se degradeze ca urmare a modificarilor de ordin fizic, chimic si bacteriologic.

HIDROXIDUL DE SODIU este cunoscut si sub numele de soda caustica. Fiind o baza a metalului alcalin este folosit frecvent ca reactiv in laboratoare. Este folosit la fluidizarea argilelor refractare si contribuie la disocierea disilicatilor si trisilicatilor. În industrie, NaOH mai este utilizat la fabricarea sapunului din grasimi, la obtinerea fibrelor artificiale (de ex. matase artificiala), la mercerizarea bumbacului si la fabricarea sodei de rufe (Na2CO3). De asemanea, NaOH este utilizat la obtinerea celulozei din lemn, la rafinarea produselor petroliere, la regenerarea cauciucului si la fabricarea fenolului si produselor de inalbire.

MATERIAL SI METODA

Observatiile asupra poluarii cu hidroxid de sodium in judetul Tulcea au fost efectuate in luna iulie a anului 2007.

Probele de apa pentru examenul fizico chimic si toxicologic au fost recoltate din urmatoarele puncte:

- punctul de recoltare nr. 1- Canal aductiune SPP4 Baia
- punctul de recoltare nr. 2- Canal legatura cu lacul Ceamurlia
- punctul de recoltare nr. 3- canal aductiune SPP4 in amonte de varsarea paraului Hamangia
- punctul de recoltare nr.4- canal aductiune SPP4 in aval de varsarea paraului Hamangia
- punctul de recoltare nr.5- paraul Hamangia
- punctul de recoltare nr.6- apa uzata statia de epurare Baia
- punctul de recoltare nr.7- Lacul Ceamurlia

Probele de apa au fost examinate in Laboratorul Sanitar Veterinar si pentru Siguranta Alimentelor Tulcea prin metoda spectrofotometrica folosind Spectrofotometru cu absortie moleculara .

Pentru determinarea hidroxidului de sodiu s-a folosit o metoda clasica de titrare care a dovedit absenta sau prezenta acestuia in probele analizate.

REZULTATE SI DISCUTII

In urma analizelor fizico chimice si toxicologice la probele de apa analizate am obtinut urmatoarele rezultate:

Nr. Ctr.	Specificare	pH	Azotiti mgN/ dm^3	Ortofosfati mgP/ dm^3	Sulfati mg/ dm^3	Azotati mgN/ dm^3	NaOH
1.	Canal aductiune SPP4 Baia	8,40	0,069	0,173	29	11,65	Present (+)
2.	Canal legatura cu lacul Ceamurlia	7,94	0,028	0,078	26	absent	absent
3.	canal aductiune SPP4 in amonte de varsarea paraului Hamangia	8,09	0,030	0,101	28	12,43	Present (+)
4.	canal aductiune SPP4 in aval de varsarea paraului Hamangia	8,00	0,042	0,229	26	16,48	Present (+)
5.	paraul Hamangia	8,64	0,027	0,312	30	18,72	Present (++)
6.	apa uzata statia de epurare Baia	8,76	0,075		131	98,96	Present (++)
7.	Lacul Ceamurlia	7,59	0,028	0,075	32	absent	absent

In urma deplasarii la fata locului pentru recoltarea probelor de apa am constatat mortalitate in randul ihtiofaunei din zona canalului de alimentare a Statiei de pompare Baia.

CONCLUZII

1. S-au recoltat 7 probe de apa din puncte diferite din zona Parau Hamangia, Lacul Ceamurlia a localitatii Baia din judetul Tulcea
2. in urma examenelor fizico-chimice si toxicologice s-a constatat prezenta hidroxidului de sodiu intr-o cantitate mai mare la locul de deversare din statia de epurare , scazand treptat datorita diluarii in albia paraului si pana la a fi absenta in Lacul Ceamurlia.
3. s-a constat mortalitate la pesti de marime mica-mijlocie in efectiv mare.
4. mortalitatile s-au inregistrat in canalul de aductiune , acolo unde se varsa Paraul Hamangia
5. evacuarea statiei de epurare se face in paraul Hamangia
6. hidoxidul de sodiu face parte din categoria alcalilor si se observa la probele prelevate un ph bazic .
7. pestii morti prezentau aspect slaninos
8. temperatura mediului ambiant a fost de 39 C si a apei de 31,5 C
9. Nu au fost afectati pestii de talie mare.

BIBLIOGRAFIE

1. **D.POPESCU, C. DRAGHICI, I. COMAN, M. DECUN**, 1983- IGIENA, ED. DIDACTICA SI PEDAGOGICA, BUCURESTI
2. **SILVIA ANTONIU**, 2007 – EXAMENUL FIZICO-CHIMIC SI BACTERIOLOGIC AL APEI – GHID TEMATIC , IDSA BUCURESTI
3. **MARIAN ARSENE, MARINELA ARSENE,** 2005 – OBSERVATII PRIVIND POLUAREA APEI DIN DELTA DUNARII CU DETERGENTI ANIONICI, LSVSA TULCEA

DETERMINAREA PARAMETRILOR FIZICO-CHIMICI DIN APELE DE SUPRAFATA PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICA

THE DETERMINATION OF THE PHISIC-CHEMICAL PARAMETERS IN THE SURFACE WATERS BY THE SPECTROFOTOMETRICA METHOD

BRIA Gabriela, ARSENE Marinela
DSVSA Tulcea
gbria@yahoo.com

The studies were held in between 2004-2007 on the water essays taken from different point of Tulcea district.

The essays were examined in the State Sanitary Veterinary laboratory of Tulcea in the Ecopatology And Environment Protection Section.

After finishing the studies we discovered that the method of the determination spectrofotometrica of the physic-chemical parameters has the following advantages: fast execution time, low reactive consumption, efficiency in execution etc.

Apa este cea mai raspandita substanta compusa, ocupand ¾ din suprafata globului terestru. Ea constitue factorul principal al intretinerii si deyvoltarii vietii, fiind de o importanta primordiala .

Judeţul Tulcea, ocupă jumătatea nordică a provinciei istorice Dobrogea, situată în extremitatea sud-estică a României, a cărui însemnătate vine din aşezarea lui la gurile Dunării si ieşirea la mare.

Din suprafaţa totală a judeţului, 40,54% adică 3446 km**2**, este ocupată de cea mai nouă formă de relief, suprafaţa umedă constituită din Delta Dunării şi complexul lagunar Razim – Sinoe aflată la nord-estul judeţului, ce reprezintă prima zonă biogeografică a judeţului, în continuă expansiune datorită depunerii continue a aluviunilor Dunării, aflată sub jurisdicţia **A**dministraţiei **R**ezervaţiei **B**iosferei **D**elta **D**unării.

Dunărea formează hotarul natural la vest si nord, fiind principala cale de transport în judeţ. În dreptul municipiului Tulcea, Dunărea se desparte în trei braţe: Chilia la nord, Sfântu Gheorghe la sud (braţe ce permit numai transportul fluvial) şi braţul Sulina la mijloc, care asigură transportul maritim până în porturile Galaţi pentru nave mai mari şi Brăila pentru nave mai mici. La sud de braţul Sfântu Gheorghe este laguna Razim care pătrunde adânc în judeţ şi care se continuă în judeţul Constanţa cu lacul Sinoe. O reţea de canale naturale şi artificiale, lacuri si bălţi, plauri si grinduri formează un ecosistem unic.

Delta este strabatuta de o multime de canale, garle, rezultate prin regularizarea cursurilor, mlastini si mai ales lacuri: Merhei, Gorgova, Rosu, Lumina, etc.

MATERIAL SI METODA

Cercetarile au fost efectuate in perioada 2004-2007 pe probe de apa de suprafata recoltate din puncte diferite de pe teritoriul judetului Tulcea.

Punctele de recoltare pentru examenul fizico-chimic au fost urmatoarele:

- Punctul de recoltare nr.1- Lacul Fortuna
- Punctul de recoltare nr.2- Lacul Rosu
- Punctul de recoltare nr.3- Lacul Nebunu
- Punctul de recoltare nr.4- Canal Perivolovca

Frecventa de recoltare a fost de o data pe an in perioada martie – octombrie.

Probele de apa au fost lucrate in cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar si pentru Siguranta Alimentelor Tulcea prin metoda spectrofotometrica folosind Spectrometru cu absortie moleculara.

In urma analizelor probelor au fost lucrati parametrii : amoniu, azotati, azotiti, sulfati, cloruri.

Metoda de determinare spectrofotometrica a azotului amoniacal :

Amoniu-azot (NH4-N) se gaseste sub doua forme : ioni de amoniu si amoniac.In solutii puternic alcaline amoniu-azot este prezent sub forma de amoniac care reactioneaza cu cu acidul hipocloros formand monocloramina.Aceasta este o reactie reversibila cu trecerea fenolului in indofenol , a carui concentratie este detrminata fotometric.

Sticlarie:

- pahare Erlenmeyer
- pipeta de 5 ml
- palnie

Reactivi si alte materiale:

- -trusa Specroquant care contine:
  - 1 flacon reactiv NH4-1K
  - 25 tuburi de reactie
  - 1 tub de solutie etalon (cu capac alb)
  - coala cu rondele adezive pentru individualizarea tuburilor de reactie
- hidroxid de sodiu 1m
- acid sulfuric 0,5 m
- stativ pentru tuburi
- hartie de filtru

Pregatirea probei:

- Se analizeaza probele imediat dupa recoltare.
- Probele tulburi se filtreaza prin haartie de filtru.
- Se aduc probele la o temperatura cuprinsa intre 20-30˚C.

Se ajusteaza ph-ul daca este necesar cu hidroxid de sodiu 1m sau acid sulfuric 0,5 m astfel incat acesta sa fie cuprins intre 4-13

Modul de lucru:

1. In tubul de reactie se pun :
   - 5 ml din proba de analizat, se inchide tubul si se agita usor pentru omogenizare;
   - 1 doza de reactiv NH4-1K , se inchide tubul si se agita energic pana la completa dizolvare;
2. Se lasa in repaus 15 minute (timp de reactie) , dupa care se masoara la Spectroquant .

Metoda de determinare spectrofotometrica a azotatilor:

Pregatirea probei:

Se analizeaza probele imediat dupa recoltare.

Probele tulburi se filtreaza.

Se aduc probele la o temperatura cuprinsa intre 5-25˚C.

Probele care contin mai mult de 2000 mg/l Cl- se dilueaza cu apa distilata.

Se ajusteaza ph-ul daca este necesar cu acid sulfuric 25% astfel incat acesta sa fie cuprins intre 1-3.

Daca este necesar se elimina interferentele ionilor de nitrit (in cazul in care acestia deapsesc mai mult de 100 mg/dm3) prin adaugarea a 50 mg/ dm3 acid amidosulfonic la 10 ml de proba.

Modul de lucru:

1.In tubul de reactie se pipeteza:

- 0,5 ml din proba de analizat .Nu se omogenizeaza!
- 1 ml reactiv NO3 -1K , se inchide tubul si se omogenizeaza.

Atentie:sunt necesari ochelarii de protectie!

tubul se incalzeste si din acest motiv el trebuie tinut numai de capac.

Nu se raceste tubul cu apa rece!

2. Se lasa in repaus exact 10 minute (timp de reactie) si apoi se masoara la Spectroquant.

Metoda de determinare spectrofotometrica a azotitilor:

Pregatirea probei:

Se analizeaza probele imediat dupa recoltare.

Probele tulburi se filtreaza.

Se aduc probele la o temperatura cuprinsa intre 20-40˚C.

Se ajusteaza ph-ul daca este necesar cu hidroxid de sodiu 1m sau acid sulfuric 0,5m astfel incat acesta sa fie cuprins intre 2-10.

Modul de lucru:

1. In tubul de reactie se pipeteza:

ml din proba de analizat si se omogenizeaza!

2. Se lasa in repaus exact 10 minute (timp de reactie) si apoi se masoara la Spectroquant.

Metoda de determinare spectrofotometrica a sulfatilor :

Pregatirea probei:

Se analizeaza probele imediat dupa recoltare.

Probele tulburi se filtreaza.

Se aduc probele la o temperatura cuprinsa intre 20-40˚C.

Se ajusteaza ph-ul daca este necesar cu hidroxid de sodiu 1m sau acid clorhidric 1m astfel incat acesta sa fie cuprins intre 2-10.

Modul de lucru:

1.In tubul de reactie se pun:

- 2 ml din proba de analizat , se inchide tubul si se agita usor pentru omogenizare;
- 1 doza de reactiv SO4 -1K , se inchide tubul si se agita energic pana la completa dizolvare a reactivului;

2. Se lasa in repaus exact 2 minute (timp de recatie).

3. Se masoara imediat la Spectroquant.

Metoda de determinare spectrofotometrica a clorurilor:

Principiul metodei:

Ionii de cloruri reactioneaza cu tiocianatul de mercur (II) formand clorura de mercur (II), usor disociabila.Tiocianatul ramas liber formeaza cu ionii de fier (III) tiocianatul rosu de fier(III) care poate fi masurat fotometric la o lungime de unda de 468 nm.

Sticlarie:

pipete de 1-5 ml

pahare Erlenmeyer

pahare Berzelius de 50 ml

cuve de 10 mm

palnie

Reactivi si alte materiale:

- trusa specrtoquant care contine:

1 flacon de reactiv Cl-1, un flacon de reactiv Cl-2 si un autoselector

- apa distilata
- amoniac ,solutie 25%
- acid azotic 1 m
- hartie de filtru.

Pregatirea probei:

Se analizeaza probele imediat dupa recoltare.

Probele tulburi se filtreaza prin hartie de filtru.

Se aduc probele la o temperatura cuprinsa intre 10-30˚C.

Se ajusteaza ph-ul daca este necesar cu solutie amoniac 25% sau acid azotic 1mol/l astfel incat acesta sa fie cuprins intre 1-12.

Modul de lucru:

Pentru domeniul 2,5-25 mg/l Cl-:

1.Intr-un pahar Berzelius de 50 ml se pipeteaza:

5 ml din proba de analizat;

2,5 ml de reactiv Cl-1 si se omgenizeaza;

0,5 ml reactiv Cl-2 si se omgenizeaza;

2.Se lasa in repaus 1 minut dupa care se transfera proba intr-o cuva corespunzatoare si se masoara la spectroquant.

Masurarea se face in cuva de 10 mm.

Pentru domeniul 10-250 mg/l Cl-:

1.Intr-un pahar Berzelius de 50 ml se pipeteaza:

1 ml din proba de analizat;

2,5 ml de reactiv Cl-1 si se omgenizeaza;

0,5 ml reactiv Cl-2 si omgenizeaza;

2. Se lasa in repaus 1 minut dupa care se transfera proba intr-o cuva corespunzatoare si se masoara la spectroquant .

Masurarea se face in cuva de 10 mm.

REZULTATE SI DISCUTII

In urma analizelor spectrofotometrice a probelor de apa s-au obtinut urmatoarele rezultate:

Tabel nr.1

Anul	Pct. de recoltare	Azotiti mg/dm^3	Azotati mg/dm^3	Sulfati mg/dm^3	Amoniu mg/dm^3	Cloruri mg/dm^3
2004	Lacul Fortuna	< 0,0,3	2	59	0,15	47,2
	Lacul Rosu	0,02	2	55	0,18	55,8
	Lacul Nebunu	< 0,03	3	61	0,2	57,5
	Canal Perivolovca	0,03	2	58	0,7	64,6
2005	Lacul Fortuna	0,04	12	70	0,12	56,7
	Lacul Rosu	0,015	3	76	0,15	63,2
	Lacul Nebunu	0,021	12	56	0,16	72,5
	Canal Perivolovca	0,023	4	52	0,6	66,8
2006	Lacul Fortuna	0,010	8	46	0,16	30
	Lacul Rosu	0,016	3	48	0,16	43,8
	Lacul Nebunu	0,019	3	46	0,15	48,7
	Canal Perivolovca	0,022	6	42	0,3	52,3
2007	Lacul Fortuna	0,018	7	20	0,14	43,6
	Lacul Rosu	0,019	2	46	0,14	45,8
	Lacul Nebunu	0,021	2	42	0,15	52,4
	Canal Perivolovca	0,023	2	53	0,34	62,3

Din analiza tabelului se constata in anul 2005 o incadrare a apei din Lacurile Fortuna si Nebunu in clasa a IV a de calitate datorita valorilor crescute ale azotatilor si clasa a III a de calitate a apei din zona Canal Perivolovca datorata azotului amoniacal.

CONCLUZII

1. S-au analizat 16 probe de apa de suprafata din 4 puncte de recoltare din diverse lacuri din Delta Dunarii in perioada 2004-2007
2. S-au folosit Kituri de determinare a parametrilor fizico-chimici
3. Consumul de reactivi a fost foarte mic comparativ cu metodele clasice
4. Timpul de executie a analizelor este de cateva minute ceea ce duce la o executie a mai multor parametrii in aceeasi zi
5. Probele nu mai necesita fixare deoarece analizele se pot efectua imediat dupa recoltare

BIBLIOGRAFIE

1. **D.POPESCU, C. DRAGHICI, I. COMAN, M. DECUN**, 1983- IGIENA, ED. DIDACTICA SI PEDAGOGICA, BUCURESTI
2. **SILVIA ANTONIU**, 2007 – EXAMENUL FIZICO-CHIMIC SI BACTERIOLOGIC AL APEI – GHID TEMATIC , IDSA BUCURESTI
3. **MARIAN ARSENE, MARINELA ARSENE,** 2005 – OBSERVATII PRIVIND POLUAREA APEI DIN DELTA DUNARII CU DETERGENTI ANIONICI, LSVSA TULCEA

SYBR GREEN REAL-TIME PCR DETECTION OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2)

CADAR D.[1], CSÁGOLA A.[3], ÁDÁM D.[5], URSU Krisztina[5], SPÎNU Marina[1], KOBOLKUTI L., POPA Virgilia [4], MICLĂUŞ V.[2], TUBOLY T.[3]

[1]Department of Infectious Diseases,
[2] Discipline of Cellular Biology, Histology and Embryology, FMV Cluj-Napoca
[3]Department of Microbiology and Infectious Diseases,
Faculty of Veterinary Sciences, Budapest, Tabornok ut 24-25, Hungary
[4]Pasteur Research Institute, Bucharest
[5]CentralVeterinary Institute, Tabornok ut 24-25, Budapest, Hungary

Porcine circovirus is the smallest virus that replicates autonomously in mammalian cells (Mankertz et al., 1997) and shares the distinctive genomic structure of a covalently closed, circular, negative sense, single-stranded DNA molecule with 15-16 nm diameter and 17 kilobases. Its genome consists of a covalent circular, simple chain of DNA (Tischer et al., 1982). These virus has a nucleotide length of chain from 1759 to 1768 nucleotides (Meehan et al., 1997; Hamel et al., 1998; Fenaux et al., 2000. PCV contains six open reading frames (ORFs) (Mankertz et al., 1997); ORF1 encodes a replication-associated protein essential for replication of viral DNA (Ilyina and Koonin, 1992) and ORF2 encodes major structural proteins (Nawagitgul et al., 2000; Meehan et al., 2001, Liu et al., 2001). Sequence analysis of ORF1 and ORF2 genes has revealed that the extent of nucleotide variation is greater for the ORF2 than ORF1 (Fenaux et al., 2000; Hamel et al., 2000; Mankertz et al., 2000). The detection of PCV2 alone does not necessarily confirm a diagnosis of PMWS. Therefore, the diagnosis of PMWS must meet three criteria: (i) the presence of compatible clinical signs, (ii) the presence of characteristic microscopic lesions, and (iii) the presence of the PCV2 within these lesions. Sybr green REA-TIME PCR is a specific and more sensitive technique for detection of porcine circovirus type 2 (PCV2).The aim of this study was to describe the sybr green REAL-TIME PCR protocol used for detection of porcine circovirus type 2 and associated diseases such as PMWS is swine and wild boar in Romania.

MATERIAL AND METHODS

The tissue samples were taken from the transylvanian veterinary diagnostic centre (samples from wild boar) and from PMWS affected farms (samples from swine) located in nord-western region of Transylvania. All samples were tested by SYBR GREEN REAL-TIME PCR for the presence of PCV. Organs samples (lymph nodes, spleen, kidney, tonsile) were homogenised using the TissueLyser high-throughput disruption instrument (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer recommendations.

High-throughput RNA extractions of 100 µl of the different specimens (supernatants from organs homogenates;) were conducted on X-tractor Gene automated nucleic acid extraction robot (Corbett Robotics Pty. Ltd., Queensland, Australia) by using the Total RNA Isolation Kit, Nucleospin 96 RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 50µl of elution buffer.

PCR reactions were set up with the help of CAS-1200 Robotic Liquid Handling System (Corbett Robotics Pty. Ltd., Queensland, Australia). Real-time PCR analysis was performed on the Corbett Rotor Gene machine (Corbett Robotics Pty. Ltd., Queensland, Australia) using SYBR Green PCR core reagents kit (Bio-Rad) the MCV1 and MCV2 primer pairs (3) after the following protocol (table 1 and 2):

Table 1. The components and the quantities for one SYBR GREEN REAL-TIME PCR reaction (one sample)

Component	Volume per reaction	Final concentration
IQ SYBRGreen mix (BioRad)	12.5	1375 nM
50µM forward primer	0,5	55 nM
50µM reverse primer	0,5	55 nM
Distilated water	14,5	
cDNS	2	
Final volume	25	

Tabel 2. The primer pair and the temperature protocol used in reaction.

Primer pair	Melting	45 cycles			Elongation	Cooling
MCV1-MCV2	95°C,5 min	95°C,30 sec	52°C,30 sec	72°C,60 sec	72°C 7 min	4°C

After the PCR amplification a melting curve analyses was performed. Based on the melting curves differrent samples were further analysed.,The PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels (Q-Biogene) in the presence of 0.4µg/ml ethidium bromide.

RESULTS

Real-time PCR is an excellent diagnostic tool with high sensitivity and specificity and fast turnaround time. This system is so-called because the accumulated amplicons can be monitored directly during the DNA amplification process (Figure1). The quantitation of DNA (Figure 2) is based on the determination of the threshold cycle when the amplified PCR product is first detected.The PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels (Q-Biogene) in the presence of 0.4µg/ml ethidium bromide (Figure.3):

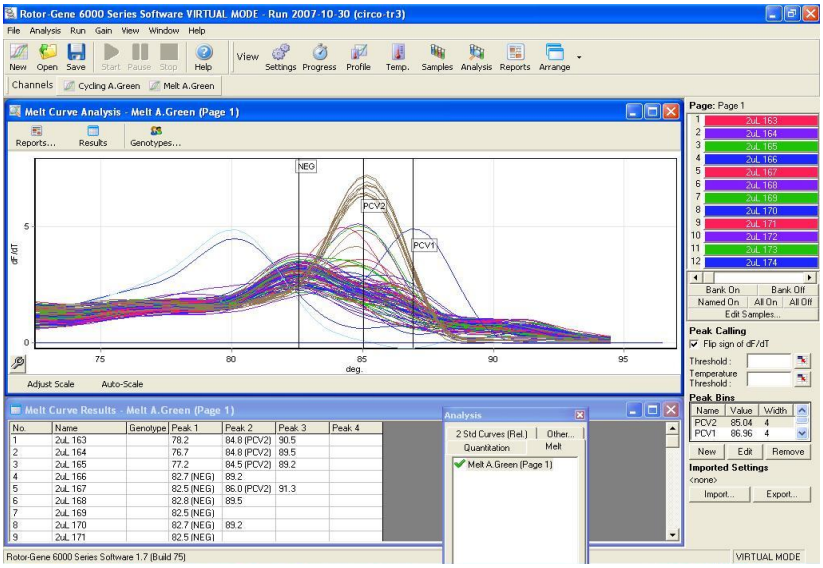


Figure 1. *The software (Corbett Robotics Pty. Ltd., Rotor-Gene Queensland, Australia) analysis of the melting curves of samples.*

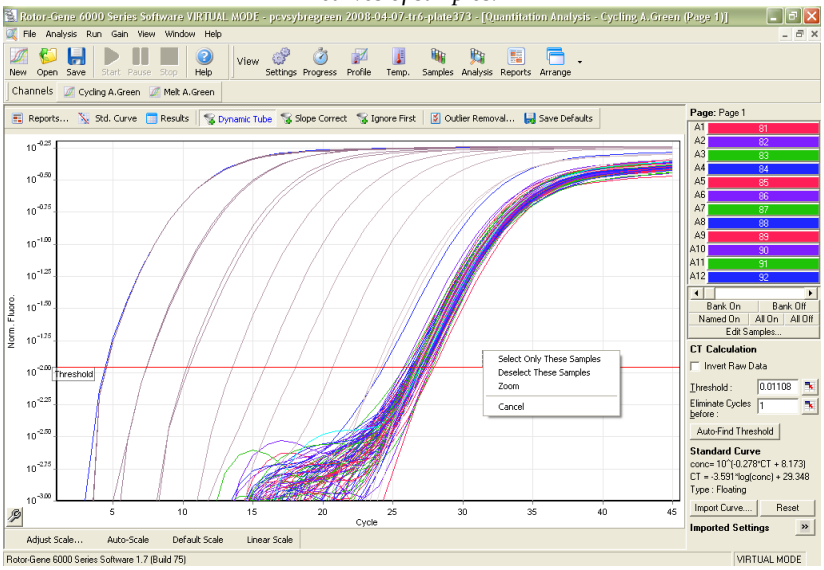


Figure 2. *The software (Corbett Robotics Pty. Ltd., Rotor-Gene Queensland, Australia) analysis of quantitation curves of samples.*

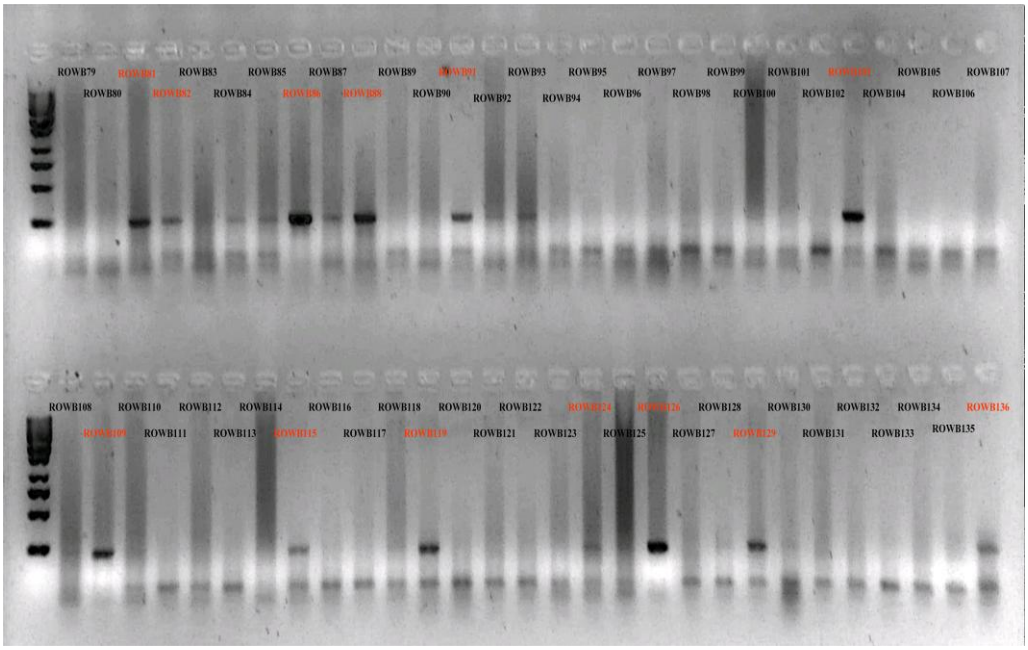


Figure 3. *Electrophoretic profiles of DNA amplicons (red markers) obtained by sybr green REAL-TIME PCR*

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The detection in our assay is based on the binding of the fluorescent dye SYBR GREEN, which binds all double stranded DNA molecules. Since this process is sequence independent, the characteristic T_m of the target is determined by performing a melting curve analysis on the PCR products to test the formationof primer-dimers and non-specific products, which compete with formation of specific PCR productsThe real-time PCR provides a broad dynamic range, detecting from 10^3 to 10^{11} copies of DNA per reaction. No cross-reactions were found in specimens containing PCV2. Because of the high sensitivity and specificity of the assay with a relatively rapid and simple procedure, real-time PCR can be used as a routine assay for the clinical diagnosis of PCV2 infection. Real-time PCR offers continuous monitoring of the PCR reaction cycle by cycle by using fluorescence.

BIBLIOGRAPHY

1. **Fenaux, M., Halbur, P.G., Gill, M., Toth, T.E., Meng, X.-J., (2000)**. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of adifferential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV- 2. Journal of Clinical Microbiology 38, 2494–2503.
2. **Hamel A. L., Lin L. L., Nayar G. P. S.: (1998)**. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72: 5262 -5267.
3. **Ilyina, T.V., Koonin, E.V., (1992)**. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eukaryotes and archaebacteria. Nucleic Acids Research 20, 3279–3285.
4. **Liu Q., Tikoo S. K., Babiuk L. A. (2001).** Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2.Virol 285: 91-99.
5. **Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G., Buhk, H.-J., (1997).** Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal of Virology* 71, 2562–2566.
6. **Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B., Soike, D., 2000**. Cloning, and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. Archives of Virology 145, 2469–2479.
7. **Meehan, B. M., McNeilly F., McNair I., Walker I., Ellis J. A., Krakowka S. Allan G. M. (2001).** Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome.*Arch Virol* 146: 1- 8
8. **Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., (2000).** Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology* 81, 2281–2287
9. **Tischer, I., H. Gelderblom, W. Vetterman, and M. A. Koch. (1982).** A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295:64–66.

CERCETĂRI PRIVIND IMUNOGENITATEA DERMATOFIŢILOR DIN GENUL *TRICHOPHYTON*

RESEARCHES REGARDING IMMUNOGENITY OF DERMATOPHYTES FROM *TRICHOPHYTON GENUS*

CĂLINA Daniela, RĂPUNTEAN Gh., FIŢ N., NADĂŞ G., CHIRILĂ F.
FMV Cluj-Napoca
calinadaniela80@yahoo.com

In this experiment we aimed: to obtain a total antigen treating with ultrasounds a vaccine strain; in order to obtain hyper immune serum in rabbits and to identify specific anti-Trichophyton antibodies in innoculated animal's serum. From Trichoben (Trichophyton verrucosum), an antigen was prepared using ultrasounds treatment, at the power of 150 V.A. Before and after the ultrasounds treatment, the vaccine was stained and sowed. The product contained 0,4g/dl total protein. Rabbits were inoculated on the abdomen sides, with increasing antigen doses; the blood collection was made from auricular vein, 7 days after each inoculation. In order to identify specific anti-Trichophyton antibodies in the inoculated animals, we used Ouchterlony technique (double radial diffusion) This reaction was made after each blood collection, plaques were read after 24 and 72 h of incubation. The synthesis of the antibodies was not observed after the first inoculation (7 days), their presence being demonstrated after the second inoculation (21 days), but only for two rabbits of the group, revealing positive reaction of low intensity after 24 and 48 hours, but intense after 72 hours. The antigen obtained after the sonication, inoculated in rabbits using a hyper-immunisation technique proved their immunogenical properties, producing specific anti-Trichophyton antibodies.

Modalităţile de apărare imună variază considerabil de la o specie la alta, ceea ce face ca mecanismele ce intervin în imunoparazitologie, să nu fie întru totul cunoscute. Întârzierea cunoaşterii (descifrării) acestor mecanisme se datoreşte următoarelor cauze: dificultatea cultivării *in vitro* a paraziţilor, cu faze diferite de dezvoltare, caracterizate prin exprimarea de determinanţi antigenici diferiţi; modularea antigenică a paraziţilor; complexitatea şi particularităţile formelor de apărare imună, care intervin în infestaţiile parazitare animalele gazdă, cu însuşirile şi modul lor de reacţionare (1,2).

Cercetările imunologice din ultimi ani au adus contribuţii importante la cunoaşterea imunogenităţii tulpinilor de *Trichophyton,* fiind produse tot mai multe vaccinuri atât cu scop preventiv dar şi curativ (4,5). Vaccinurile s-au dovedit a fi bune immunogene, fiind capabile să inducă un răspuns imun satisfăcător (3)

Prin cercetările din prezenta lucrare s-a urmărit :

- obţinerea de antigen total prin ultrasonicarea unei tulpini vaccinale cu scopul utilizării în diagnosticul imunologic;
- obţinerea unui ser hiperimun pe iepuri prin inoculare antigenului de *Trichophyton* obţinut prin ultrasonicare;
- evidenţierea anticorpilor specifici anti-*Trichophyton* din serul animalelor imunizate, prin reacţia de dublă imunodifuzie în gel de agar.

MATERIALE ŞI METODE

Antigenul este reprezentat de suspensia obţinută la sonicarea vaccinului**.** Vaccinul utilizat este *Trichoben* (Bioveta Cehia)**,** vaccin liofilizat contra tricofiţiei bovine.

Caracteristici: Vaccinul este preparat dintr-o tulpină de *Trichophyton verrucosum*, conţinând minimum 2,5 x 10^6 elemente structurale, dispersate într-un mediu liofilizat (Fig. 3.1)

Vaccinul diluat 1/10 a fost supus dezintegrării, folosind un ultrasonicator cu puterea de 150 V.A.

Înainte de a fi sonicat vaccinul a fost supus examenului bacterioscopic şi bacteriologic dar şi după fiecare moment al sonicări.

Suspensia obţinută în urma sonicării a fost apoi repartizată câte 4 ml în tuburi sterile şi apoi s-a centrifugat la 2500 turaţii/minut, timp de 15 minute. Supernatantul obţinut şi-a păstrat aspectul

iniţial şi a fost testat pentru determinarea proteinelor totale. Cantitatea de proteină totală a supernatantului a fost de 0,4g/dl.

Supernatantul obţinut s-a folosit la inocularea iepurilor şi s-a utilizat apoi ca antigen în reacţia de imunodifuzie.

S-a folosit pentru hiperimunizare un lot de 3 iepuri cu vârsta de 6 luni şi cu greutate de aproximativ 1-1,5 kg fiecare. Înainte cu 3 saptămâni de începerea experimentului iepurii au fost vaccinaţi contra mixomatozei şi bolii hemoragice a iepurelui.

Tabel 1. Protocolul de hiperimunizare

Nr. de inoculări	Doza (ml)	Calea de inoculare	Inoculare antigen (zile)	Acţiuni intreprinse
1.	1	s.c.	Ziua 0	Prelevare sânge si administrare Ag
2.			Ziua 7	Prelevare sânge
3.	2	s.c.	Ziua 14	Prelevare sânge la 7 zile si administrare Ag
4.	-	-	Ziua 21	Prelevare sânge

Inoculările s-au făcut subcutanat (pe laturile abdomenului alternând administrările, pe dreapta sau pe stânga), la fiecare inoculare.

Pentru a evita fenomenul de paralizie imunologică, s-a realizat la început (ziua 0) administrarea unei cantităţi mai mici de antigen (1 ml), iar la următoarea inoculare care s-a făcut la interval de 14 zile după prima, doza a fost dublată (tabel.1).

Probele de ser au fost prelucrate prin utilizarea dublei difuzi in gel de agar (tehnica Ouhterlony). În godeul central s-a pus antigen de cercetat (Ag vaccinal) şi apoi urmând o anumită direcţie s-au pus serurile de cercetat obţinute după fiecare recoltare de sânge

Plăcile s-au introdus în microcamere umede, pentru a împiedica uscarea agarului;interpretarea plăcilor s-a făcut în stare crudă la 24 şi 72 de ore.

REZULTATE ŞI DISCUŢI

Obţinerea antigenului din vaccinul diluat (1/10) s-a realizat folosind un ultrasonicator cu puterea de 150 V.A., cu expunere totală la acţiunea ultrasunetelor de 60 de minute, la puterea 2 a aparatului

La examinarea cu obiectivul de imersie a frotiurilor colorate Giemsa s-au evidenţiat hife subţiri, cu microconidii reduse, dispersate, şi rare macroconidii de aspect septat.

Examenul bacteriologic. Pe toate mediile de cultură (mediul Sabouraud-dextroză şi DTM) s-au dezvoltat tulpinile vaccinale, în cultură pură. La examinarea cu ochiul liber după 7 zile de la însămânţare, coloniile aveau un diametru de cca 10 mm, margini neregulate, de culoare albă (fig. 1,2).

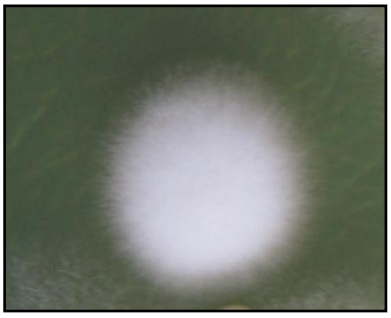


Fig. 1 Colonie de Trichophyton la7 zile pe mediul Sabouraud

Fig.2. Colonie de Trichophyton la 7 zile pe mediul DTM

La examinarea la lupă coloniile au aspectul descris mai sus, observându-se hifele subţiri, foarte fine, de culoare albă cu zona centrală mai densă

Ultrasonicarea vaccinului la puterea a doua a aparatului şi expunerea de 60 minute a fost suficientă pentru distrugerea totală a hifelor.

Supernatantul obţinut şi-a păstrat aspectul iniţial; proteină totală a supernatantului a fost de 0,4g/dl

În urma inocularii ultrasonicatului obţinut nu s-au observat reacţii locale şi generale.

Prin prelucrarea probelor recoltate de la iepurii imunizaţi s-au obţinut la dubla imunodifuzie următoarele rezultate, prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Rezultate obţinute la imunodifuzie

Antigen Trichoben						
Număr iepure inoculat	**Probe ser înainte de inoculare**		**Probe ser după prima inoculare**		**Probe ser după a doua inoculare**	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
1	-	-	-	-	±	+
2	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-

După prima inoculare nu s-au putut evidenţia anticorpi la reacţia de imunodifuzie în gel de agar. Aceasta presupune fie lipsa anticorpilor, fie că se găsesc în cantităţi foarte reduse, nedecelabile prin reacţia de imunodifuzie.

Sinteza imunoglobulinelor a fost demonstrată după primele 2 inoculări, numai la doi iepuri din lot, constatându-se apariţia linilor de precipitare slab conturate la citirea la 24 h. La 72h linile de precipitare observate au fost mult mai evidente faţă de cele de la 24h.

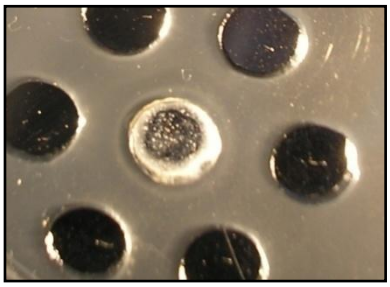


Fig.3 Dubla difuzie în gel de agar aspect la 24 ore

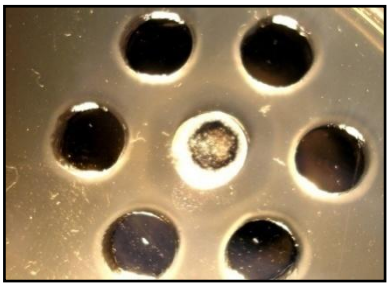


Fig. 4 Dubla difuzie în gel de agar aspect la 72h

Ţinând seama de timpul scurs de la administrarea vaccinului şi până la efectuarea reacţiei, apreciem că anticorpii produşi fac parte din clasa IgG, iar prin faptul că s-au evidenţiat prin difuziune in gel, că aceştia fac parte din Ac precipitanţi.

CONCLUZII

1. Antigenul obţinut prin sonicare, inoculat la iepuri, după un protocol de hiperimunizare propriu, s-a dovedit a fi un bun imunogen. Iepurii au suportat bine preparatul inoculat (aseptizat cu formol) şi au răspuns prin sinteza de anticorpi.
2. Sinteza imunoglobulinelor a fost demonstrată după primele 2 inoculări (21 zile), numai la doi iepuri din lot, consecutiv administrării secundare de antigen, serul s-a îmbogăţit în imunoglobuline atât calitativ cât şi cantitativ, aspect demonstrat de faptul că s-au obţinut linii de precipitare clare la 72 h.
3. 3.Apariţia linilor de precipitare în serul iepurilor semnifică activarea unor clone limfocitare specifice, având ca rezultat formarea mai multor clase de imunoglobuline.

BIBLIOGRAFIE

1. 1.CHERMETTE R., BUSSIERAS J., 1993, Parazitologie veterinaire: Mycologie, Service de Parazitologie, Ecole National Veterinaire d'Alfort.
2. GUDDING R., NAESS B., AAMODT O**.,** 1991, Immunisation against ringworm in cattle, National Veterinary Institute , Oslo, Norway, Vet Rec., 128, (4), 84-85.
3. KOCIK T**.,** 1982, Evaluation of the immunogenic properties of live and killed vaccines against trichophytosis of guinea pigs and calves, Pol Arch Weter, 23(3), 95-107.
4. LUND A., BRATBERG AM., SOLBAKK IT., 2001, In vitro release of interferon- gamma by trichophytin-stimulated whole blood cell cultures from ringworm-vaccinated and control calves experimentally inoculated with *Trichophyton verrucosum*, Vet. Dermatol., 12, (2), 75-80.
5. RYBNIKAR A., VRZAL V., CHUMELA J., 1991, The minimal effective dose of vaccine against *trichophytosis* in heifers, Bioveta, Ivanovice na Hane, Vet Med 36, (10), 593-597.

CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ŞI ANATOMOCLINICE ÎNTR-UN FOCAR DE REOVIROZĂ LA PUII DE CARNE

EPIDEMIOLOGICAL AND MORPHOCLINICAL INVESTIGATIONS IN A REOVIROSIS OUTBREAK IN BROILERS

CĂTANĂ N.[1*], POPA Virgilia[2], BUCUR E.[2], FODOR Ionica[1]
[1]FMV Timişoara
[2]S.N. Institutul "Pasteur" S.A.

In this paper are presented the results of epidemiological, morphoclinical and laboratory investigations conducted in a flock of broilers in which the two syndromes of avian reovirosis have occurred.

For confirming the diagnosis, epidemiological, morphoclinical, histological and serological (ELISA) investigations have been performed.

The epidemiological investigation has shown that reovirosis was present only at the respective generation of broilers, and that the disease was transmited verticaly, through infected eggs from parents, other sources of infection were less probable.

The cummulative death, calculated weekly for the broilers in the two pens, reached maximum values in the 4th and 5th weeks of life. At the end of the growing period the cummulative death was of 23,69% in pen A and 25,17% in pen B.

The characteristic signs for the malabsorbtion syndrome have occurred after the age of 7 days, and were well expressed until the age of 3 weeks, while the characteristic signs for the artritis-tenosinovitis syndrome have occurred after the age of 12 days.

The lesions discovered at the necropsy were characteristic for the two syndromes. In the malabsorbtion syndrome, the histological lesions present in the bursa of Fabricius showed the presence of an immune response.

The evolution of the post infectious antibody titres has relieved the seroconversion phenomena, characteristic for a postinfectious immune response.

At the first sampling, respectively at the age of 23 days of life, 64,58% of the examinated samples were positive, and at the second sampling, at the age of 37 days of life, 88,22% of the samples were positive.

Reovirusurile aviare produc, la puii de găină şi curcă, mai multe boli, cu localizări diferite, cum sunt: artrita-tenosinovita virală, sindromul de malabsorbţie, infecţii respiratorii, infecţii enterice şi stări de imunosupresie (3, 5, 7).

Infecţiile cu reovirusuri sunt foarte frecvente în avicultura intensivă şi se răspândesc la scară mondială datorită comerţului cu material avicol. Produc pagube economice importante prin mortalitate, diminuarea producţiilor de carne şi ouă, stări de imunosupresie şi cheltuieli cu profilaxia şi combaterea (3, 5, 7).

OLSON şi col., în anul 1957, descriu, la puii de găină, artrite şi sinovite, DALTON şi HENRY introduc termenul de tenosinovită, în anul 1967, pentru denumirea acestor afecţiuni, iar în anul 1972, WALKER şi col. confirmă că agentul etiologic este un reovirus aviar (5).

Mult mai târziu, KOUWENHOVEN, în Olanda, în anul 1978, descrie la puii de carne o formă clinică cu localizare digestivă sub denumirea de "runting syndrome". Ulterior, acest sindrom, este semnalat în mai multe ţări, sub diverse denumiri, însă VELTMANN şi col., în anul 1985, propun denumirea de "malabsorbtion syndrome", care a fost acceptată ca denumire oficială (3).

În această lucrare sunt prezentate rezultatele investigaţiilor epidemiologice, anatomoclinice şi de laborator, efectuate într-un efectiv de pui de carne în care au evoluat cele două forme clinice.

MATERIALE ŞI METODE

Într-o fermă avicolă din judeţul Timiş, la o serie de pui de carne, proveniţi din import, au fost semnalate pierderi prin mortalitate, reducerea sporului şi simptome diferite.

În fermă au fost efectuate examene epidemiologice, clinice şi anatomopatologice, iar pentru confirmare au fost efectuate examene bacteriologice, serologice şi histopatologice.

Examenele anatomopatologice au fost efectuate bisăptămânal, fiind prelevate probe de organe pentru examenele histopatologice şi bacteriologice. Examenele histopatologice au fost

efectuate după metodologia clasică, secţiunile fiind colorate cu hematoxilină-eozină, iar pentru examenele bacteriologice au fost făcute însămânţări din os.

Pentru examenul serologic, respectiv testul ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay) au fost prelevate de la pui 48 probe de sânge la vârsta de 23 de zile şi 45 probe de sânge, la vârsta de 37 de zile. Pentru efectuarea testului a fost utilizat kitul IDEXX (Avian Reovirus Antibody).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Investigaţiile efectuate în ferma avicolă au furnizat rezultate importante privind evoluţia reovirozei la puii de carne, cu cele două forme clinice, respectiv artrita-tenosinovita şi sindromul de malabsorbţie.

Examenul epidemiologic, efectuat sub forma anchetei epidemiologice, a urmărit: identificarea sursei de infecţie, depistarea factorilor favorizanţi, pierderile prin mortalitate şi sporul în greutate.

Puii din seria respectivă (12.600) au fost crescuţi la sol, în două adăposturi, câte 6.300 de pui în fiecare adăpost. Furajele administrate au corespuns calitativ şi cantitativ, însă condiţiile de igienă au fost deficitare, principalii parametrii (umiditate, curenţi de aer, amoniac, NTGMA şi coliformi) fiind peste limitele admise.

Ancheta epidemiologică a evidenţiat că reoviroza a fost prezentă numai la seria respectivă de pui, boala fiind consecinţa transmiterii verticale, prin ouă infectate, de la părinţi, fiind excluse alte surse de infecţie.

Pierderile exprimate prin mortalitatea cumulativă sunt redate în tabelul nr. 1. Mortalitatea cumulativă, calculată săptămânal, pentru puii din cele două adăposturi, a avut valori maxime în săptămâna a IV-a şi a V-a. La finalul perioadei de creştere mortalitatea cumulativă a fost de 23,69 % în adăpostul A şi de 25,17 % în adăpostul B. Aceste valori corespund datelor din literatură, majoritatea autorilor consideră că în reoviroza puilor de carne, mortalitatea cumulativă depăşeşte 20 % (1, 3, 5).

Sporul în greutate stabilit prin cântăriri săptămânale a evidenţiat o conversie mai redusă a furajului. Astfel, greutatea medie a fost cu 35 % mai mică faţă de greutatea standard a hibridului respectiv, iar durata de creştere a fost mai mare cu aproximativ două săptămâni. Evoluţia sporului în greutate este consecinţa sindromului de malabsorbţie, în literatura de specialitate menţionându-se că sporul în greutate poate fi redus cu 25-66 % (3, 5).

Examenul clinic. Simptomele specifice sindromului de malabsorbţie au apărut după vârsta de 7 zile, fiind bine exprimate până la 3 săptămâni. În primul rând a fost remarcată o neuniformitate accentuată a puilor, sugerând existenţa unor pui de vârste diferite. Alte simptome semnalate au fost: diaree, apetit capricios, consum mai mare de apă, adinamie şi păstrarea pufului. După vârsta de 3 săptămâni au fost foarte evidente modificările penelor de la aripi. Acestea au crescut şi s-au orientat lateral sau în sus, fiind caracteristice “puilor helicopter”. Ulterior au apărut şi simptomele altor boli (colisepticemie şi micoplasmoză) consecutive stării de imunosupresie.

Simptomele specifice sindromului de artrită-tenosivită au fost reprezentate de: mers dificil, şchiopături şi artrite ale articulaţiilor tibio-tarsiene şi tarso-metatarsiene.

Examenul anatomopatologic a evidenţiat leziuni caracteristice celor două forme clinice.

În cazul sindromului de malabsorbţie au fost evidenţiate următoarele leziuni macroscopice: pene deformate, oase reduse în dezvoltare, deformarea coastelor, necroza capului femural şi mărirea în volum a proventriculului.

Prin examenul histopatologic au fost evidenţiate leziuni microscopice la mai multe organe. Astfel, la proventricul a fost absentă delimitarea dintre acest organ, esofag şi stomacul muscular şi s-a evidenţiat o hiperplazie limfoidă interstiţială. La intestinul subţire a fost prezentă enterita catarală cu vilozităţi inegale, exfolierea vilozităţilor şi infiltraţii cu limfoblaşti, limfocite mici şi histiocite în submucoasă. La ficat s-a evidenţiat: edemul spaţiului Disse, tumefacţia hepatocitelor, distrofie vacuolară, infiltraţii limfocitare şi hipertrofia şi hiperplazia celulelor Kupffer. În splină au fost evidenţiaţi noduli limfoizi cu coroană limfocitară mediu dezvoltată, proliferare reticulohistiocitară şi dilataţia sinusurilor subcapsulare cu splenocite în lumen.

În bursa Fabricius au fost identificate următoarele leziuni: foliculi bursali de dimensiuni mici, mediu dezvoltaţi, edem interstiţial, un număr mare de bursocite în cortexul folicular, un număr mic de macrofage, proliferări cu limfoblaste şi prezenţa de mitoze.

Modificările histologice prezente în splină şi bursa Fabricius evidenţiază instalarea unui răspuns de intensitate medie, semnalat şi de alţi autori (5, 6).

În sindromul de artrită-tenosinovită au fost evidentiate următoarele leziuni macroscopice: edemaţierea tecilor extensorilor metatarsiali şi ale flexorilor digitali, ruperea tendoanelor gastrocnemienilor şi artrite serofibrinoase.

Examenul serologic. Pe graficul nr. 1 sunt prezentate mediile geometrice ale titrurilor anticorpilor antireovirus exprimate în densităţi optice. Evoluţia acestor medii semnalează fenomenul de seroconversie, caracteristic răspunsului imun postinfecţios, evidenţiat histologic la bursa Fabricius şi la splină.

La recoltarea I-a, respectiv la vârsta de 23 de zile, 64,58 % din probele examinate au fost pozitive, iar la recoltarea a II-a, respectiv la vârsta de 37 de zile, 82,22 % din probe au fost pozitive. Aceste rezultate confirmă infecţia verticală dar şi extinderea orizontală a bolii, prin contact direct sau indirect.

Rezultatele examenului serologic au confirmat prezenţa celor două forme clinice ale infecţiei cu reovirus, suspicionate prin examenele anatomoclinice.

Valorile titrurilor anticorpilor antireovirus, exprimate în D.O., sunt asemănătoare cu valorile semnalate şi de alţi autori (1, 2), fiind caracteristice acestor infecţii.

De la cadavre, prin examenele bacteriologice, au fost izolate tulpini de *E. coli* şi de *P. aeruginosa*, frecvenţa izolării fiind corelată cu prezenţa leziunilor de colisepticemie şi de pseudomonoză. Infecţiile bacteriene secundare au fost consecinţa stărilor de imunosupresie produse de către reovirusul aviar.

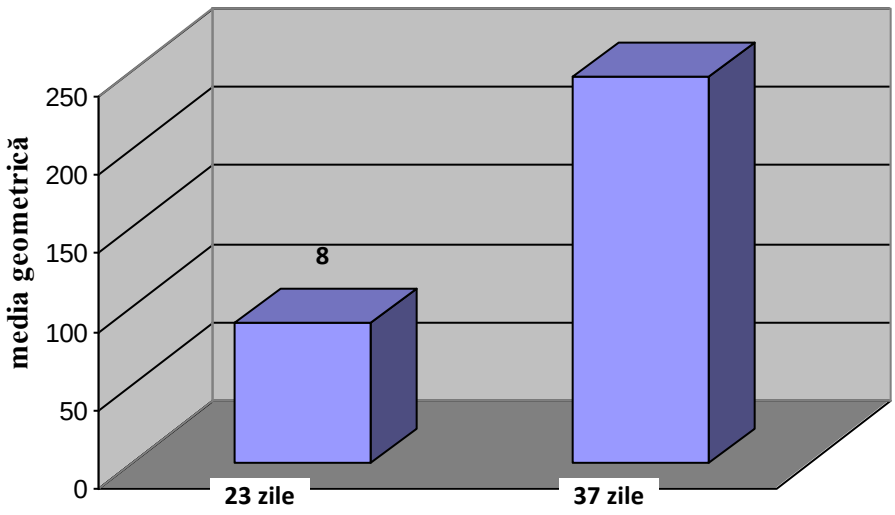
CONCLUZII

- Prin examenele epidemiologic, clinic şi anatomopatologic s-a suspicionat prezenţa celor două forme clinice ale reovirozei aviare la o serie de pui de carne.
- Infecţia cu reovirus a fost consecinţa transmiterii verticale prin ouă infectate, iar, ulterior, de la puii infectaţi virusul s-a transmis şi orizontal.
- Prezenţa unor factori favorizanţi a agravat evoluţia reovirozei, fiind frecvente şi infecţiile bacteriene secundare.
- Simptomele şi leziunile anatomopatologice au fost caracteristice sindromului de malabsorbţie şi artritei-tenosinovitei produse de reovirusul aviar.
- Examenul serologic efectuat prin testul ELISA a confirmat boala şi a evidenţiat seroconversia caracteristică răspunsului imun postinfecţios.

Tabelul nr. 1

Evoluţia mortalităţii cumulative

Săptămâna	**Adăpostul A**		**Adăpostul B**	
	Nr. pui morţi	**%**	**Nr. pui morţi**	**%**
I	193	3,60	201	**3,19**
II	233	4,70	253	**4,02**
III	231	3,66	251	**4,00**
IV	292	4,63	303	**4,81**
V	301	4,78	315	**5,00**
VI	243	3,86	263	**4,17**
Total	**1.493**	**23,69**	**1.586**	**25,17**



Graficul 1
Media titrurilor exprimată în D.O.

BIBLIOGRAFIE

1. **CĂTANĂ, N., HERMAN, V., ORLIC, D., ŢIBRU, I., FODOR IONICA** – Studiu epidemiologic într-un focar de reoviroză la puii de carne, Lucr. Şt., Med. Vet., Vol. XXXVII, 493 – 496, Timişoara, 2004
2. **GEORGIEVA, M. V., JAMBAZOVA, N.** – Serological surveys on broiler breeder flocks for antibodies against chicken infectious anaemia virus and avian reoviruses, Zhivotnov'dni Nauki, 40, 6, Sofia, 84 – 86, 2003
3. **JONES, R. C.** – Other Reovirus Infections în Diseases of Poultry, 11th Edition, Editor-in-Chief Saif, Y. M., Blackwell Publishing, 293 – 298, 2003
4. **RAJESH SINGH, AGRAWAL, D. K., CHAUHAN, R. S.** – Pathomorphological changes in tissues of stunted chickens experimentally infected with avian reovirus, Indian Journal of Veterinary Pathology, 29, 1, Izatnagar, 1 – 3, 2005
5. **ROSENBERGER, J. K.** – Viral arthritis, în Diseases of Poultry, 11th Edition, Editor-in-Chief Saif, Y. M., Blackwell Publishing, 284 – 293, 2003
6. **SPACKMAN, E., PANTIN-JACKWOOD, M., DAY, J. M., SELLERS, H.** – The pathogenesis of turkey origin reoviruses in turkeys and chickens, Avian Pathology, 34, 4, 291 – 296, 2005
7. **ŢOGOE, I.** – Infecţii produse de virusurile din genul Orthoreovirus, în Boli virotice şi prionice ale animalelor, sub redacţia Moga Mânzat, R., Ed. Brumar, Timişoara, 509 – 512, 2005

APRECIEREA CLINICĂ ŞI PARACLINICĂ A VALORII REPRODUCTIVE A ARMĂSARILOR

CLINICAL AND LABORATORY EVALUATION OF STALLION REPRODUCTIVE VALUE

CĂTANĂ R., GROZA I., MORAR I., VLASIU Teodora, CĂTANĂ Laura
FMV Cluj-Napoca
vikingligrveldivet@yahoo.com

The aim of this paper was to reach the following objectives: macroscopic and microscopic assay of stallion semen destined for cryopreservation, assessment of viability and morphology of spermatozoa using two staining methods (intravital with eosin and Spermac® - MiniTub™) and comparative evaluation of the results for the two staining methods. (2) The samples were collected from ten clinically healthy stallions 5 to 10 years of age, of different breeds. Semen has been macroscopically evaluated, determining the volume, color, smell and viscosity. Microscopic evaluation consisted of determining motility, viability, density, concentration and

total spermcells number, as well as normal or pathologic morphology description of spermatozoa (using the two staining methods). (2,6) The following conclusions can be drawn from our research: the volume of collected semen varied between 40 and 150 ml, motility varied between 50 and 90%, only the samples above 70% being suitable for cryopreservation. (1) There was no direct correlation between the volume of the ejaculate and the total number of spermatozoa from the ejaculate. Citomorphologically, the stallions considered for the study showed a high level of homogenity. Even though the eosin stain is preferable for differentiating living from dead spermatozoa, Spermac® stain allows a more accurate morphologic evaluation.

Deşi amploarea inseminărilor arficiale la animale în România nu este neglijabilă, în privinţa cabalinelor aceste practici se află doar în stadiul de debut, puţini fiind cei care le cunosc şi le aplică. (8, 10) Chiar dacă recoltarea materialului seminal prin salt pe o iapă în călduri este, din punct de vedere al necesarului de dotări, cea mai accesibilă metodă, ea nu este întotdeauna cea mai facilă (4,5), nefiind deloc exclusă posibilitatea accidentelor care pot duce la compromiterea reproducătorului mascul şi/sau la alte consecinţe de nedorit. (3,7) Nu este mai puţin adevărat că aplicarea acestei tehnici necesită o oarecare dotare, pe lângă obişnuirea armăsarului, aspecte care trebuie să fie motivate prin evidenţierea eficacităţii metodei. (9)

Astfel, ne-am propus să studiem eventualele diferenţe atât între aplicabilitatea celor două metode cât şi cele referitoare la calitatea materialului seminal obţinut prin acestea.

MATERIAL ŞI METODĂ

Probele de material seminal au fost prelevate de la un efectiv de zece armăsari, cu vârste cuprinse între 6 şi 11 ani, sănătoşi din punct de vedere clinic (Tabelul 1).

Tabel 1: Armăsarii luaţi în studiu

Nr crt	Identificare Nume	Rasa	Vârsta (ani)	Provenienţa
1	Roibu	Semigreu (Izvin)	7	SDE (ferma Jucu)
2	Schiheder	FNS	10	SDE (ferma Jucu)
3	Centurion	Oldenburg	7	TSHC (ferma Jucu)
4	Bolero	Oldenburg	7	TSHC (ferma Jucu)
5	Capital	Oldenburg	6	TSHC (ferma Jucu)
6	Bodyguard	Oldenburg	7	TSHC (ferma Jucu)
7	Colorado	Oldenburg	6	TSHC (ferma Jucu)
8	Pablo	Semigreu Beclean	9	Herghelia Beclean
9	Glumeţ	Semigreu Beclean	10	Herghelia Beclean
10	Siglavy	Lipiţan murg	11	Herghelia Beclean

Examenul clinic obiectiv al aparatului reproducător precum şi rezultatele examenelor de laborator au fost consemnate în fişe andrologice individuale, concepute după următorul model:

FIŞA ANDROLOGICĂ nr. _____

Nume: _____ Rasa: _____ Vârstă: ____ Identificare CIP: _____
Culoare şi semne particulare: _____

Sistemul de montă (naturală, artificială, mixtă): _____

Examenul clinic

Constituţie: _____ Conformaţie: _____
Starea de întreţinere: _____ Temperament: _____
Inspecţia şi palpaţia organelor genitale:
Scrot: _____
Testicule: _____
Epididim: _____
Cordon testicular: _____
Furou: _____
Penis: _____

Reflexele sexuale

Apropiere	Erecţie	Salt	Intromisiune	Ejaculare

Spermograma

Examen macroscopic			Examen microscopic						
volum (ml)	culoare	miros	densitate (sperm./ml)	mobilitate	spermat. vii (col. intrav.)	ex. morfologic			
						Normali		anormali	
						Eoz.	Sp.	Eoz.	Sp.

Legendă: sperm./ml = spermatozoizi/ml spermă; col. intrav. = coloraţia intravitală cu eozină; eoz. = rezultatele coloraţiei intravitale cu eozină, exprimate procentual; sp. = rezultatele coloraţiei Spermac®, exprimate procentual;

Recoltarea probelor de material seminal s-a făcut prin două metode, ambele utilizând vagina artificială tip CSU, prin salt pe o iapă în călduri şi prin salt pe iapa manechin (fantomă).

Materialul seminal a fost supus examinării macroscopice**, prin determinarea volumului, culorii, mirosului şi vâscozităţii.**

Aprecierea microscopică a urmărit determinarea mobilităţii, procentului de spermatozizi vii, concentraţiei şi numărului total de spermatozoizi/ ejaculat.

Fig.1: Aparatul SpermaCue® (MiniTüb™)

Mobilitatea a fost apreciată în preparat nativ, probele primind calificative de la 0,1 la 0,9.

Concentraţia în spermatozoizi a materialului seminal s-a apreciat utilizând metoda fotometrică, cu ajutorul fotocolorimetrului SpermaCue® (MiniTüb™) (Fig. 1).

De asemenea, au fost stabilite procentele de anomalii, prin efectuarea de frotiuri colorate prin două metode: Handcook- Dott (cu eozină fig. 2 şi 3) şi Spermac® (Fig. 4 şi 5). Citomorfometria s-a practicat în urma colorării prin metoda Spermac® (MiniTüb™), prin microscopie optică şi cu ajutorul software-ului Motic®.

Fig.2: Spermatozoizi vii (eozină, 100x)

Fig.3: Spermatozoid mort (eozină, 100x)

Fig.4: Coloraţie Spermac® (40x)

Fig.5: Coloraţie Spermac®(100x): cap dublu

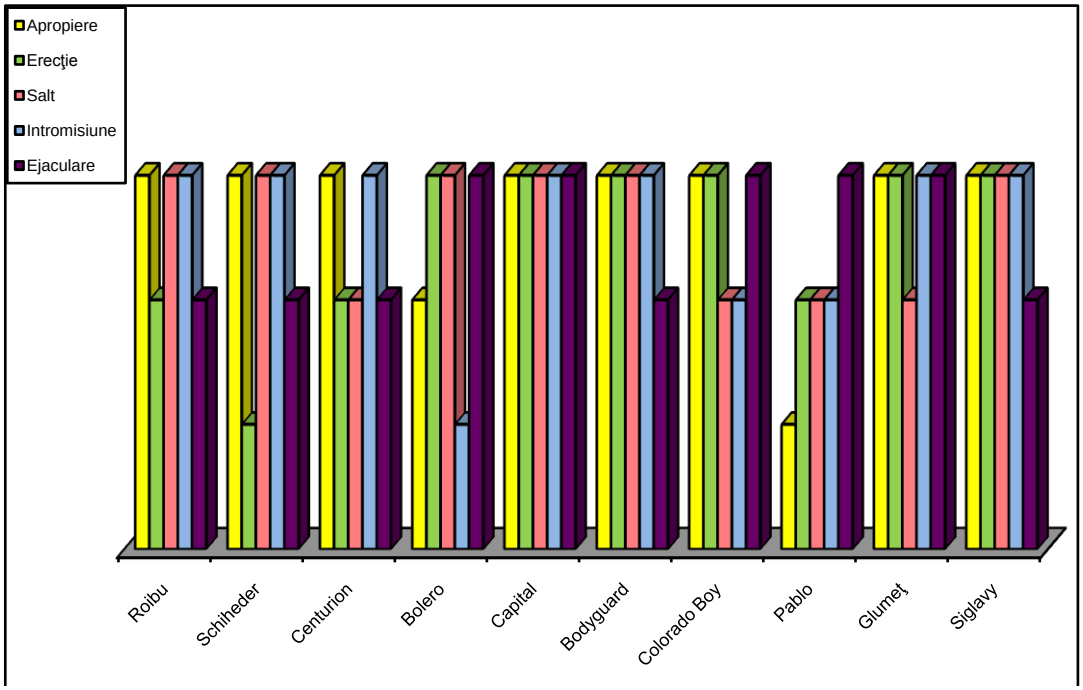
REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma aprecierii reflexelor sexuale de apropiere, erecţie, salt, intromisiune şi ejaculare, s-a constatat faptul că în marea lor majoritate acestea s-au manifestat cu o intensitate crescută (rapid), indiferent de metoda prin care s-a realizat recoltarea (Tabel 2, Grafic 1).

Tabel 2: Intensitatea manifestării reflexelor şi numărul de salturi

Nr	**Identificare**	**Apr.**	**Er.**	**Salt**			**Intr.**	**Ej.**
					I.C.	**M.**		
1	Roibu	R	M	R	-	1	R	M
2	Schiheder	R	L	R	-	1	R	M
3	Centurion	R	M	M	2	-	R	M
4	Bolero	M	R	R	2	-	L	R
5	Capital	R	R	R	-	1	R	R
6	Bodyguard	R	R	R	2	-	R	M
7	Colorado Boy	R	R	M	-	1	M	R
8	Pablo	L	M	M	-	2	M	R
9	Glumeţ	R	R	M	1	-	R	R
10	Siglavy 14-100	R	R	R	-	1	R	M

Legendă: Apr.: reflexul de apropiere; Er.: erecţie; I.C.: număr de salturi pe iapa în călduri; M.: număr de salturi pe iapa manechin; Intr.: intromisiune; Ej.: ejaculare; R: rapid; M: mediu; L: lent; -: nu s-a efectuat



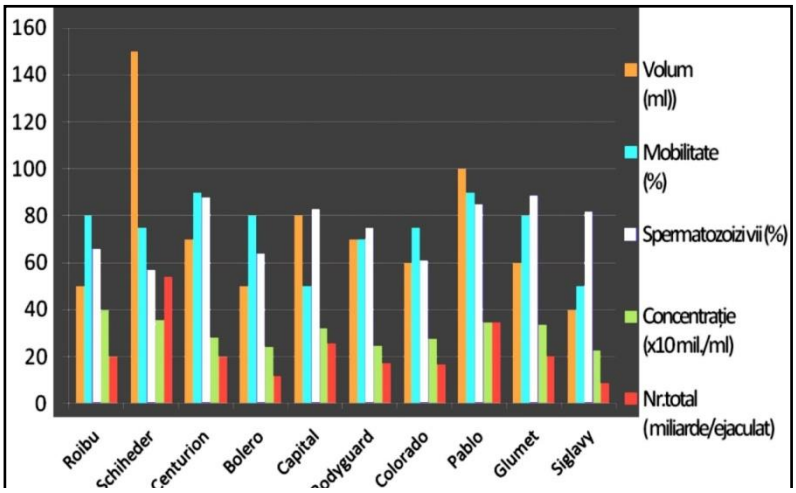
Grafic 1: Intensitatea manifestărilor reflexelor sexuale

Variațiile volumului de material seminal luat în analiză au avut limite foarte largi, la fel ca şi ceilalţi parametri studiaţi, încadrându-se, totuşi, în limitele fiziologice (cu excepția armăsarilor Capital şi Siglavy, al căror material seminal a prezentat mobilitate redusă, de 50%).

Tabel nr. 3: Tabel sintetic cu rezultatele obţinute şi interpretările valorilor

Armăsar	**Vol. (ml)**		**Mobilitate (%)**		**Spermat. vii (%)**		**Concentr. ($x10^6$/ml)**		**Nr.total ($x10^9$/ejaculat)**		**Anomalii (%)** (coloraţie intravitală)	**Anomalii (%)** (coloraţie Spermac)
	V.o	**Int.**	**V.o.**	**Int.**	**V.o.**	**Int.**	**V.o.**	**Int.**	**V.o.**	**Int.**		
Roibu	50	n	80	n	66	n	400	n	20	↑	6	9
Schiheder	150	n	70-80	n	57	↓	360	n	54	↑	5	5
Centurion	70	n	90	n	88	n	285	n	19,95	↑	6	7
Bolero	50	n	80	n	64	n	243	n	12,15	↑	6	8
Capital	80	n	50	↓	83	n	322	n	25,76	↑	5	7
Bodyguard	70	n	70	n	75	n	250	n	17,5	↑	6	9
Colorado	60	n	70-80	n	61	n	280	n	16,8	↑	4	6
Pablo	100	n	90	n	85	n	350	n	35	↑	7	9
Glumet	60	n	80	n	89	n	340	n	20,4	↑	8	10
Siglavy	40	n	50	↓	82	n	228	n	9,12	n	7	9

Legendă: V. o. = valoarea obţinută; Int. = interpretarea valorilor consemnate; n = valori normale (care permit efectuarea crioconservării) ↓ = valori subnormale (crioconservarea este contraindicată); ↑ = valori crescute (crioconservarea este posibilă).

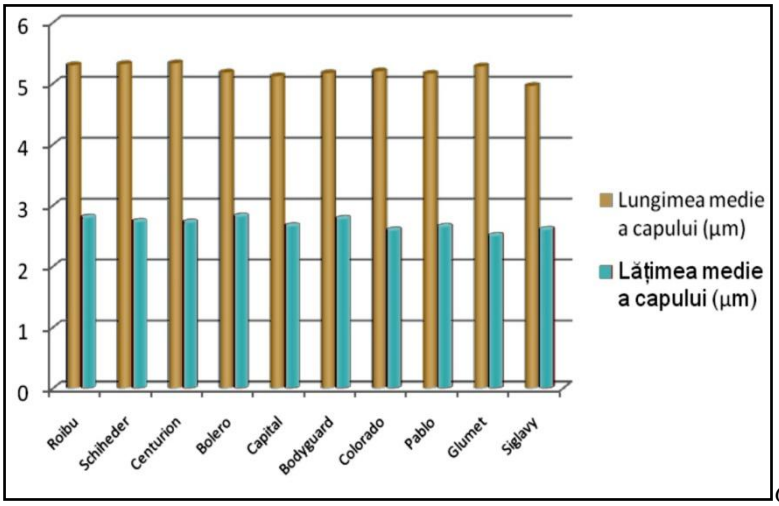


Grafic 2: Variaţiile unor parametri investigaţi în eşantion

Din punct de vedere al dimensiunilor medii ale spermatozoizilor, variațiile lungimilor (4,96-5,33 µm) şi lățimilor (2,50- 2,82 µm) capurilor spermatozoizilor tuturor celor 10 armăsari luați în studiu s-au încadrat în limite normale.

Tabel 4: Citomorfometria în eşantion

Provenienţa probei	**Lungimea medie a capului (µm)**	**Lăţimea medie a capului (µm)**
Roibu	5,3	2,8
Schiheder	5,32	2,73
Centurion	5,33	2,72
Bolero	5,18	2,82
Capital	5,12	2,66
Bodyguard	5,17	2,78
Colorado	5,2	2,59
Pablo	5,16	2,65
Glumet	5,28	2,5
Siglavy	4,96	2,6



Grafic 3: Variaţiile citomorfometrice în eşantionul studiat

Din graficul de mai sus reiese faptul că nu există o corelație directă între lungimea şi lățimea capului spermatozoizilor, în sensul că, dacă lungimea maximă (5,33 µm) a fost înregistrată în cazul armăsarului Centurion, valoarea maximă a lățimii a caracterizat spermatozoizii proveniți de la Bolero (2,82 µm).

Similar s-au comportat şi valorile citomorfometrice minime: dacă minima lungimii a aparţinut armăsarului Siglavy (4,96µm), lăţimea cea mai mică (2,50µm) s-a înregistrat pentru Glumet.

CONCLUZII ŞI RECOMANDĂRI

Din cercetările efectuate în sezonul de montă al anului 2008, pe un număr de 10 armăsari de diferite rase şi vârste se desprind următoarele concluzii:

- Volumul materialului seminal obţinut a variat între 40 şi 150 ml, fiind în limite normale la majoritatea armăsarilor, cu excepţia armăsarului Siglavy, la care, din acest punct de vedere, nu se pretează crioconservării;
- Având în vedere faptul că, pentru procesarea materialului seminal în vederea congelării, se impune o mobilitate de minimum 70 %, doar 8 din probe au fost corespunzătoare pentru crioconservare, mobilitatea acestora variind între 50 şi 90%;
- Concentraţia spermatozoizilor a variat în limite largi (de la 228 până la 400 x 10^6/ml);
- Numărul total de spermatozoizi din ejaculat a variat între 9,12 şi 54 x 10^9;
- Nu au existat corelaţii directe între volumul ejaculatului şi numărul total de spermatozoizi din ejaculat;
- Valorile citomorfometrice ale spermatozoizilor armăsarilor testaţi s-au încadrat între limite foarte apropiate, creându-se, astfel, o omogenitate a indivizilor;
- Între cele două metode de recoltare a materialului seminal nu există diferenţe referitoare la intensitatea manifestării reflexelor sexuale şi nici referitoare la calitatea materialului seminal obţinut;
- Recomandăm recoltarea materialului seminal cu ajutorul iepelor manechin datorită utilizării mai facile, necesităţii unui număr mai redus de salturi pentru un ejaculat precum şi pentru evitarea riscurilor de apariţie a accidentelor posibile la recoltarea pe iapa în călduri;
- Referitor la metodele de apreciere microscopică a materialului seminal, recomandăm ambele metode de colorare;
- Recomandăm practicarea metodei fotocolorimetrice pentru determinarea concentraţiei, având în vedere timpul de lucru redus.

BIBLIOGRAFIE

1. Bogdan, L.M. 2001; Reproducţie, obstretică, terapie şi însămânţări artificiale la animale, Editura Academic Press, Cluj-Napoca;
2. Cătană, R., I. Groza, I. Morar, 2006: The Evolution of Stallion Spermatozoa Characteristics After Cryopreservation (Buletinul USAMV-CN, 63/2006, p 545);
3. Crabo, Bo G., 2001: Physiological Aspects of Stallion Semen Cryopreservation, Cave Creek, University Minnesota-AAEP;
4. Devireddy R.V., Swanlund D.J., Olin T., Vincente W., Troedsson M.H.T., Bischof J.C., Roberts K.P.,2002: Cryopreservation of equine sperm: obtional cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry-Biol Reprod, January 1;66(1):222-231;
5. Eddy, E.M., 1990: The spermatozoon- Phisiology of Reproduction. New York, Raven Press,pp.106-182;
6. Groza, I., Mircea Muntean, 2002: Elemente de fiziologia reproducţiei la animale, Editura Academic Press; Cluj-Napoca;
7. Groza, I. , I. Morar, 2004: Andrologie veterinară, Editura Gryphon, Braşov;
8. Groza, I., L. Bogdan, R. Cătană, M. Cenariu, Simona Ciupe, D. D. Ciupercescu, I. Morar, M. Muntean, A. Pop, Brînduşa Stegeran, 2006- Ginecologie, andrologie şi obstetrică veterinară: compendiu, Editura Academiei Române, Bucureşti;
9. Juhász J., Nagy P., Kulcsár M., Huszenicza Gy. , 2000: Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review-Acta Vet. Brno,69:247-259;
10. Morar, I., I. Groza, L. Bogdan, Simona Ciupe, R. Cătană, M. Cenariu, 2005- Researches concerning the evaluation of stallion semen for cryopreservation (Buletinul USAMV-CN, 62,/2005, p 645).

INFLUENȚA SISTEMULUI DE ÎNTREȚINERE ASUPRA UNOR INDICATORI BIOCHIMICI DIN PLASMA SANGVNĂ LA GĂINILE OUĂTOARE

CHIRILĂ D.
FMV Timişoara

The aim of this study was to compare biochemical indicators of blood plasma of laying hens housed in two different housing systems (conventional cage system and deep litter system). In each housing system, 2500 ISA Brown laying hens were observed during the laying period from week 17 to 25 of age. Blood samples for determination of biochemical indicators in plasma were collected during this period in week 17 and 25. Indicators of blood plasma metabolic profile of laying hens of all monitored groups during the laying period ranged in intervals stated for healthy animals. In some cases, significant differences between housing systems were found, however, these differences do not give clear evidence of the influence of the housing system on the health of animals. The differences were apparently due to different efficiency of each group during the laying period.

Key words: Housing system, AST, AMYL, GGT, Laying hens

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au desfăşurat în două ferme cu sisteme de întreținere diferite: aşternut permanent şi la baterie.

În ferma A, experimentul s-a desfăşurat pe un efectiv de 3700 de găini întreținute pe aşternut permanent, hibridul ISA BROWN.

În ferma B, efectivul de găini ouătoare a fost întreținut la baterie fiind în număr de 4500 de găini hibridul ISA BROWN.

În amebele ferme popularea cu găini ouătoare s-a făcut la vârsta de 16 săptămâni, în aceeaşi perioadă a anului şi au beneficiat de aceleaşi tehnologii de creştere respectând condițiile de întreținere şi microclimat.

S-au recoltat probe de sânge pentru examene biochimice şi s-au determinat următorii parametri sangvini: amilza (AMYL), fosfataza alcalină (ALP), gamaglutamiltransferaza (GGT), aspartataminotransferaza (AST), alaninamintransferaza (ALT), proteine totale şi acid uric. Determinările biochimice s-au efectuat prin metode specifice în concordanță cu cerințele de calitate al laboratoarelor de profil. Recoltările s-au efectuat la vârsta de 17 şi 25 de săptămâni de viață a găinilor ouătoare. S-a urmărit, de asemenea, producția de ouă şi greutatea medie a găinilor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma analizei valorilor obținute, pe perioada analizată, se poate spune că producția de ouă nu a suferit modificări, la fel şi greutatea medie a găinilor, cei doi indicatori de evaluare fiind în conformitate cu graficul hibridului.

Tabel 1

Specificare	Lot	Vârtsa (săptămâni)	n	X ± Sx	CV %	Diferenţe Abs	Testul Mann-Whitney p*
AMYL	S	17	15	821,87 ± 29,72	16,17	29,73	** 0,000006
	B		15	851,60 ± 34,50	18,12		
	S	25	15	420,00 ± 19,61	20,88	-103,8	** 0,000003
	B		15	316,20 ± 19,56	23,95		
GGT	S	17	15	26,40 ± 0,97	16,44	-1,33	* 0,01209
	B		15	25,07 ± 1,00	17,87		
	S	25	15	68,00 ± 10,96	72,09	-25,87	** 0,000040
	B		15	42,13 ± 3,50	32,19		
ASAT	S	17	15	415,73 ± 8,99	9,67	-44,4	** 0,000005
	B		15	371,33 ± 12,67	15,26		
	S	25	15	279,80 ± 8,08	12,92	-73,5	** 0,000003
	B		15	206,33 ± 8,20	15,39		
ALAT	S	17	15	10,20 ± 1,53	67,23	-2,07	0,383733
	B		15	8,13 ± 1,40	77,04		
	S	25	15	7,60 ± 0,69	40,34	-5,73	** 0,000841
	B		15	1,87 ± 0,46	94,68		
PROT T	S	17	15	4,74 ± 0,10	9,82	0,51	0,329693
	B		15	5,25 ± 0,21	18,07		
	S	25	15	4,56 ± 0,09	8,76	0,95	0,059127
	B		15	5,51 ± 0,17	11,91		

* - p < 0,05 (diferneţe semnificative);
** - p < 0,01 (diferenţe distinct semnificative).

Referitor la rezultatele obţinute în urma interpretării statistice a valorilor parametrilor sanguini putem spune următoarele:

- la proteine totale (17 şi 25 de săptămâni) şi alaninaminotransferza (ALAT)(17 săptămâni) nu s-au înregistrat diferenţe semnificative asigurate statistic.
- activitatea amilazei (AMYL) a suferit modificări distinct semnificative p=0,000006 (p<0,01) la vârsta de 17 săptămâni cu o activitate enzimatică crescută la găinile întreţinute la baterie şi p=0,000003 la vârsta de 25 de săptămâni când activitatea amilazei este mai crescută la găinile întreţinute la sol.
  Amilaza este una din enzimele cheie ale metabolismului carbohidraţilor şi este produsă de pancreas, aceasta regăsindu-se atât în pancreas cât şi în salivă. Creşterea activităţii amilazei poate fi asociată cu o stare uşoară de stres sau în urma unui consum crescut de furaj (2).
- la vârtsa de 17 săptămâni s-au înregistrat diferenţe semnificative (p<0,05) rezultând o creştere a activităţii gamaglutamiltransferazei (GGT) la găinile întreţinute la sol 26,40 ± 0,97 U/l faţă de cele din baterii 25,07 ± 1,00 U/l. În cazul activităţii aspartataminotransferazei (ASAT) diferenţele sunt distinct semnificative (p<0,01). Găinile întreţinute la sol au prezentat un nivel mai ridicat al activităţii enzimatice 415,73 ± 8,99 U/l comparativ cu cele din baterii 371,33 ± 12,67 U/l.
- activitatea enzimelor: amilaza (AMYL), gamaglutamiltransferaza (GGT), aspartataminotransferaza (ASAT) şi alaninaminotransferaza (ALAT) a fost mai mare la găinile întreţinute la sol la vârsta de 25 de săptămâni înregistrându-se diferenţe distinct semnificative (p<0,01).
  Activitatea crescută a aspartataminotransferazei (ASAT) şi a creatinchinazei (CK) indică o modificare a ţesutului muscular şi poate induce apariţia stresului. Această creştere a activităţii enzimatice poate fi pusă pe seama creşterii turnover-lui proteic din muşchi (1).
  Gammaglutamiltransaminaza (GGT) poate fi considerată una din principalele enzime hepatice; prezenţa ei în plasma sangvină în concentraţii mari indică spargerea

membranei celulare a unor tipuri de celule. Înregistrarea unor valori crescute ale activităţii gammaglutamiltransaminazei la gănile ouătoare poate fi expresia intensificării producţiei de ouă. O altă ipoteză poate fi: metabolismul intens al găinilor BROWN sau genotipul acestora mai sensibil la stimulii mediului înconjurător asociat cu producţia de ouă. Răspunsul hepatic la producţiile ridicate sunt mai expresive la hibridul BROWN (3).

CONCLUSIONS

- activitatea amilazei este mai intensificată la gănile întreţinute în baterii la vârsta de 17 săptămâni;
- per ansamblu, există o intensificare a activităţii enzimatice la găinile întreţinute la sol comparativ cu cele din baterii al vârsta de 25 de săptămâni;
- activitatea enzimatică la găinie întreţinute pe sol şi în baterii se încadrează în limitele fiziologice.

REFERENCES:

1. DOWNING, J.A., BRYDEN, W.L. (2002) - *A report for the Rural Industries Research and Development Corporation*, Edyted by Rural Industries Research and Development Corporation, Camden, Australia.
2. GYENIS, J., SÜTŐ, Z., ROMVÁRI, R., HORN, P. (2006) - *Tracking the development of serum biochemical parameters in two laying hen strains – a comparative studyI*, Arch. Tierz., Dummerstorf 49, 6, 593-606.
3. JÓZSEF, G., ZOLTAN, S.,, ROBERT, R., HORN, P. (2006) - *Tracking the development of serum biochemical parameters in two laying hen strains – a comparative study*, Arch. Tierz., 49, 6, 593-606.

EVALUAREA INFLUENŢEI UNOR ADITIVI FURAJERI ASUPRA PARAMETRILOR CANTITATIVI ŞI CALITATIVI AI SECREŢIEI LACTATE, LA VACĂ

COTOR G., GÂJÂILĂ G., GÂJÂILĂ Iuliana, GHIŢĂ M., TRUŢA Alina
USAMV Bucureşti
cotorg@yahoo.com

The aim of our experiment was the evaluation of some fodder supplements (linseeds, cannabis seeds and bicarbonate, magnesium and calcium salts as buffer) in different combination, on the milk yield and the main milk components. All the 10 experimental groups (each of them composed of 10 dairy cows), were monitored for 10 days, regarding the milk yield and protein and lipid amount. Then, for other 10 days, the experimental groups were submitted to diets, containing different combinations of above mentioned fodder supplements. Daily, over all experimental period (20 days), was measured the milk yield. In 1st, 5th, 9th, 11th, 15th and 20th days of the experimental period, were taken milk samples, in purpose to determine the amount of milk protein and fat. The diets containing linseeds and cannabis seed didn't affect the milk yield in comparison with those administered to the control group. But the diets containing linseeds and cannabis seed associated with bicarbonate and salts buffer, improved, in a significant manner, the milk yield (8,7% and respectively 12,2%). The diets containing linseeds and cannabis seed induced a diminution of milk protein concentration (0,6% and respectively 1,2%). But the diets containing linseeds and cannabis seed associated with bicarbonate and salts buffer, improved, in a significant manner, the milk protein levels (3,1% and respectively 4,7%). The diets containing linseeds and cannabis seed induced an increase of milk fat concentration (3,6% and respectively 3%). The diets containing linseeds and cannabis seed associated with bicarbonate and salts buffer, improved, in a significant manner, an increase of milk fat concentration (13,5% and respectively 15%).

Cercetarile din domeniul fiziologiei lactatiei au evidentiat implicarea unor componente alimentare esentiale in biosinteza componentilor laptelui si importanta acestora in asigurarea unei galactopoieze eficiente, la un nivel productiv pe masura pretentiilor actuale. In acest sens, s-a demonstrat importanta continutului ratiei alimentare in proteine si a calitatii acestora (prezenta aminoacizilor esentiali in hrana) in asigurarea unei productii crescute de lapte, cu un continut proteic ameliorat. S-a demonstrat totodata importanta celulozei in asigurarea unui mediu optim dezvoltarii florei celulolitice, la nivelul microecosistemului ruminal. Aceasta este implicata in sinteza acizilor grasi volatili (AGV), in special acid acetic, materie prima utilizata in fazele premegatoare biosintezei lipidelor din lapte (biosinteza acizilor grasi saturati, cu catena scurta, precum C14:0 si C16:0) la nivelul acinilor mamari (2,3). In acest sens, contributia fibroaselor (celulozei) din alimentatia rumegatoarelor la ameliorarea concentratiei de grasime este un fapt bine cunoscut. Acizi grasi volatili, mentionati mai sus, (in special acidul acetic) absorbiti integral din rumen si utilizati la sinteza lipidelor din lapte, pe langa faptul ca maresc continutul in grasimi al laptelui secretat, cresc ponderea procentuala a acizilor grasi saturati, cu catena scurta, precum C14:0 si C16:0 (cunoscuţi find ca aterogeni), in ansamblul acizilor grasi utilizati in biosinteza lipidelor (procentul acestora creste in detrimentul acizilor grasi cu catena lunga, ca C18:1 si C18:0) (4,5). In acest sens s-a infiripat idea ca administrarea in hrana animalelor lactante a unor lipide de provenienta vegetala, cu un continut ridicat in acizi grasi nesaturati cu catena lunga, prin supraoferta realizata, va mari ponderea acestora in lapte, in detrimentul acizilor grasi saturati, cu catena scurta, ducand la obtinerea unui produs cu un potential aterogen mai scazut si implicit mai favorabil sanatatii consumatorului.

Tinand cont de cele mentionate mai sus, administrarea de suplimente nutritive bazate pe plante oleaginoase, care contin niveluri mari de acizi grasi nesaturati cu catena lunga, in special si acid linoleic in particular, au indicat efecte pozitive asupra nivelului grasimii din lapte si a calitatii acesteia (1,6,7,8,9,10,11). Un ingredient oleaginous netestat in scopul mentionat mai sus este reprezentat de semintele de canepa (Cannabis sativa). Acestea se remarca prin continutul ridicat in acizi grasi nesaturati cu catena lunga (oleic, linoleic si linolenic).

Anumiti aditivi oleaginosi au prezentat, in functie de modul de administrare, actiuni negative asupra productiei de lapte. Referitor la acest ultim aspect, cercetari recente au indicat ca administrarea unor substante anorganice alcalinizante (bicarbonate de sodiu, MgO), in paralel cu grasimi de origine vegetala (floarea soarelui, soia etc.) au diminuat efectele negative asupra productiei de lapte si a procentului de proteine pe care le implica suplimentarea cu grasimi a ratiei furajere, la rumegatoare. Astfel, un aditiv furajer, cu o reteta care sa amelioreze cantitativ si calitativ continutul lipidic al laptelui, fara sa afecteze in acelasi timp, intr-o maniera semnificativa, continutul proteic si productia de lapte in ansamblu, sa constituit intr-un demers obiectiv al proiectului de față.

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru derularea experimentului sa utilizat un număr de 50 de vaci lactante, din rasa Holstein, cu vârste cuprinse între 4 şi 7 ani. Grupul de animale alese pentru acest experiment a fost format din animale omogene din punct de vedere al producției de lapte. Animalele au fost organizate în cinci loturi experimentale, cu câte 10 animale. Experimentul s-a derulat pe o durata de 20 de zile, în care anumiți aditivi au fost administrat la vacile din lotul experimental zilnic începând cu ziua a 10-a şi terminând cu ziua a 20-a a perioadei experimentale. Aditivii au fost administrați ca suplimente în rația de hrană, cu ocazia mulsului de dimineață. Modalitățile de administrare a aditivilor sunt menționate în tabelul nr. 1.

Loturile experimentale au fost tratate în maniera descrisă în Tabelul 1.

Tabelul 1 Modul de administrare a aditivilor testați, la loturile experimentale

Lotul	Seminţe de cânepă g/cap de vacă/zi	Seminţe de in g/cap de vacă/zi	Tampon (75% $NaHCO_3$, 10% MgO şi 15% Ca CO_3) g/cap de vacă/zi
Nr.1 (Martor)	-	-	-
Nr.2	100	-	-
Nr.3	100	-	100
Nr.4	-	100	-
Nr.5	-	100	100

A fost măsurată producția zilnică de lapte pe cap de vacă, pe toată perioada experimentului.

În zilele 1, 5, 9, 11 ,15 şi 20 au fost recoltate probe de lapte în vederea determinării concentrației în proteine şi grăsime. Totodată aceste probe au fost folosite în vederea dozării acizilor graşi.

Determinarea conținutului în proteine şi grăsime s-a realizat cu ajutorul unui analizor de lapte Lactoscan 60 LCD Milk Analyzer (spectrofotometrie IR).

Analiza statistică a constat în calcularea mediei şi a erorii standard. Totodată, în vederea determinării semnificativității diferențelor dintre loturile experimentale, s-a aplicat testu U Mann Whitney.

REZULTATE OBŢINUTE

Producția medie zilnică de lapte pe lot este înfățişată în tabelul nr. 2.

Rezultatele obținute de noi indică faptul că loturile care au primit în rație numai semințe de cânepă şi in (loturile 2 şi 4) nu au înregistrat producții de lapte superioare lotului martor. Loturile 3 şi 5, a căror rație a fost suplimentată cu semințe de in sau cânepă şi tampon au manifestat o intensificare a producției de lapte (lotul 3 cu 8,7% şi lotul 5 cu 12,2%) în comparație cu lotul martor, diferențele fiind semnificative ($P<0,05$).

Tabelul 2

Lotul	Producţia zilnică medie de lapte/lot, în primele 10 zile ale experimentului (l)	Producţia zilnică medie de lapte/lot, în zilele 11-20 ale experimentului (l)
Nr.1(Martor) (n=10)	105,3	109,0
Nr.2 (n=10)	102,2	108,3
Nr.3 (n=10)	106,1	118,5*
Nr.4 (n=10)	101,0	109,0
Nr.5 (n=10)	110,7	122,3**

*U=20, P<0,05, U=22, P<0,05

Concentraţia medie în proteine a probelor de lapte, recoltate de la loturile experimentale, este înfăţişată în tabelul 3.

Rezultatele obţinute de noi indică faptul că loturile care au primit în raţie numai seminţe de cânepă şi in (loturile 2 şi 4) nu au înregistrat concentraţii proteice superioare lotului martor. Din contră, au determinat o scădere a acestei valori cu 0,6%, în cazul lotului 2 şi cu 1,2 %, în cazul lotului 4. Loturile 3 şi 5, a căror raţie a fost suplimentată cu seminţe de in sau cânepă şi tampon, au manifestat o amplificare a concentraţiei proteice a laptelui (lotul 3 cu 3,1% şi lotul 5 cu 4,7%) în comparaţie cu lotul martor, diferenţele fiind semnificative (P<0,05).

Tabelul 3

Lotul	Concentraţia medie în proteine, în primele 10 zile ale experimentului (%)	Concentraţia medie în proteine, în zilele 11-20 ale experimentului (%)
Nr.1(Martor) (n=10)	3,13	3,19
Nr.2 (n=10)	3,05	3,17
Nr.3 (n=10)	3,12	3,29*
Nr.4 (n=10)	3,17	3,15
Nr.5 (n=10)	3,19	3,34**

*U=26, P<0,05, **U=24, P<0,05

Concentraţia medie în grăsimi a probelor de lapte, recoltate de la loturile experimentale este, înfăţişată în tabelul 4.

Rezultatele obţinute de noi indică faptul că loturile care au primit în raţie numai seminţe de cânepă şi in (loturile 2 şi 4) au înregistrat concentraţii lipidice superioare lotului martor, cu 3,6%, în cazul lotului 2 şi cu 3 %, în cazul lotului 4, diferenţele fiind semnificative (P<0,05). Loturile 3 şi 5, a căror raţie a fost suplimentată cu seminţe de in sau cânepă şi tampon, au manifestat o amplificare a concentraţiei lipidice a laptelui (lotul 3 cu 13,5% şi lotul 5 cu 15,%) în comparaţie cu lotul martor, diferenţele fiind semnificative (P<0,01).

Tabelul 4

Lotul	Concentraţia medie a grăsimilor, în primele 10 zile ale experimentului (%)	Concentraţia medie a grăsimilor, în zilele 11-20 ale experimentului (%)
Nr.1(Martor) (n=10)	3,23	3,25
Nr.2 (n=10)	3,25	3,37*
Nr.3 (n=10)	3,19	3,69**
Nr.4 (n=10)	3,27	3,35***
Nr.5 (n=10)	3,23	3,74****

*U=24, P<0,05, **U=18, P<0,01, *** U=25, P<0,05, **** U=17, P<0,01

CONCLUZII

1. Administrarea semințelor de cânepă sau in, în condițiile experimentului nostru nu a influențat producția de lapte la loturile experimentale.
2. Administrarea semințelor de cânepă sau in, în combinație cu tamponul imaginat de noi, în condițiile experimentului nostru a ameliorat producția de lapte, la loturile experimentale, cu 8,7% şi respectiv 12,2%, diferențele, față de lotul martor, fiind semnificative (P<0,05).
3. Administrarea semințelor de cânepă sau in, în condițiile experimentului nostru a determinat scăderea nivelul proteinelor din lapte la loturile experimentale, cu 0,6% şi respectiv 1,2%.
4. Administrarea semințelor de cânepă sau in, în combinație cu tamponul imaginat de noi, în condițiile experimentului nostru a ameliorat nivelul proteinelor din lapte, la loturile experimentale, cu 3,1% şi respectiv 4,7%, diferențele, față de lotul martor, fiind semnificative (P<0,05).
5. Administrarea semințelor de cânepă sau in, în condițiile experimentului nostru a ameliorat nivelul lipidelor din lapte, la loturile experimentale, cu 3,6% şi respectiv 3,0%, diferențele, față de lotul martor, fiind semnificative (P<0,05).
6. Administrarea semințelor de cânepă sau in, în combinație cu tamponul imaginat de noi, în condițiile experimentului nostru a ameliorat nivelul lipidelor din lapte, la loturile experimentale, cu 13,5% şi respectiv 15,0%, diferențele, față de lotul martor, fiind semnificative (P<0,01).

BIBLIOGRAFIE

1. Antogiovanni, M., Secchiari, P., Mele, M., Buccioni, A., Serra, A., Ferruzzi, G., Rapaccini, S, Pistoia, A., Olive oil calcium soaps and rumen protected methionine in the diet of lactating ewes: effect on milk quality. Ital. J. Anim. Science, 1, 55-63, 2002.
2. Bauman, D.E., Cori, B.A., Baumgard, L.H., Grinari, J.M., Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In : J. Wiseman (ed) Recent advances in animal nutrition, Nottingham University Press, Champaign, IL, USA, pp 221-250, 2001.
3. Chilliard, Y., Ferlay, A., Loor, J., Rouel, J., Martin, B., Trans and conjugated fatty acids in milk from cows and goats consuming pasture or receiving vegetable oil seed. Ital. J.Anim.Sci.1:243-254,2002.
4. Chouinard, P.Y., Corneau, L., Butler, W.R., Chilliard, Y., Drackley, J.K., Bauman, D.E., Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentration in milk fat. Journal of Dairy Science, 84, 680-690, 2001.
5. Dhiman, T.R., Satter, L.D., Parizia, M.W., Galli, M.P., Albright, K., Tolosa, M.X., Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. Journal of Dairy Science, 83, 1016-1027, 2001.
6. Givens, D.I., Allison, R., Blake, J.S., Enhacement of oleic acid and vitamin E concentrations of bovine milk using dietary supplements of whole rapeseeds and vitamin E, Anim.Res., 52:531-542, 2003.
7. Harvatine, K.J., Allen, M.S., Effects of Fatty Acid Supplements on Milk Yield and Energy Balance of Lactating Dairy Cows, Dairy Sci.; 89(3): 1081 – 1091, 2006.
8. Harvatine, K.J., Allen, M.S., The Effect of Production Level on Feed Intake, Milk Yield, and Endocrine Responses to Two Fatty Acid Supplements in Lactating Cows, Dairy Sci.; 88(11): 4018 – 4027 2005.
9. Jahreis, G., Tischendorf, F., Möckel, P., Schöne F., Conjugated linoleic acids (CLA) and *trans* fatty acids in milk fat of dairy cows fed rapeseed or sunflower oil, grant No 96HS062/2003 German Federal Ministry of Nutrition, Agriculture and Forestry, 2003.
10. Man de J. M., 1964- Determination of the fatty acid composition of milk fat by dual column temperature programmed Gas-Liquid chromatography. Journal of Dairy Science 47 (5), 546-547.
11. Reklewska, B., Oprzadek, A., Reklewsky, Z., Panicke, L., M., Kuczynska, B., Oprzadek, J., Alternative for modifying the fatty acid composition and decreasing the cholesterol level in the milk of cows. Livestock Production Science 76, 235-243, 2002.

CONSERVAREA GENETICĂ A RASEI SURĂ DE STEPĂ DE LA S.C.D.C.B. DANCU, JUDEŢUL IAŞI

GENETICAL CONSERVATION FOR SURA DE STEPA BREED FROM S.C.D.C.B. DANCU, IASI COUNT

CREANGĂ Şt., MACIUC V., LEONTE C.
USAMV IAŞI
creanga62@yahoo.com

The system of knowledge and information has a major role in increasing the animal production and a proper management of genetic resources. Maintaining Sura de stepa breed, as gene reserve, implies several measures of preservation in order to avoid genetic derivation by ensuring of a corresponding size.

The researches were carried out on 30 animals and the information came from observations and direct determinations from the farm and also from the bank of primary data of the farm and UARZ Iași.

The milk quantity on normal lactation ranged between 1493 kg (first lactation) and 2499.14 kg in the fifth lactation. The variability of quantitative milk production is very significant, the values of standard deviation being between s=544.1 kg milk in the first lactation and 1150.89 kg in the fifth lactation and values of variability coefficient higher than 30%. Average size of 122.27 cm and body weight of 575.59 kg, point out a good body conformation. The genetic determinism for the main productive characters is intermediary for the milk and fat quantity (h2=0.32-0.34) and strong for fat percentage in milk (h2=0.73).

Nucleus Sura de stepa breed from Dancu farm represents a valuable genetic fund which must be preserved and improved for the mixed production meat-milk and developed from numerical point of view up to an average effective of at least 50 cows in order to avoid the genetic drift and close inbreeding.

MATERIAL ŞI METODĂ

Din vremuri străvechi, a existat în gospodăriile noastre țărăneşti, o rasă de taurine renumită odinioară până în primele decenii ale sec. al XIX-lea şi care s-a menținut cu rezultate satisfăcătoare la producția de lapte carne şi muncă, rasa autohtonă Sură de Stepă. In prezent, exista o populatie alcatuita din 59 capete, din care 30 efectiv matcă, la S.C.D.C.B. Dancu, Iaşi. Cercetările s-au efectuat pe 30 vaci Sură de stepă, la care s-au urmărit: indicii producției de lapte pe lactații succesive; indicii dezvoltării corporale la taurinele adulte; structura genetică intrapopulațională; heritabilitatea şi repetabilitatea, principalele caractere morfoproductive. Datele au provenit din observații şi determinări directe în fermă cât şi din banca de date primare a fermei şi a UARZ Iaşi.

Toate datele au fost prelucrate statistic după un program elaborat în cadrul disciplinei Tehnologia creşterii bovinelor (*S.A.V.C. elaborat de Conf. dr. Vasile Maciuc*), sintetizate şi interpretate corespunzător.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Speciile domesticite şi cultivate sunt un component important al diversității biologice; în funcție de condițiile şi posibilitățile sale, fiecare parte contractantă trebuie să elaboreze planuri sau programe strategice de conservare şi folosire durabilă a diversității biologice" (Convenția asupra Diversității Biologice art. 2, 6a).

Prioritățile naționale în politicile de conservare, dezvoltare şi utilizare a diversității genetice a animalelor domestice sunt două:

- producerea şi utilizarea durabilă a unor rase şi hibrizi cu un înalt potențial productiv, competitiv pe plan mondial;
- folosirea şi dezvoltarea unor rase autohtone sau produse prin importuri mai vechi, necontinue, păstrarea unor practici zootehnice tradiționale eficiente şi conservarea in situ sau ex situ a raselor importante genetic şi cultural istoric, ce nu pot fi folosite.

Tabelul 1

Parametrii morfologici înregistraţi la taurinele de rasa Sură de stepă varietatea moldovenească

Specificare	Dupa diferiţi autori		
	FILIP şi MANOLESCU	DUMITRESCU	TURCAN
Inaltimea la greban	141	128	131,0
Inaltimea la ischii	139	126,6	130,5
Inaltimea la crupa	143	132,9	134,47
Largimea pieptului			42,12
Largimea toracelui		34,2	38,9
Inaltimea toracelui		66,9	69,5
Perimetrul toracelui	208	172,7	180,1
Lungimea crupei	52	49,5	50,29
Largimea crupei	57	48,5	49,92
Largimea articulatiei coxo-femurale	48	41,9	40,9
Largimea la ischii	24	27,6	29,5
Lungimea corpului	184	151,9	153,0
Lungimea capului		49,5	49,0
Lungimea fruntii	23	16,5	22,0
Largimea fruntii		18,6	18,9
Perimetrul fluierului		17,0	17,3
Lungimea cornului	35	40,2	

În condiţiile procesului de ameliorare, diversitatea genetică existentă a populaţiilor de taurine se reduce foarte mult, rămânând doar câteva rase care s-au evidenţiat şi corespund sub aspectul indicilor tehnico-economici şi calitativi.

S.C.D.C.B. Dancu Iaşi dispune de o bază de date informaţionale privind caracteristicile rasei Sură de stepă (tab.1).

Importanţa acestui nucleu constă în interesul preponderent ştiinţific legat de conservarea patrimoniului genetic deţinut de această rasă precum şi de rolul istoric deosebit în formarea raselor ameliorate din ţara noastră . Odată cu dispariţia acestei rase ar dispărea şi o serie de însuşiri deosebite cum ar fi adaptabilitatea , rezistenţa deosebită la îmbolnăvire , procentul ridicat de grăsime în lapte .

Datorită faptului că această rasă a crescut în mijlocul naturii , atât vara cât şi iarna , mediu natural i-a imprimat însuşiri excepţionale de rusticitate, capacitate de adaptare şi valorificare a furajelor grosiere, sănătate , rezistenţă deosebită la boli şi intemperii . Dacă din punct de vedere productiv nu mai satisface cerinţele actuale , această rasă poate juca în perspectivă un rol istoric , turistic şi genetic (ca rezervor de gene valoroase) , toate acestea fiind un argument hotărâtor în conservarea rasei Sură de stepă . S-ar putea ca pe parcurs să se facă necesară folosirea unor caractere precum : conţinutul ridicat de grăsime al laptelui , rusticitatea , adaptabilitatea , rezistenţa la boli şi intemperii cât şi la sisteme de exploatare tradiţionale.

În tabelul 2 se prezintă valorile medii şi variabilitatea indicilor producţiei de lapte, pe lactaţii succesive, la rasa Sură de stepă. Cantitatea de lapte pe lactaţie normală a fost cuprinsă între 1493,36 kg (lact. I-a) şi 2499,14 kg în lactaţia a V-a care reprezintă şi lactaţia maximă.

În prima lactaţie s-a realizat 1493,36 kg lapte, respectiv 59,75 % din lactaţia maximă, valoare care evidenţiază tardivitatea rasei Sură de stepă pentru producţia de lapte.

Variabilitatea producţiei cantitative de lapte este foarte accentuată, valorile deviaţiei standard fiind cuprinse între s = 544,10 kg lapte în lactaţia I-a şi 1150,89 kg în lactaţia a V-a, iar a coeficienţilor de variabilitate între V % = 28,58 şi V % = 46,05. Variabilitatea foarte accentuată a nucleului studiat dovedeşte lipsa selecţiei după acest parametru de bază şi posibilitatea ameliorării genetice prin reţinerea şi multiplicarea genotipurilor valoroase. Corespunzător, cantitatea de grăsime este corelată pozitiv şi puternic cu cantitatea de lapte (66,01 – 122 Kg). Este de menţionat că în nucleul studiat au existat indivizi cu o producţie maximă de 4080 kg lapte pe lactaţie normală sau de 4019 kg şi 3080 kg.

În structura genetică a efectivului studiat au fost identificate şapte grupe de semisurori paterne (tab. 3), cu o valoare genetică cuprinsă între 1043,00 kg (cod 79008) şi 1752,33 kg (cod 79005), ceea ce dovedeşte valoarea genetică slabă a reproducătorilor masculi privind indicii producţiei de lapte. În ce priveşte talia, valorile sunt cuprinse între 118,00 cm (87003) şi 126,00 cm (86002) iar greutatea corporală între 515,00 Kg (79008) şi 626 Kg (79005). Aceste date sunt favorabile selecţiei nucleului studiat în scopul ameliorării producţiei de carne a rasei Sură de stepă.

Tabelul 2

Valorile medii şi variabilitatea indicilor producţiei de lapte, pe lactaţii succesive, la rasa Sură de Stepă

Specificare	Statisticii	Lactaţie totală				Lactaţie normală			
		Durata zile	Lapte kg	% grăs.	Kg grăs.	Durata zile	Lapte kg	% grăs.	Kg grăs.
Lact. I	n	30	30	30	30	30	30	30	30
	$\overline{X}$	259,14	1538,64	4,44	67,94	249,29	1493,36	4,44	66,01
	$\pm s_{\overline{x}}$	14,04	112,51	0,09	5,03	11,18	102,82	0,09	4,67
	s	74,33	595,35	0,49	26,62	59,19	544,10	0,49	24,74
	V%	28,68	38,69	11,24	39,18	23,74	36,43	11,21	37,48
	Min	90	360	3,40	15,00	90	360	3,40	15,00
	Max	450	2612	5,30	110,00	305	2296	5,30	107,00
Lact. II	n	27	27	27	27	27	27	27	27
	$\overline{X}$	254,26	1696,96	4,55	7,04	248,04	1627,87	4,54	72,41
	$\pm s_{\overline{x}}$	14,45	147,15	0,09	5,09	12,76	122,57	0,09	5,03
	s	62,29	705,71	0,45	24,42	61,23	587,86	0,44	24,15
	V%	27,25	41,58	9,88	33,43	24,68	36,11	9,86	33,36
	Min	32	198	3,70	10,00	32	198	3,80	10,00
	Max	369	3565	5,40	111,00	305	2803	5,40	111,00
Lact. III	n	19	19	19	19	19	19	19	19
	$\overline{X}$	254,80	2092,80	4,51	93,00	252,07	2084,40	4,51	92,47
	$\pm s_{\overline{x}}$	15,39	215,08	0,12	8,76	14,46	214,21	0,12	8,73
	s	59,61	833,01	0,49	33,95	56,01	829,65	0,49	93,81
	V%	23,39	39,80	10,85	36,50	22,22	39,80	10,85	36,56
	Min	116	434	3,50	22,00	116	434	3,50	22,00
	Max	345	4080	5,30	144,00	305	4080	5,30	144,00
Lact. IV	n	14	14	14	14	14	14	14	14
	$\overline{X}$	290,50	2082,10	4,62	91,10	273,30	1999,60	4,62	87,60
	$\pm s_{\overline{x}}$	22,75	250,46	0,13	9,71	11,25	242,34	0,13	9,42
	s	71,95	792,03	0,41	30,72	35,59	766,37	0,41	29,78
	V%	24,77	38,04	8,94	33,72	13,02	38,32	8,94	34,00
	Min	194	835	4,10	45,00	194	835	4,10	45,00
	Max	470	3080	5,30	138,00	305	3080	5,30	138,00
Lact. V	n	7	7	7	7	7	7	7	7
	$\overline{X}$	285,43	2535,43	4,73	123,71	274,57	2499,14	4,73	122,00
	$\pm s_{\overline{x}}$	20,76	448,22	0,21	25,25	15,48	434,99	0,21	24,56
	s	54,93	1185,89	0,57	66,82	40,96	1150,89	0,57	65,00
	V%	19,24	46,77	12,06	54,01	14,92	46,05	12,06	53,28
	Min	191	675	3,70	32,00	191	675	3,70	32,00
	Max	369	4087	5,30	212,00	305	4019	5,30	209,00

Tabelul 3

Valorile medii şi variabilitatea principalelor însuşiri morfoproductive, pe grupe genetice, la taurinele Sură de Stepă

Cod. Taur	n	Statisticii	Lapte kg.	Grăsime %	Grăsime Kg	Talie cm.	Greutate corporală Kg.	Perimetrutoracic cm
79005	3	$\overline{X}$	1752,33	4,67	81,00	122,00	626,67	198,33
		±s $\overline{x}$	269,80	0,33	9,00	3,00	49,10	5,20
		s	467,31	0,55	17,32	5,19	75,04	9,01
79006	2	$\overline{X}$	1513,00	5,00	72,00	120,00	570,00	192,00
		±s $\overline{x}$	395,00	0,00	30,00	0,00	0,00	0,00
		s	682,87	0,00	30,42	0,00	0,00	0,00
79008	2	$\overline{X}$	1043,00	5,00	51,50	121,00	515,00	186,00
		±s $\overline{x}$	187,00	0,00	8,50	0,00	0,00	0,00
		s	264,45	0,00	12,02	0,00	0,00	0,00
79009	9	$\overline{X}$	1548,22	4,67	73,00	123,17	580,50	193,33
		±s $\overline{x}$	226,46	0,16	10,38	0,74	17,68	1,90
		s	679,40	0,05	31,14	1,83	43,33	4,67
86002	3	$\overline{X}$	1149,00	4,00	44,00	126,00	680,00	204,00
		±s $\overline{x}$	472,00	0,01	19,00	2,00	20,00	2,00
		s	667,50	0,03	26,87	2,82	28,28	2,82
87003	2	$\overline{X}$	1190,00	4,00	51,00	118,00	460,00	179,00
		±s $\overline{x}$	32,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		s	97,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
87027	9	$\overline{X}$	1558,11	3,89	62,44	121,75	549,38	189,75
		±s $\overline{x}$	138,47	0,11	5,98	1,26	26,10	3,00
		s	415,42	0,33	17,95		73,84	8,49

În tabelul 4 se prezintă valorile medii şi variabilitatea dezvoltării corporale, din analiza cărora se pot rezuma următoarele:

Vacile din nucleul studiat au avut talia medie de 122,27 cm şi greutatea corporală 575,59 kg, valori care evidenţiază o bună masivitate corporală.

Variabilitatea taliei este mai puţin accentuată, lotul analizat fiind suficient de omogen (s = 3,29 cm, iar V % = 2,69). În schimb greutatea corporală prezintă o variabilitate mare, cu limita maximă de 710 kg şi indicii de dispersie s = 74,05 kg, iar V % = 12,86.

Tabelul 4

Valorile medii şi variabilitatea dezvoltării corporale la taurinele din rasa Sură de Stepă

Specificare	UM	n	$\overline{X}$	±s $\overline{x}$	s	V%	Min	Max	% din talie
Înălţimea la grebăn	cm	30	122,27	0,70	3,29	2,69	115	128	100,00
Înălţimea la spinare	cm	30	121,86	0,73	3,46	2,84	116	129	99,66
Înălţimea la crupă	cm	30	125,36	0,76	3,58	2,85	119	132	102,52
Înălţimea la baza cozii	cm	30	126,45	0,70	3,30	2,61	120	132	103,41
Adâncimea toracelui	cm	30	71,55	0,71	3,34	4,68	65	79	58,51
Lungimea orizontală a corpului	cm	30	134,91	1,29	6,07	4,50	121	148	110,33
Lungimea totală a corpului	cm	30	198,82	1,99	9,33	4,69	178	216	162,60
Lungimea crupei	cm	30	50,32	0,58	2,75	5,46	47	59	41,15
Lărgimea pieptului	cm	30	41,73	0,59	2,78	6,66	37	47	34,12
Lărgimea crupei la şolduri	cm	30	50,36	0,45	2,12	4,22	47	57	41,18

Specificare	UM	n	$\overline{X}$	$\pm s\,\overline{x}$	s	V%	Min	Max	% din talie
Lărgimea crupei la artic. coxo-femurale	cm	30	44,36	0,45	2,12	4,79	41	51	36,34
Lărgimea crupei la ischii	cm	30	17,27	0,49	2,33	13,51	13	22	14,12
Perimetrul toracelui	cm	30	192,64	1,76	8,28	4,30	176	207	157,55
Greutatea corporală	kg	30	575,59	15,78	74,05	12,86	435	710	-

Din analiza coeficientului de heritabilitate la principalele caractere morfoproductive (tab.5) se pot reţine valorile mijlocii pentru cantitatea de lapte şi grăsime (h^2= 0,32-0,34) iar în cazul procentului de grăsime se constată un determinism genetic puternic (h^2= 0,73). Acelaşi valori intermediare se remarcă şi la talie respectiv greutate corporală (h^2 = 0,38 – 0,39), selecţia fenotipică pentru aceste caractere fiind eficientă.

Tabelul 5

Heritabilitatea (h^2) principalelor caractere morfoproductive, la rasa Sură de stepă

Specificare	Heritabilitatea
Durata gestaţiei	0,13
Durata lactaţiei normale	0,28
Cantitatea de lapte	0,32
Procentul de grăsime	0,73
Cantitatea de grăsime	0,34
Înălţimea la grebăn	0,38
Perimetrul toracelui	0,34
Greutatea corporală	0,39

CONCLUZII

1. Cantitatea de lapte pe lactaţie normală a fost cuprinsă între 1493,36 kg (lact. I-a) şi 2499,14 kg în lactaţia a V-a care reprezintă şi lactaţia maximă. Variabilitatea producţiei cantitative de lapte este foarte accentuată V % = 28,58 - 46,05 ceea ce permite ameliorarea populaţiei prin selecţie.
2. Analizând structura genetică a efectivului, s-a evidenţiat descendenţa la taurii cod 79005 cu 1752,33 Kg lapte, 86002 cu talia de 126,00 cm şi 79005 cu 626 Kg greutate corporală. Talia are valoarea medie de 122,27 cm iar greutatea corporală de 575,59 kg, populaţia având o bună masivitate corporală.
3. Coeficientul de heritabilitate are valorile mijlocii pentru cantitatea de lapte şi grăsime (h^2= 0,32-0,34) iar în cazul procentului de grăsime se constată un determinism genetic puternic (h^2= 0,73). Acelaşi valori intermediare se remarcă şi la talie respectiv greutate corporală (h^2 = 0,38 – 0,39), selecţia fenotipică pentru aceste caractere fiind eficientă.
4. Nucleul de rasă Sură de stepă din ferma Dancu reprezintă un fond genetic valoros care trebuie conservat şi ameliorat în direcţia producţiei mixte carne-lapte şi dezvoltat din punct de vedere numeric până la un efectiv mediu de cel puţin 50 vaci matcă, pentru a se evita driftul genetic şi consangvinizarea strânsă.

BIBLIOGRAFIE

1. **CREANGĂ ŞT. 1999** – Elemente fundamentale ale eredităţii animalelor. Edit. „Ion Ionescu de la Brad”, Iaşi
2. **CUCU GR. I., MACIUC V., MACIUC DOMNICA 2004** - Cercetarea ştiinţifică şi elemente de tehnică experimentală în zootehnie. Edit. Alfa, Iaşi
3. **GROSU, H. – 2003** – Programe de ameliorare. Edit. Tehnică Agricolă, Bucureşti
4. **MACIUC, V., UJICĂ, V., NISTOR, I. - 2003** – Ghid practic de ameliorare genetică a bovinelor pentru producţia de lapte. Edit. Alfa, Iaşi.
5. **MACIUC VASILE 2006** – Managementul creşterii bovinelor. Edit Alfa, Iaşi
6. **SCHAEFFER L. R. 1993** – Linear models in animal breeding. Course notes, University of Guelph, Canada.
7. **TOSH J. J. AND WILTON J. W. 1994** – Effects of data structure on variance of prediction error and accuracy of genetic evaluation. J. Anim. Sci. 72:2568
8. **UJICĂ V., MACIUC V., CREANGĂ ŞT., PÂNTEA M., NISTOR I. 2008** -Valoarea genetică a nucleului de rasă Sură de stepă de la S.C.D.C.B. Dancu, Iaşi. Simpozion ştiinţific internaţional. Lucrări ştiinţifice seria zootehnie CD, vol 51 U.Ş.A.M.V. Iaşi ISSN 1454-7368
9. **WOODS P. D. P. 1967** - Algebraic model of the lactation curve in cattle. Nature.

INFLUENŢA PH-ULUI ŞI TEMPERATURII ASUPRA SPECIEI *SALMONELLA SPP*. DE PE CARNEA DE PASĂRE PROASPĂTĂ, REFRIGERATĂ ŞI CONGELATĂ

THE INFLUENCE OF PH AND TEMPERATURE AGAINST *SALMONELLA SPP*. GROWTH IN FRESH, FROZEN AND FREEZING POULTRY CARCASSES

CREŢU Carmen[1], FLORISTEAN V.[1]., CARP-CĂRARE M. [1], BRĂDĂŢAN Gh. [1], IŞAN Elena[2]
[1]FMV Iaşi
[2]L.S.V. Iaşi

Researches were initiated in a slaughtering unit from Iassy. 190 samples from poultry carcasses were gathered and analyzed microbiologically. Carcasses washing was used in order to obtain test samples.

The main sources of salmonellosis were poultry and poultry products. Salmonella is one of the most important causes of foodborne disease worldwide.

To reduce the contamination, experimentally, we treated the washing weather with

lactic acid sol.1%. In this way we stopped the evolution of the microorganisms sensible to environmental ph changes.

This ph change reduced the microbiological load, especially, Salmonella spp. from the surface of the carcass.

Key words: poultry, decontamination, lactic acid, skin, Salmonella spp.

Biological food safety hazards comprise pathogenic bacteria including E.coli, Salmonella, and Campylobacter.

Poultry meat, along multiple manipulation and processes, suffers, the contamination being possible, all the may on technological process.

Microorganism's contamination source are numerons, most important being the poultry themselves, which can have in theis gastro-intestinal mass a rich and diversity microflora, but other sources as well.

Poultry meat can represent an important source of human infection with Salmonella spp. S. Enteritidis and S. Typhimurium are the most commonly reported serovars isolated from poultry, poultry meat products and human cases of salmonellosis. (EFSA, 2004a).

The decontamination of poultry carcasses can help to reduce human foodborne infections.

Concentration of the acid in the range of 1−2 % is generally accepted. The acid treatment may be done at different places of the slaughterhouse.

The influence of acid decontamination on the appearance (colour) of carcass surface is differently assessed in the literature. The information about colour changes affected those that no changes occur.

MATERIAL AND METHOD

Researches were initiated in period 2007-2008, in a slaughtering unit from Iassy 192 samples from poultry carcasses were gathered and analyzed microbiologically.

The parameters investigated were represented by microorganisms *Salmonella spp*.The samples were obtained using carcasses washing fresh, after frozen and after freezing. The samples poultry carcasses were analyzed, taking neck skin, in sterile conditions and then was made a quantity check (25g).

The carcasses evaluation was done considering ANSV programs: S.R.E.N. ISO 6579/2002, foresees the identification of *Salmonella* spp./25g from fowl carcases (only neck skin). According to standard in 25 g sample *Salmonella* has to be absent.

Parts of the HACCP program in the slaughterhouses unit are tests for *Salmonella spp.*

From selected carcasses have been removed in condition to prevent supplementary contamination of the carcases some part of the neck skin , approximately 25 grams. Skin fragments have been drawn with sterile scissors, in sterile plastic bags (special bags for Stomacher -

305/175mm) and kept on ice from harvest to laboratory. Samples were worked for examination in maxim 5 hours from harvest.

For pre enrichment was use buffered peptone water (BPW), take 25g/ml sample into 225ml pre-warmed BPW for 24h at 37^0C.

Secondary selective enrichment is made on two mediums, a higher selective one (Rappaport-Vassiliadis with soy broth) and one less selective (Muller-Kaufmann tetrathionate broth with Novobiocin (MKTTn) that will allow development to other related species).Take 0,1 ml BPW into 10 ml RVS Broth for 24h at 42^0C and 10ml BPW into 100ml MKTTn Broth for 24h at 37^0C.

For selective isolation will be used two solide environments, one more selective (ADCL) 24h at 37 ^{0}C and another one less selective as Istrati-Meitert, on this environment the colonies are green. For confirmation take five suspected colony from each plate and streak on nutrient agar, incubation for 24h at 37^0C.The confirmation was made on T.S.I., M.I.U. and API 20E.

In the study initiated we pursued lactic acid sol. 1% action over microbial strains.. Decontamination solution was prepared by dilution of 1 % of L(+) lactic acid) in water.

pH measuring was done using a pH meter. It's efficacy was evaluated according 29th (1) article from E.C.178/2002 regulation.

RESULTS AND DISCUSSION

With all that *Salmonella* is recognized as the most important pathogen associated to fowl, it is not known with exactness the sickness incidentally at man owing to fowl consume.

A significant contamination occurs after evisceration. It can appear without a visible contamination with feces.

Immediate after slaughter carcasses are immersed in water tanks at 5-15^0 C. In these tanks is realized the carcasses wash, followed by cooling to 4^0C in special rooms.

Some of the carcasses after evisceration have a raised microbial load and represents a contamination source.

In many countries are used various methods to diminish the pathogens load from carcasses surface. There are used physical methods as water flush, immersion of the carcasses in hot water and acid solution.

The use of lactic acid (LA) solutions at concentrations of 1–2% reduces (0.8–2.3 log units) the bacterial counts on poultry carcasses immediately after slaughter and during storage, without affecting organoleptic characteristics such as colour and flavour (Smulders 1995; USDA-FSIS 1996; Dincer 2002).

Smulders, F.J.M in 1995 determinates that lactic acid is efficient in reducing the microbiological load with 90-99% and pathogens with 30-90%.

Bacterial incidents from *Salmonella* gender in/on fowl is variable from one geographical area to another one, reported data alternates between 4 and 100%. The incidence is major influenced by factors such as growth, process and climate conditions. There are countries (Sweden) where fowl is *Salmonella* free, stage reached afterwards applying some governmental control programs and measurements applied by fowl breeders and food processor.

In slaughterhouses is processed a high number of birds (thousands birds/hour) with the same installation resulted carcasses being very close, crossed contamination being more frequently.

A significant contamination occurs after evisceration. It can appear without a visible contamination with feces.

Immediate after slaughter carcasses are immersed in water tanks at 5-15^0 C. In these tanks is realized the carcasses wash, followed by cooling to 4^0C in special rooms.

Some of the carcasses after evisceration have a raised microbial load and represents a contamination source.

Found results indicates a 14,06% from fresh, 7,8% from frozen (4^0C) carcasses, and *Salmonella* free from freezing (-18^0C) carcasses. (Tabelul nr. 1)

Tabelul nr. 1. *Salmonella spp.values from fresh, frozen and freezing carcasses*

Poultry carcasses	Samples nr.	Positive samples		Negative samples	
		Nr.	%	Nr.	%
Fresh	64	9	14,06%	55	85,9%
Frozen	64	5	7,8%	59	92,1%
Freezing	64	-	-	64	100%

In order to reduce the microorganisms load water used for carcasses wash is treated with lactic acid sol.1%. Reducing the pH microorganisms' growth is stopped and in this way is limited Salmonella spp. (Tabelul nr.2.)

Tabelul nr. 2. *Salmonella spp values from fresh carcasses after immersion in Lactic acid solution 1%*

Species	samples	Without lactic acid 1%				With lactic acid 1%			
		Positive samples		Negative samples		Positive samples		Negative samples	
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Salmonella spp.	64	9	14	55	85,9	3	4,6	61	95,3

After primary treatment with lactic acid sol. 1%, carcasses were refrigerated for 24h. In order to observe the concomitant bacteriostaic effect of low temperature and low pH environment samples were gathered after refrigeration. (Tabelul nr. 3.)

Combined bacteriostaic effect, of both pH and low temperature, proved to be very effective against monitored pathogen, *Salmonella spp..*

Tabelul nr. 3. *Salmonella spp. values after treatment with Lactic acid solution 1% and refrigeration*

Species	samples	With lactic acid 1%				4^0C With lactic acid 1%			
		Positive samples		Negative samples		Positive samples		Negative samples	
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Salmonella. spp	64	3	4,6	61	95,3	1	1,5	63	98,4

CONCLUSIONS

1. The washing tank represents an important source of contamination.
2. Potential sources of *Salmonella spp*.for people is poultry meat.
3. *Salmonella* in the food its importance as a food-borne pathogen,particularly in the poultry sector.
4. Organic acids have an important antimicrobial role
5. Changing water PH with a lactic acid solution 1% reduced *Salmonella spp*. growth;
6. Lactic acid is used frequently in food industry because of its powerful antimicrobial

REFERENCES

1. **Carp-Cărare M.**, - **(2001)** - Microbiologie veterinară,Casa de editură , Venus, Iaşi
2. **Corry,J.E.L., V.M. Allen, W.R. Hudson, M.F. Breslin, and R.H. Davies - (2002)-** Sources of Salmonella on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control .J.Appl.Microb.92:424-432
3. D'Aoust, J-Y. (1989), "Salmonella", in Doyle, M.P. (Ed.), Foodborne Bacterial Pathogens, Chapter 9, Marcel Dekker Inc., New York, NY, pp. 327-445.
4. **Dincer A.H. – (2002)** - Effects of some organic acids and phosphates on shelf life of turkey breast meat. PhD Thesis. Graduate School of natural and Applied Sciences,Ege University, Izmir-Turkey
5. **EFSA (2004a),** European Food Standards Agency, available at: www.efsa.eu.int/science/biohaz / biohaz_opinions/723_en.htm
6. **6. Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R., Bolton, F.J., Frost, J.A., Ward, L., Humphrey, T.J.,- (2002).** Prevalence and numbers of of Salmonella and Campylobacter spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbiology 76, 151– 164
7. **7.Snijders, J.M.A., Van Logtestijn, J.G., Mossel, D.A.A., and Smulders, J.M.**,- **(1985)** - Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. Vet. Q. 7 : 277-282.

8. 8.**Smulders, F.J.M** 1995. *Preservation by microbial decontamination; the surface treatment of meats by organic acids*, in *New Methods of Food Preservation,* Gould, G.W., Ed., Chapman and Hall, London, 253.
9. **9.Şindilar E., Grecianu Al., Verdeş Elena, Carp – Cărare M.,** - **(1988)** - Izolarea şi identificarea microflorei psichrotrofe de pe carcasele de pasăre conservate prin frig.; Lucrări ştiinţifice Institutul Agronomic Iaşi, vol. 31, 81 – 83.
10. **10.Şindilar E., Grecianu Al., Verdeş Elena, Carp – Cărare M.**,- (1989) - Unele aspecte privind sursele de poluare a cărnii de pasăre cu floră microflora psichrotrofă, - Rezumatele lucrărilor ştiinţifice ale „Seminarului ştiinţific", Institutul Agronomic Iaşi, 18.
11. **11.Van der Marel, G.M., Van Logtestijn, J.G., and Mossel, D.A.A.**,- **(1988)** - Bacteriological quality of broiler carcasses as affected by in plant acid decontamination. Int. J. Food Microbiol., 6 :31-42.
12. *http://www.fsis.usda.gov/OA/haccp/imphaccp.htm, 1996.

TESTAREA *IN VITRO* A EFECTULUI INHIBITOR A UNOR PRODUSE APICOLE ŞI EXTRACTE VEGETALE ASUPRA ALGELOR DIN GENUL *PROTOTHECA*

THE INHIBITORY EFFECT OF SOME BEE PRODUCTS AND VEGETAL EXTRACTS UPON PROTOTHECA ALGAE IN VITRO GROWTH

CUC Cosmina, RĂPUNTEAN Gh., FIŢ N., CHIRILĂ F., NADĂŞ G., CĂLINA Daniela
FMV Cluj-Napoca

For both humans and animals protothecosis therapy, the researches of the latest years are mentioning an increased resistance of the Prototheca strains to the majority usual antimicrobials. A natural alternative to classical therapy was aimed, so 12 Prototheca zopfii strains isolated from mastitic milk cows samples, and one referent P. wickerhamii strain (RE-4608014 ATCC 16529), were tested regarding the capacity of some bee products and vegetal extracts to inhibit their "in vitro" growth. From the products tested, for all P. zopfii strains the best results were registered for propolis tincture (21,4 mm) and polioel 3 (16,2mm) and for P. wickerhamii the highest efficiency was registered for: propolis tincure (22mm), royal jelly (21mm), meltonic (19mm) and polioel 3 (18mm).

În 1894, Wilhelm Krüger, a izolat pentru prima dată de pe scoarţa copacilor un gen de alge unicelulare, nepigmentate, pe care apoi l-a denumit *Prototheca*. Acest gen grupează microorganisme care au un ciclu de viaţă şi morfologia similare algelor, dar sunt heterotrofice şi aclorofilice, ceea ce le apropie mai mult de fungi [1, 2, 8].

Au fost izolate dintr-o varietate de surse ale mediului exterior cum ar fi: pământul umed din jurul arborilor, scoarţa copacilor, ape reziduale, ape curgătoare acide, ape dulci, ape sărate, bazine piscicole, bazine de înot etc. [3, 6, 12]. Izolarea a mai fost raportată de pe furaje verzi, din adăposturi, rigole de gunoi, lapte, aparatele de muls, tancurile utilizate la transportul laptelui, pardoseala adăposturilor, fecalele unor animale [4, 5, 7].

Genul incude numeroase specii însă trei dintre ele sunt mai importante: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora*.

Sub raport patogenetic, speciile de *Prototheca* sunt considerate ca fiind agenţi etiologici exogeni, cu capacitate patogenă minimă. Cel mai adesea *P. zopfii* este incriminată în procese patogenetice la animale, iar *P. wickerhamii* la om, fără a se putea face totuşi o delimitare strictă.

Dintre animale o sensibilitate mai pronunţată o au vacile, la care se constată enzootii de mastită şi câinii, la care se descriu infecţii sistemice, cel mai adesea digestive dominate de enterită hemoragică sau cu afectarea ochilor şi a aparatului auditiv (orbire şi surzenie) [5, 9, 13]. La om infecţiile au fost descrise mai ales la indivizii cu diferite forme de imunosupresie, diabet, transplant renal, leucemie, sau după tratamente intensive cu antibiotice [10, 11, 14].

Datorită faptului că în general prototecozele sunt refractare la tratamentul cu antibiotice şi chimioterapice, în lucrarea de faţă ne-am propus să testăm eficienţa unor produse apicole şi extracte din plante care să poată fi utilizate ca o alternativă la tratamentul obişnuit.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările s-au desfăşurat în perioada martie – mai 2007, în cadrul Laboratorului de Microbiologie, al Facultăţii de Medicină Veterinară din Cluj-Napoca.

Testarea s-a efectuat pe 12 tulpini de *Prototheca zopfii* (izolate din probe de lapte de la vaci cu mastită) şi o tulpină de referinţă de *P. wickerhamii* (RE-4608014 ATCC 16529). Pentru fiecare dintre tulpinile testate s-a efectuat iniţial o suspensie în bulion glucozat, cu o densitate care corespunde tubului 1 de pe scara McFarland, iar apoi s-a procedat la însămânţarea în gazon a unei plăci cu agar glucozat. După îndepărtarea excesului de lichid, plăcile s-au introdus la termostat pentru uscarea suprafeţei, iar apoi s-au practicat godeuri folosind o matriţă cu diametrul de 3 mm. Similar tehnicii de plasare a microcomprimatelor pentru antibiogramă, s-a recurs la plasarea circulară a produselor apicole în testare, numerotând locul de plasare a primului produs, ultimul fiind plasat central. Produsele testate au fost următoarele:

- **Polioel 3** – este un extract uleios de *Artemisia annua* (mălin), *Pimpinella anisum* (anason, chimion) şi *Hyssopus officinalis* (cimru, isop). Acţiunea celor trei extracte vegetale este antimalarică, antivirală (reprimă SIDA după unii autori), expectorantă, antispastică, diuretică, hipotensivă, antilitiazică, antireumatică, cicatrizantă, dar cel mai important efect se consideră cel antiparazitar.
- **Miere** – este un produs apicol complex ce conţine apă, glucide (65-75%), polen (până la 1%), vitamine, amino-acizi sau proteine, minerale, enzime, pigmenţi, compuşi aromatici, etc. Are acţiune benefică în boli cardiace, respiratorii, digestive, arsuri, dermatomicoze, boli nervoase, etc.
- **Tinctură de propolis** – soluţie alcoolică de propolis conţinând minimum 1% flavonoizi totali; are un spectru larg de utilizare, datorită substanţelor conţinute: balsamuri, uleiuri eterice, substanţe analgezice, flavone şi rezine.
- **Propoderm cremă** – conţine extract de propolis, ceară, cetaceum, lanolină, ulei de parafină, fiind un produs omogen de culoare galben-brun, cu miros caracteristic. Produsul este destinat îngrijirii zonelor corpului expuse unor factori de agresiune cum ar fi produsele chimice de curăţenie, razele solare, vântul, frigul, etc.
- **Apireven cremă** – conţine extract de propolis, ceară, lanolină, ulei de parafină, cetaceum, extract capsici, camfor, nicotinat de metil, soluţie de venin de albine. Se recomandă a fi utilizat în scopul menţinerii unei stări de confort şi relaxării musculare.
- **Meltonic** - este un produs dietetic, pe bază de polen, tinctură de păpădie (*Taraxacum officinale*), tinctură de rostopască (*Chelidonium majus*) şi miere. Rolul produsului este de protector şi stimulent hepatic.
- **Lăptişor de matcă** – este un produs glandular, secretat de albinele tinere, pentru hrănirea larvelor şi a mătcii. Are un conţinut bogat în substanţe proteice, grăsimi, hidrocarbonaţi, substanţe minerale, vitamine, hormoni, enzime şi factori vitali specifici. Are efect vitalizant, de tonifiere şi regenerare asupra organismului, fiind uşor asimilabil.

După plasarea produselor, plăcile au fost incubate la 37°C, iar interpretarea s-a făcut după două zile.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Testarea de produse apicole şi utilizarea lor în terapie a luat amploare în ultimii ani, iar referitor la capacitatea acestora de a inhiba dezvoltarea „*in vitro*" a algelor din genul *Prototheca*, produsele tinctură de propolis şi polioel 3 au dat cele mai bune rezultate per ansamblul tulpinilor de *P. zopfii* testate (fig.1)

P. wickerhamii s-a dovedit a fi sensibilă la următoarele produse: tinctură de propolis (22 mm), lăptişor de matcă (21 mm), meltonic (19 mm) şi polioel 3 (fig. 2).

Rezultatele obţinute la testarea produselor apicole şi a extractelor vegetale sunt sintetizate în tabelul de mai jos:

Rezultatele obţinute la testarea sensibilităţii tulpinilor de Prototheca la produsele apicole şi extractele vegetale (valorile reprezintă diametrul zonelor de inhibiţie, în mm)

Produsele testate	Numărul tulpinilor (bold) – valorile reprezintă diametrul zonei de inhibiţie (mm)												
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**P. w**
Polioel 3	10	16	12	20	15	20	20	18	14	15	15	20	18
Miere	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tinctură de propolis	19	22	21	22	21	22	24	22	22	21	19	20	22
Propoderm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
Apireven	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Meltonic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
Lăptişor de matcă	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21

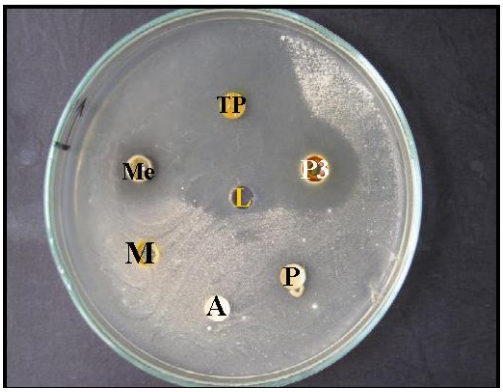


Fig. 1, Prototheca zopfii (tulpina 12) – eficinţa produselor apicole şi a extractelor vegetale: tinctura de propolis (TP), polioel 3 (P3), propoderm (P), apireven (A), miere (M), meltonic (Me), lăptişor de matcă (L).

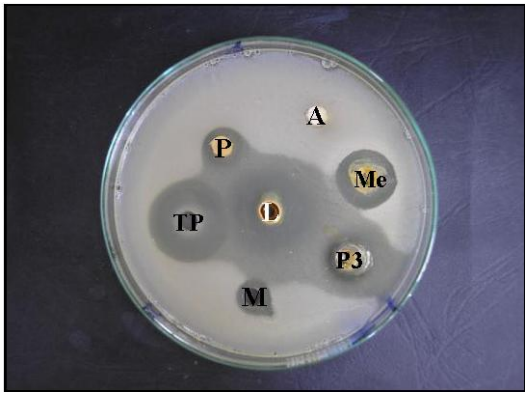


Fig. 2, P. wckehamii - eficienţă ridicată pentru: tinctura de propolis (TP), lăptişor de matcă (L), polioel 3 (P3) şi meltonic (Me).

În graficul de mai jos redăm comparativ media diametrelor de inhibiție, pentru ambele specii de *Prototheca* testate (fig. 3).

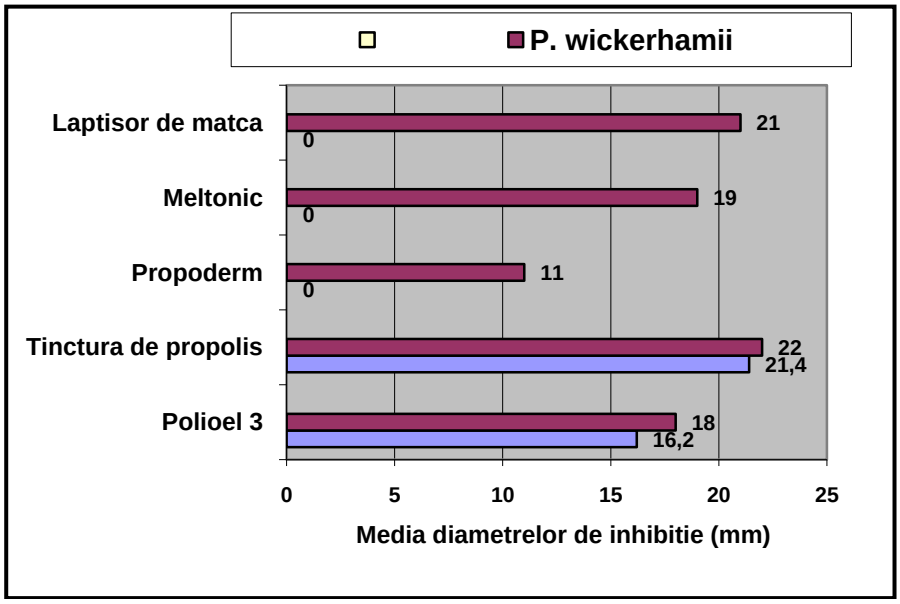


Fig. 3, Eficienţa medie a produselor apicole şi a extractelor vegetale pentru ambele specii de Prototheca

Atât pentru *P. zopfii* cât şi pentru *P. wickerhamii*, cel mai eficient produs s-a dovedit a fi tinctura de propolis, urmată de polioel 3. Pentru ambele produse menționate *P. wickerhamii* a dezvoltat o sensibilitate mai pronunțată şi în plus față de *P. zopfii* o eficiență ridicată a fost înregistrată față de lăptişorul de matcă şi meltonic.

CONCLUZII

1. Produsele apicole şi extractele vegetale testate s-au dovedit a fi eficiente asupra ambelor specii de *Prototheca* testate.
2. Toate cele 12 tulpini de *P. zopfii* testate, au demonstrat o eficienţă ridicată faţă de tinctura de propolis (21,4) şi polioel 3 (16, 2).
3. *P. wickerhamii* a dovedit o sensibilitate mai ridicată pentru: tinctura de propolis (22), lăptişor de matcă (21), meltonic (19) şi polioel 3 (18).

BIBLIOGRAFIE

1. ARNOLD P., D.G. AHEARN, (1992), The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamenta*, Mycologia, 64, 265-275;
2. ATKINSON A.W., B.E.S GUNNING, P.C.L. JOHN, (1972), Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: Ultrastructure, chemistry and incorporation of ^{14}C-acetate, studied in synchronous cultures, Planta, 107, 1-32;
3. COX G.E., J.D. WILSON, P. BROWN, (1974), Protothecosis: a case of disseminated algal infection, Lancet ii, 379-382;
4. CUC COSMINA, S. RĂPUNTEAN, N. FIŢ, DANIELA CĂLINA, G. NADĂŞ, (2007), Cultural characterization of some *Prototheca zopfii* strains isolated from mastitic cows, Al 8-lea Congres de Buiatrie, Gura Humorului, Rev. Rom. Med. Vet., 17, (2), 228-234;
5. GONZALES N.R., (1996), Prototheca, yeast and Bacillus as a Cause of Mastitis – Natural Mastitis Council Annual Meeting Precedings, 85;
6. IACOVIELLO V., P. GIOROLAMI, J. LUCARINI, K. SUTKER, M. WILLIAMAMS AND C. WANKE, (1992), Protothecosis complicating prelonged endotracheae intubation: case report and literature review, Clin. Inf. Dis., 15, 959-967;
7. MOUBAMBA DIEUDONNÉ, P. DESMET, P. E. LAGNEAU, DANIELLE SWINNE, (1997), La protothecose bovine en Belgique – Inst. De Med. Tropic. Lab. Mycol., Nationalstraat 155-B-2000, Antwerpen 1;
8. PORE R.S., (1972), Nutritional basis for relating *Prototheca* and *Chlorella*, can J. Microbiol., 18, 1175-1178.
9. PORE R.S., T. A. SHAHAN, M. D. PORE, R. BLAUWIEKEL, (1987) – Occurance of *P. zopfii* a mastitis pathogen in milk – Veterinary Microbiology, 15, (4), 315-323;
10. RĂPUNTEAN GH., S. RĂPUNTEAN, (1999), Importanţa algelor unicelulare pentru patologia veterinară - Rev. Rom. Med. Vet., 9, (3), 233-246;
11. RĂPUNTEAN S., (2002) “Studiu asupra algelor unicelulare din genul *Prototheca*: aspecte epidemiologice, morfoculturale, biochimice, antigenice şi semnificaţie etio-patogenetică”- Teză de doctorat, Cluj-Napoca;
12. TUNEY I., A. SUKATAR, (2006), Association of *Prototheca* species and protothecosis in man and animals, Reviews in Medical Microbiology, 17 (3), 77-82;
13. TYLER D.E., şi col. (1980), Diseminated Protothecosis with Central Nervous System Involvment in a Dog – JAVMA, 176, 987-993;
14. WOOLORICH A., E. KOESTENBLATT, P. DON, W. SZANIAWSKI, (1994), Cutaneous prototecosis and AIDS – J. Amer. Acad. Dermatol., 31, (5/II), 920-924.

CHANGES OF THE SANGUINE PARAMETERS IN IMMUNOSUPPRESSED MICE INFECTED WITH *Y. ENTEROCOLITICA*

CUMPĂNĂŞOIU C., TÎRZIU E., NICHITA Ileana, GROS R.V., SÎRBU Cristina
FMV Timişoara

The researches, conducted on 25 ordinary mice, aged tow months, divided into five experimental lots, have observed the evolution of main sanguine parameters following experimental infection with Yersinia enterocolitica.

We would like to mention that, four out of the five lots have had an immunosuppressor treatment with Dexametazone, and at tow out of the five lots have been administered antibiotics. The blood samples collected from each mouse have been analyzed in order to determine the quantity of hemoglobin, red blood cell number, total with blood cells and the leukocyte formula. The obtained results have shown a cellular immune response in all four lots with the inversion of white blood cells/neutrophiles ratio, mentioning that, at the lots where antibiotics haven't been administered, the response was more intense.

Key words: yersiniosys, mice, sanguine parameters

Yersiniosys is a bacteriosys diagnosed frequently in rodents, but also in other species and in humans, characterized by progressive weight loss, adenopathia, and the appearance of cazeous lumps in organs and on serous. Presently, yersiniosys is considered an infectious disease produced by *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* (4, 5).

In mice, the main lesion is represented by the pseudotuberculosis lump, which has necrosis in the middle, with or with ought the tendency to encapsulate. Lumps are present in the intestinal wall, especially in the jejunum and ileum, including local lymphatic formations, mesenteric lymph nodules, liver, spleen, kidneys, and lungs and have the tendency to turn into abscesses. It is also observed the atrophy of intestinal vili and the hyperplasia of the epithelium in the mucosa of the small intestine (1, 2, 3).

In the present work we studied changes in some sanguine parameters at mice experimentally infected with *Y. enterocolitica* while their immune system is suppressed following a treatment with Dexametazone.

MATERIALS AND METHODS

The researches have been conducted on 25 conventional mice, aged two months, divided into five experimental lots. At four out of the five lots Dexametazone has been administered in a dosage of 0.75 mg/kg and also a culture in liquid medium of *Y. enterocolitica* 0.5 ml (NTG 10^{-6}). The first two lots have been treated with cloramfenicol and ciprofloxacin in the third day post infection. Lot number five got neither the immunosuppressive treatment nor the experimental infection with *Y. enterocolitica*. Seven days post infection, all mice have been euthanatized, collecting blood samples by cutting the jugular vein. For each sample it has been analyzed the quantity of hemoglobin, total red blood cells, total with cells and the leukocyte formula.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Results obtained regarding the evolution of the main sanguine parameters in the treated immunosuppressed mice and in the witness lot are shown in table 1.

Table 1

Evolution of some sanguine parameters in mice experimentally infected with Y. enterocolitica

Batch	Sample number	Hb g (%)	Erythrocytes mil/mm^3	Leukocytes mii/mm^3	Leukocytary formula				
					L	N	E	B	M
I	**1**	10,86	7,35	3,4	66	28	4	1	1
	2	11,70	8,31	3,0	70	26	2	1	1
	3	11.79	8,18	2,0	67	27	3	2	1
	4	11,78	8,78	2,4	63	31	2	3	1
	5	11,79	8,15	3,4	65	28	3	4	1
	$\bar{x}$	**11,78**	**8,15**	**2,8**	**66,2***	**28,0***	**3,2**	**2,2**	**1,0**
II	**1**	10,70	8,52	3,0	70	22	3	3	2
	2	11,65	7,44	2,7	66	26	3	3	2
	3	11,30	7,80	3,1	80	19	1	0	0
	4	12,47	8,30	3,3	77	21	1	1	0
	5	12,00	8,19	3,7	74	18	3	2	3
	$\bar{x}$	**11,62**	**8,05**	**3,07**	**73,4**	**21,2***	**2,2**	**1,8**	**1,4**
III	**1**	9,30	6,10	2,5	60	34	2	3	1
	2	11,09	6,90	2,9	59	37	2	2	0
	3	12,46	7,11	2,9	66	29	1	3	1
	4	11,32	7,46	3,2	69	25	2	3	1
	5	10,64	8,10	2,2	75	20	1	4	0
	$\bar{x}$	**10,96**	**7,13**	**2,83**	**65,8***	**29,0***	**1,6**	**3,0**	**0,6**
IV	**1**	11,64	8,50	3,2	60	33	3	2	2
	2	12,20	7,65	2,8	60	35	2	2	1
	3	9,50	4,61	2,6	78	19	1	2	0
	4	11,60	7,40	2,5	66	29	2	3	0
	5	10,85	6,73	2,5	64	31	3	1	1
	$\bar{x}$	**11,16**	**6,98**	**2,7**	**65,6***	**29,4***	**2,2**	**2,0**	**0,8**
V	**1**	11,32	6,32	2,9	82	15	2	1	0
	2	10,84	8,12	3,4	75	18	3	2	2
	3	12,55	7,10	2,5	80	16	2	1	1
	4	11,60	7,98	2,6	81	15	1	2	1
	5	12,10	8,34	3,9	87	12	1	0	0
	$\bar{x}$	**11,67**	**7,53**	**2,97**	**81,0**	**15,2**	**1,8**	**1,2**	**0,8**

Significant differences (P<0, 05)

It hasn't been noticed important differences, at the limit of 0.05, between the witness lot and the immunosuppressed lots treated and untreated, regarding the quantity of hemoglobin, total red blood cells and white cells. Important differences have been noticed in the number of lymphocyte and neutrophyle. In the immunosuppressed lots the lymphocyte number decreases compared with the neutrophyle, the ratio of those last one growing especially in the lots that haven't been treated with antibiotics.

The number of eosinophiles and neutrophiles doesn't show important differences among the four imunosuppressed lots. Only in lot number three it has been registered a semnificative growth of basophiles compared to the witness, this fact being appreciated as an individual variation of the lot and not a reaction to the studied factors.

Considering the processed data, we might say that the experimental infection with *Y. enterocolitica* hasn't influenced meaningfully the evolution of the studied sanguine parameters. The alteration of lymphocytes/neutrophyles ratio at the infected lots referred to the witness lot it is influenced by the action of the immunosuppresor but it is also the consequence of the intensification of the cellular immune response, mainly at the mice from lot three and four, where the medical treatment hasn't been used.

Eosinophiles and neutrophiles haven't shown any meaningful variations in none of the lots. This allows us to assert that experimental infection with *Y. enterocolitica* doesn't influence the presence of these cells.

Monocites have been observed in small numbers in all the studied lots, therefore we can't compare the experimental lots with the witness lot.

Evidentially we can state that the experimental infection with *Y. enterocolitica* determines a cellular immune response in mice, even if immunosuppressor treatments have been used.

CONCLUSIONS

Infection with *Yersinia enterocolitica* in adult immunosupressed mice determines an immune response, mainly of cellular nature.

The alter of lymphocyte/neutrophyles ratio has been present in all experimental lots, mentioning that in lots three and four, who didn't get medical treatment, the alteration was more conclusive.

Experimental infection with *Yersinia enterocolitica* in adult mice doesn't influence in a significant matter the sanguine parameters: hemoglobin, red blood cells, white cells and leukocyte formula.

REFERENCES

1. *Gogarten, W., K Ö ckerling, A., Fromm, M., Riecken, E.O., Schulzke, J.D.* - Effect of acute *Yersinia enterocolitica* infection on intestinal barrier function in the mouse, Scandinavian Journal of Gastroenterology, Vol. 29, 1994, 814 – 819.
2. *Goure, J., Broz, P., Attrere, O., Cornelis, G.R., Attree, I.* - Protective anti - V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia translocon* assembly within host membranes. J. Infect. Dis. 2005, 192(2): 218-25.
3. *Moga Mânzat, R.* – Boli infecţioase ale animalelor. Ed. Brumar, Timişoara, 2001
4. *Pelludat, C., Hogardt, M., Heesemann, J.* - Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O: 8 high-pathogenicity Island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. Infect. Immun. 2002, 70(4):1832-41.
5. *Sing, A., Tvardovskaia, N., Rost, D., Kirschning, C.J., Wagner, H., Heesemann, J.* - Contribution of toll-like receptors 2 and 4 in an oral *Yersinia enterocolitica* mouse infection model. Int. J. Med. Microbiol. 2003, 293(5): 341-8.

INCIDENCE AND PREVALENCE OF SALMONELLA SPP. INFECTIONS IN BIRD POPULATIONS FROM VÂLCEA COUNTY

CUMPĂNĂŞOIU C.[1], TÎRZIU E.[1], CUMPĂNĂŞOIU C.E.[1], CEAUŞESCU A.[2]
[1]FMV Timisoara
[2]DSVSA VÂLCEA

The researches' goal was to distinguish the presence of Salmonella spp. in chicken used for production and reproduction, broilers and avian products onto 5001 samples, divided over a period of four years, according to the "Strategic program for the control of salmonellas" in Vâlcea county.

Following the examination of the samples, there have been identified 54 positive samples, mentioning that Salmonella hadar has been identified in a percent of 90.7%. The maximum amount of samples have been identified in the year 2006 - 39 samples (72.2%), 12 positive samples in 2007 (2.2%) and only 3 samples in 2008 (5.6%).

Key words: salmonella, incidence, bird

Avian salmonellosis constitutes for most of the countries with a developed intensive system, one of the most important sanitary-veterinary problem due to economical losses as well as for the involvement of those organisms in human health by triggering food poisonings following the ingestion of contaminated products (2).

Also, the infections with *Salmonella* spp. are responsible for the presence of an appreciably amount of acute and chronicle diseases in different species of domestic or wild birds. It is thought that over 80% of *Salmonella* strains pathogenic for mammals have been isolated from birds. The presence of the infections caused by salmonellas in private and industrial avian growing systems and the contamination of avian products constitutes a clear and present danger for public health (3, 4, 5, 6, 7).

Researches performed over the last few years have proved that over 90% of the broiler chickens, and over 85% of turkeys and 45% of hens are bearer of salmonellas (1).

This paper, through the performed researches, has studied the incidence of salmonellas in Vâlcea county, in hens for production, hens for reproductions, broilers and avian products, over a period of four years.

MATERIALS AND METHODS

There have been collected fecal and organ samples from chickens and hens with no clinical signs of salmonellosis. In the case of fecal samples there were mainly specimens, each consisting of fresh distinct specimens of fecal matters, each with a weight of minimum one gram, collected randomly from many locations of the farm where the birds are located.

From the dead bodies there have been collected samples of intestinal matter and growth supports have been sawed with samples from organs and bone marrow.

In the case of avian products, the samples have been collected from bird carcasses, organs (liver, spleen) and assortments resulted after butchery (back, drum sticks, etc.).

The number of samples collected every year was in concordance with the "Strategic program for the control of avian salmonellas", mentioning that, when the amount of samples was higher, an additional number of samples have been collected.

The collected samples have been analyzed in the lab of bacteriology of DSVSA Vâlcea. Bacteriological exams have been performed in order to determinate the species of salmonella by observing morphological, cultural and biochemical features.

We would like to mention that, in order to identify the species, have been used procedures recommended by the reference community lab-SR EN ISO 6579/AC 2006 and SR EN ISO 6579/A1 2007. The obtained results have been processed and are presented in the tables.

RESULTS AND DISCUSSIONS

During the four years taken into consideration, a number of 5001 samples have been examined, as follows: 710 samples in the year 2005, 843 samples in the year 2006, 2183 samples in

the year 2007 and 1259 samples in the year 2008 (table 1). The number of samples is correlated with the strategic program for each of the four years.

Table 1
Examined samples of avian meat and organs during the period 2005 - 2008

Type of sample		Year 2005		Year 2006		Year 2007		Year 2008	
		A	I	A	I	A	I	A	I
Hens for eggs	**Total**	171	-	190	-	253	-	229	-
	growth	124	-	132	-	178	-	142	-
	adults	47	-	58	-	75	-	87	-
Hens for reproduction	**Total**	88	-	73	-	84	-	94	-
	growth	57	-	47	-	54	-	66	-
	adults	37	-	26	-	31	-	28	-
Broilers		164	-	243	-	973	2	284	3
Poultry meat and products		287	-	343	39	873	10	652	-

Legend: A - analyzed samples; I – isolated samples

Following bacteriological exams, from the total of 5001 samples, 54 were positive, the identified serotypes being: *Salmonella hadar* (30.7%), *Salmonella glostrup* (7.4%) and *Salmonella typhimurium map* (1.9%) (table 2).

Table 2
Results of the bacteriological exam

	Serotypes	**54**
Isolated salmonella strains	*Salmonella hadar*	49
	Salmonella glostrup	4
	Salmonella typhimurium map	1

Analyzing the acquired results, it is ascertained that most of the positive samples have been diagnosed in the year 2006 (39), mentioning that all the samples have originated from avian meat and organs.

The results from 2006 have enforced for the year 2007, the examination a much higher number of samples (2183) in order to identify the primary contamination. It can be noticed from table 1 that the positive samples, in a much smaller number (12) have originated mainly from avian meat and organs (10), although two positive samples have been identified in broiler chickens. During the first three months of 2008, from the 1259 samples that have been examined, have been diagnosed as positive only three samples collected from broilers.

Considering the requests of the European Commission (Direction nr. 142/21 June 2006) for diminishing the prevalence of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella hadar*, *Salmonella infantis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella virchow*, we can state that, on the territory of Vâlcea county, from the species mentioned above, there has been identified only *Salmonella hadar* (49 out of 54).

We would like to mention, as a positive aspect, the decreasing tendency in the presence of this specie in particular, and of salmonellas in general, in the year 2008 there have been identified only 3 positive samples, simultaneously with a serious medical treatment and the carrying out of a correct disinfection and pest control.

CONCLUSIONS

Bacteriological exams performed over a period of four years (5001 samples) have revealed that, the main isolated serotype is *Salmonella hadar*, which was isolated in a high percent (90.7%) against *Salmonella glostrup* (7.4%) and *Salmonella typhimurium map* (1.9%).

The maximum number of positive samples has been identified in the year 2006 (39 positive samples), afterwards, although the number of analyzed samples was much higher (2183 against 843), in the year 2007, only 12 positive samples have been identified, in the year 2008 the number dropping at only three.

The obtained results are in accordance with the request of the European Commission which enforces a reduction in the prevalence of avian salmonellosis.

REFERENCES

1. *Maciorowski, K.G., Jones, F.T., Pillai, S.D., Ricke, S.C.* - Incidence, sources, and control of food borne *Salmonella spp.* in poultry feeds. 2004, World's Poultry Science Journal, Vol. 60, 446-457
2. *Moga Mânzat, R.* – Boli infecţioase ale animalelor. Ed. Brumar, Timişoara, 2001
3. *Pereira, C.S., Medeiros, L.M., Costa, R.G., Festivo, M.L., Reis, E.M.F., Seki, L.M., Rodrigues, D.P.* - Phage Typing and Multidrug resistance profile in *Salmonella typhimurium* isolated from different sources in Brazil from 1999-2004. 2007, Braz. J. Microbiol., 38:385-390.
4. *Ribeiro, A.R., Kellermann, A., Santos, L.R., Fittél, A.P., Nascimento, V.P.* - Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar *hadar* isoladas de carcaças de frango. 2006, Arq. Inst. Biol., 73: 357-360.
5. *Rowe, B., Hall, M.L., Ward, L.R., Sa, J.D.* - Epidemic spread of *Salmonella hadar* in England and Wales. 1980, Br Med J., 280 (6221): 1065 –1066
6. *Soler, P., González-Sanz, R., Bleda, M.J., Hernández, G., Echeíta, A., Usera, M.A.* - Antimicrobial resistance in non-typhoidal *Salmonella* from human sources, Spain, 2001-2003. 2006, J. Antimicrob. Chemother. 58: 310-314.
7. *Valdezate, S., Echeita, A., Diez, R., Chuchaga, S., Aladuena, A., Usera, M.* - Characterization of *Salmonella hadar*: an emerging food borne gastroenteritis pathogen in Europe. Chemother. 1999, 26-29; 39: 692

INVESTIGAŢII PRIVIND MODIFICĂRILE PARAMETRILOR HEMATOLOGICI LA TAURINE DIAGNOSTICATE SEROPOZITIV PENTRU VIRUSUL LEUCOZEI BOVINE (VLB)

INVESTIGATIONS ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS MODIFICATION IN CATTLE POSITIVELY DIAGNOSED WITH THE BOVINE LEUKOSIS VIRUS (BLV)

DAMACEANU Ani[1], MARCU Elena[2]
[1]DSVSA Vaslui
[2]FMV Iaşi

Enzootic bovine leucosis is produced by a retrovirus called bovine leukosis virus (BLV), affecting B lymphocytes, T lymphocytes and the monocytes. BLV infected cows may develop in the first stage of the disease a persistent lymphocytose (20-30% of seropositive cows, according to the literature), and at advanced stages of the disease, infected animals could develop the lymphoproliferative disease (the lymphosarcoma occurring in 1-3% of infected animals).

In this study, haematological investigations have been carried out on 29 adult cows (6-13 years old) originating from Vaslui county, with positive results at ELISA test for BLV.

Results on leucocyte parameters allowed us to group the animals in 3 sets: The "A" set, including animals with leukocytosis (total averaged circulating leucocytes being 21.99 ± 6.5 thousands /µl) and persistent lymphocytosis (Lf 13.8 ± 6.0 thousand/µl); set "B", including animals with leukocytosis (total averaged circulating leukocytes of 13.22 ± 2.43 thousands/µl) and moderate lymphocytosis (Lf 6.38 ± 0.5 thousands / µl); set "C", including animals without leukocytosis (total leucocytes 8.24 ± 1.13 thousands/µl) and without lymphocytosis (Lf 3.45 ± 0.7 thousands/µl). The values recorded in lots A and B are significantly higher than those found in a control group of cows with negative results on ELISA test for VLB (total leukocytes 9.05 ± 0.82 thousands/µl; Lf 3.8 ± 0.28 thousands/µl). In sets A and B an increase in the value of the absolute number of neutrophil has been recorded, neutrophilia being an indicator of the opportunistic bacterial infections occurring as a result of the reduced immunity of the cattle infected with the BLV. The number of monocytes for groups A and B showed higher values, the increase being statistically significant for lot A: 1.37 ± 0.57 thousands/µl (monocytosis is the indicator showing the chronicity of the disease). Changes in the erythrocyte parameters reveals a tendency towards hypochromic normocytic anemia for all A, B and C sets, while the wide variations in the number of trombocytes reveals different individual reactions, from thrombocytopenia to thrombocytosis.

Key words: Bovine leukaemia virus (BLV), hematology, cattle, ELISA test persistent lymphocytosis, non-lymphocytosis, monocytosis

Leucoza enzootică bovină este o boală virală cronică produsă de un retrovirus – virusul leucozei bovine (VLB), cu organizare structurală similară virusurilor leucemice T umane (HTLV1 şi HTLV2), având aceleaşi valenţe imunosupresoare şi oncogene. VLB infectează limfocitele B pe care le transformă în celule "nemuritoare", inducând limfocitoza persistentă non-neoplazică, din stadiul iniţial al bolii. Deşi celulele B s-au dovedit a fi ţinta primară a VLB, studiile ultimelor decenii arată că şi limfocitele T, precum şi monocitele sunt infectate de VLB, acestea contribuind la dezvoltarea bolii limfoproliferative din stadiile tardive ale leucozei enzootice bovine (leucemie, limfosarcom) (1, 2, 3, 5, 7).

In prezentul studiu, se evidenţiază modificările hematologice eritrocitare, leucocitare şi trombocitare înregistrate la o populaţie de taurine adulte (în vârstă de 6-13 ani) de pe teritoriul judeţului Vaslui, la care testul ELISA pentru VLB a fost pozitiv, dar la care nu s-au manifestat semnele clinice de boală limfoproliferativă.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au luat în studiu un număr de 29 taurine din rasa Holstein, femele, cu vârste cuprinse între 6 şi 13 ani, care au fost diagnosticate pozitiv pentru VLB (virusul leucozei bovine) prin testul serologic ELISA. In funcţie de prezenţa şi gradul leucocitozei şi limfocitozei diagnosticate prin examenul hematologic, animalele au fost grupate în 3 loturi: lotul A, reprezentat de 9 vaci cu leucocitoză şi limfocitoză accentuată (Lf peste 7,5 mii/µl), lotul B, reprezentat de 5 vaci cu leucocitoză şi limfocitoză moderată (Lf între 5,5 şi 7,5 mii/µl) şi lotul C, reprezentat de 15 vaci fără leucocitoză şi limfocitoză (Lf sub 5,5 mii/µl). S-a investigat şi un lot martor reprezentat de 5 vaci adulte, cuprinse între 6 şi 11 ani, cu rezultate negative la examenul serologic ELISA pentru VLB.

Determinările hematologice s-au efectuat cu ajutorul analizatorului hematologic automat MS-4,5 utilizând probe de sânge recoltate pe EDTA.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute sunt prezentate în tabelele 1, 2 şi 3.

Variaţiile constantelor sanguine eritrocitare prezentate în tabelul 1 relevă faptul că vacile adulte seropozitive pentru VLB prezintă anemie normocitară hipocromă.

Tabel 1 Variaţii ale parametrilor seriei eritrocitare la taurine adulte (vârsta peste 6 ani) cu reacţie seropozitivă pentru virusul leucozei bovine (VLB), diferenţiate pe loturi în funcţie de prezenţa sau absenţa limfocitozei persistente (lot A – Lf peste 7500/µl; lot B – Lf între 5500-7500/µl; lot C Lf sub 5500/µl)

Lot	**n**	**E x 10^6/µl**	**Hb g/dl**	**Ht %**	**HEM pg**	**VEM fl**	**CHEM g/dl m.e.**
A	9	5,84 ± 0,37	8,80 ± 0,33	32,10 ± 1,44	15,06 ± 0,91	55,21 ± 3,53	27,38 ± 0,25
B	5	5,76 ± 0,69	8,94 ± 0,97	32,84 ± 3,31	15,50 ± 0,68	57,48 ± 4,26	27,14 ± 0,81
C	15	5,50 ± 0,51	8,30 ± 0,63	30,85 ± 1,82	15,10 ± 1,00	56,51 ± 4,61	26,82 ± 0,58
Lot martor (VLB neg.)	6	6,28 ± 0,48	9,20 ± 0,10	33,15 ± 0,05	14,65 ± 0,95	53,15 ± 53,15	29,70 ± 0,33
Valori de referinţă (Schalm, 1986)		***7,00 (5,00-10,00)***	***11,0 (8,0-15,0)***	***35,0 (24,0-46,0)***	***14,0 (11,0-17,0)***	***52,0 (40,0-60,0)***	***32,7 (30,0-36,0)***

Tabel 2 Variaţii ale leucocitelor totale circulante şi difertenţiate la bovine (în vârstă de 6 – 13 ani) pozitive VLB cu limfocitoză persistentă accentuată (lot A - Lf peste 7,5x10^3/µl), cu limfocitoză de grad redus (lot B – Lf 5,5-7,5 x10^3/µl) şi fără limfocitoză (lot C – Lf sub 5,5 x10^3/µl)

Loturi taurine	**n**	**L mii/µl**	**Neutrofile**		**Eozinofile**		**Ba**	**Monocite**		**Limfocite**	
			%	**mii/µl**	**%**	**mii/µl**	**%**	**%**	**mii/µl**	**%**	**mii/µl**
A	9	**21,99 ± 6,50**	**30,14 ± 9,00**	6,06 ± 0,66	3,39 ± 1,35	0,73 ± 0,40	0,33 ± 0,19	6,06 ± 1,47	**1,37 ± 0,57**	42,20 ± 8,89	**13,80 ± 6,00**
B	5	**13,22 ± 2,43**	**40,94 ± 6,95**	5,62 ± 1,94	4,10 ± 1,36	0,56 ± 0,19	0,26 ± 0,11	5,06 ± 0,75	0,68 ± 0,18	49,64 ± 7,25	6,38 ± 0,50
C	15	8,24 ± 1,13	43,63 ± 6,42	3,64 ± 0,78	8,63 ± 3,16	0,72 ± 0,32	0,49 ± 0,21	4,89 ± 0,81	0,40 ± 0,05	42,37 ± 7,84	3,45 ± 0,70
Lot martor (VLB negativ)	6	9,05 ± 0,82	46,85 ± 3,32	4,00 ± 0,78	3,4 ± 1,70	0,3 ± 0,14	0,65 ± 0,21	4,45 ± 0,64	0,4 ± 0,01	41,65 ± 2,78	3,8 ± 0,28
Valori de referinţă (Schalm, 1986)		***8,0 (4,0-12,0)***	***28,5 (15,0-47,0)***	***2,02 (0,6-4,12)***	***9,0 (2,0-20,0)***	***0,7 (0-2,4)***	***0,5 (0-2,0)***	***4,0 (2,0-7,0)***	***0,4 (0,02-0,84)***	***58,0 (45,0-75,0)***	***4,5 (2,5-7,5)***

Spre deosebire de valorile de referinţă citate în literatura de specialitate, valorile medii găsite de noi, atât la taurinele seropozitive, cât şi la cele seronegative VLB, s-au situat la limita inferioară pentru E şi Hb, au oscilat în jurul valorii medii de referinţă pentru Ht, VEM şi CHEM şi au fost mai mici pentru CHEM.

Comparând valorile parametrilor eritrocitari de la taurinele seropozitive VLB (loturile A, B, C) cu cele de la taurinele seronegative VLB, remarcăm valori uşor mai scăzute ale E şi Hb pentru toate loturile seropozitive VLB, acestea înregistrând totodată şi o creştere nesemnificativă a VEM. Putem discuta de o tendinţă la anemie normocitară hipocromă a animalelor cu reacţie seropozitivă VLB, indiferent de gradul de instalare a limfocitozei persistente. Diferenţele privind valorile parametrilor eritrocitari între loturile A, B şi C, toate fiind seorpozitive VLB, dar cu grade diferite de limfocitoză sau fără limfocitoză, nu sunt semnificative statistic.

Variaţiile constantelor sanguine leucocitare la taurinele seropozitive pentru virusul leucozei bovine ne-au permis încadrarea animalelor investigate în leucemice şi aleucemice, cu limfocitoză pronunţată, limfocitoză de grad redus şi fără limfocitoză.

Analizând datele din tabelul 2, se constată o creştere a numărului de leucocite totale circulante peste limita superioară a valorilor de referinţă la loturile A şi B, leucocitoza fiind extrem de pronunţată la lotul A (21,99 ± 6,50 mii/µl), de grad redus la lotul B (13,22 ± 2,43 mii/µl) şi absentă la lotul C (8,24 ± 1,13 mii/µl), în timp ce lotul martor cu rezultate negative la examenul serologic pentru VLB a prezentat un număr mediu de leucocite totale de 9,05 ± 0,82 mii/µl, valoare ce se încadrează în limitele de referinţă ale speciei. In acelaşi mod variază valorile medii pentru numărul de neutrofile, înregistrându-se o creştere a acestuia la lotul A (6,06 ± 0,66 mii/µl) şi lotul B (5,62 ± 1,94 mii/µl), faţă de lotul C şi lotul martor, la acestea din urmă valorile medii încadrându-se în limitele de referinţă ale specii (3,64 ± 0,78 mii/µl; respectiv 4,00 ± 0,78 mii/µl). In ceea ce priveşte valorile procentuale şi absolute ale numărului de eozinofile şi bazofile la toate animalele investigate, acestea s-au încadrat în limitele normale cunoscute, iar diferenţele între loturi au fost nesemnificative. Valorile medii ale numărului de monocite au evidenţiat o creştere semnificativă la lotul A (1,37 ± 0,57 mii/µl), comparativ cu lotul martor (0,4 ± 0,01 mii/µl), o redusă creşte nesemnificativă la lotul B (0,68 ± 0,16 mii/µl), în timp ce lotul C a prezentat o valoare medie identică cu a lotului martor (0,4 ± 0,05 mii/µl). Monocitoza evidenţiată la lotul A, ca şi tendinţa de creştere a monocitelor la lotul B constituie un indicator al evoluţiei cronice a leucozei enzootice bovine.

Limfocitoza ce caracterizează, conform datelor din literatura de specialitate 20-30 % din vacile cu leucoza enzootică bovină în primul stadiu de evoluţie (4, 5), s-a înregistrat în prezentul studiu la 14 din cele 29 de bovine seropozitive, ceea ce reprezintă un procent de 48,27 %. O valoare medie a numărului de limfocite de 13,8 ± 6,0 mii/µl, crescută distinct semnificativ faţă de valoarea lotului martor seronegativ (3,8 ± 0,28 mii/µl) a fost caracteristică lotului A, care a prezentat şi o leucocitoză evidentă, cu neutrofilie şi monocitoză. Este cunoscut faptul că la animalele infectate cu virusul leucozei bovine se produce o alterare a sistemului imun, crescând astfel susceptibilitatea la infecţii bacteriene oportuniste, unele dintre ele subclinice (6, 7). Lotul B, cu limfocitoză de grad redus a prezentat o valoare medie a numărului de limfocite de 6,38 ± 0,50 mii/µl, valoare crescută faţă de media înregistrată la lotul C, seropozitiv, fără limfocitoză (3,45 ± 0,70 mii/µl). Deşi valorile absolute ale numărului de limfocite la animalele din lotul B se încadrează în limitele de referinţă ale speciei (2,5-7,5 mii/µl), conform cheii Comunităţii Economice Europene de diagnosticare a LEB, includem în categoria animalelor cu limfocitoză persistentă, bovinele în vârstă de peste 6 ani care au un număr de limfocite mai mare de 5,5 mii/µl (1, 3, 5).

Variaţiile constantelor sanguine trombocitare (plachetare) la taurinele seropozitive pentru VLB, conform datelor din tabelul 3, relevă variaţii între loturile diferenţiate după gradul de limfocitoză, ca şi între acestea şi lotul martor VLB negativ.

La taurinele din lotul A, seropozitive pentru VLB, leucemice şi cu limfocitoză accentuată, numărul de plachete (trombocite) a fost în medie de 556,44 ± 255,44 mii/µl, valoare ce se încadrează în limitele de referinţă ale speciei (100 – 800 mii/µl), dar care este semnificativ mai scăzută decât la lotul martor negativ pentru VLB (684,50 ± 60,33 mii/µl). Lotul B, reprezentat de vaci seropozitive pentru VLB, leucemice, dar cu un grad redus de limfocitoză, a prezentat valoarea medie cea mai scăzută de plachete sanguine – 344,20 ± 97,93 mii/µl, diferenţă semnificativă faţă de lotul martor. Lotul C, reprezentat de vaci seropozitive pentru VLB, dar aleucemice, fără limfocitoză, au avut un număr mediu de plachete sanguine de 667,87 ± 127,88 mii/µl, valoare redusă nesemnificativ faţă de media lotului martor.

Tabel 3 Variaţii ale parametrilor seriei trombocitare (plachetare) la taurine adulte (vârsta peste 6 ani) cu reacţie seropozitivă pentru virusul leucozei bovine (VLB), diferenţiate pe loturi în funcţie de prezenţa sau absenţa limfocitozei persistente (lot A – Lf peste 7500/µl; lot B – Lf între 5500-7500/µl; lot C Lf sub 5500/µl)

Loturi taurine investigate	n	Plt. (T) mii/µl	VPM fl
A	9	556,44 ± 255,44	5,83 ± 0,13
B	5	**344,20 ± 97,93**	5,78 ± 0,18
C	15	667,87 ± 127,88	5,71 ± 0,11
Lot martor VLB neg	6	684,50 ± 60,33	5,65 ± 0,17
Valori de referinţă (Schalm, 1986)		***500 (100-800)***	
Valori de referinţă aparat MS 4-5		***100-800***	***3,0-8,0***

In ceea ce priveşte volumul plachetar mediu (VPM), nu s-au înregistrat variaţii semnificative între loturile luate în studiu, valorile medii ale acestora încadrându-se în limitele de referinţă cunoscute.

CONCLUZII

1. In funcţie de variaţiile numărului de leucocite totale circulante şi ale valorii absolute a limfocitelor, taurinele adulte ELISA pozitive pentru VLB s-au încadrat în 3 grupe: A. vaci cu leucocitoză şi limfocitoză persistentă – L 21,99 ± 6,5 mii/µl şi Lf 13,8 ± 6,0 mii/µl); B. vaci cu leucocitoză şi limfocitoză redusă – L 13,22 ± 2,43 mii/µl şi Lf 6,38 ± 0,5 mii/µl; C. vaci fără limfocitoză – L 3,45 ± 0,7 mii/µl.
2. Taurinele adulte cu rezultate pozitive la testul ELISA pentru VLB (loturile A, B şi C) au înregistrat valori mai scăzute ale E, Hb, Ht şi CHEM decât taurinele din aceeaşi categorie de vârstă VLB negative (lotul martor); tendinţa către o stare de anemie normocitară hipocromă este mai net evidenţiată la categoria de taurine VLB pozitive fără limfocitoză (lotul C).
3. La taurinele din lotul A s-a înregistrat şi o creştere a numărului de monocite – 1, 37 ± 0,57 mii/µl, monocitoza fiind indicator al evoluţiei cronice a leucozei enzootice bovine.
4. La categoriile de taurine cu limfocitoză accentuată (lotul A) şi redusă (lotul B) s-a înregistrat şi o creştere a valorii absolute a neutrofilelor – 6,06 ± 066 mii/µl, respectiv 5,62 ± 1,64 mii/µl, neutrofilia fiind indicator al infecţiilor bacteriene oportuniste apărute ca rezultat al alterării sistemului imun de către VLB.
5. Numărul de plachete sanguine a prezentat valorile cele mai scăzute la lotul B (cu grad redus de limfocitoză) – 344,2 ± 97,93 mii/µl, fără a ajunge însă sub limita inferioară a speciei. Nu se poate vorbi de o tendinţă la trombocitopenie, deoarece variaţiile în cadrul loturilor cu reacţie seropozitivă pentru VLB au fost extrem de largi, de la trombocitopenie la trombocitoză.

BIBLIOGRAFIE

1. **BARNA, I., GH. PÂRVU, C. IUGAN** – *Leucozele şi bolile de imunosupresie SIDA-like la animale*, Ed. Ceres, Bucureşti, 1995.
2. **DEQUIEDT, F. et al. –** *Bovine Leukemia Virus-Induced Persistent Lymphocytosis in Cattle Does Not Correlate with Increased Ex Vivo Survival of Lymphocytes*, Journal of Virology, 73 (2), 1127-1137, 1999.
3. **JAIN, N.C.** - *Schalm's Veterinary Hematology*. Lea-Febiger, Philadelphia, 1986.
4. **KALE, M., F. OZTÜRK –** *An investigation of enzootic bovine leucosis (ELB) infection by agar gel immunodiffusion (AGID), enzyme linked immunosorbent assayn (ELISA) tests and haematological applications on the dairy cows in the Burdur region*, Acta Veterinaria (Beograd), 54 (2, 3), 163-173, 2004.
5. **MIRSKY, M.L. et al. -** *The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection*, Journal of Virology, 70 (4), 2178-2183, 1996.
6. **SANDEV, N., MARIANA KOLEVA, R. BINEV, DARINKA ILIEVA** – *Influence of enyootic leukosis virus upon the incidence mastitis in cowa at a different stage of infection*, Veterinarski Arhiv, 74 (6), 411- 416, 2004.
7. **TRAININ, Z., J. BRENNER** – *The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle*, Israel Journal of Vet.Med., 60 (4), 94-97, 2005.

ARCHAEZOOLOGICAL STUDIES OF INFERIOR PANNONIA - A ROMAN PROVINCE NEXT TO DACIA –

DAMIAN A., GUDEA Al., LISOVSCHI C., STAN F., TUNS M.F.
FMV Cluj-Napoca

Statistical investigations concerning archeological research from a Roman province - inferior Panonia: are carried, out in this paper Soprov - Scorbatina Roman town - forum, Albertfalva - civil settlement, pevious Szakàley - Rèti Földek - rural settlement Acsvospusztal - previous Roman, Sremska Mitrovico - Roman town, Budapesta Aquineum - Roman town, and Tàc - Gorsium - Roman town, were studied.

Research was realized during 1974 – 1998. Fauna spectrum on sites situated in the mentioned localities from inferior Panonia is presented. Bone pieces are distributed on the main identified species: Bos taurus, sheep, goats, Eqvus cabalus, Sus scrofa domesticus, Canis domesticus, Catus, Cervus elaphus, Capreolus capreolus, Sus scrofa ferus, Gallus, Lepus, etc. Osteometric data from the main bone pieces obtained on species are also presented. Finally are presented considerations concerning the main animals' characteristics.

Key words: archeo-zoological research, statistical investigations

Panonia province had a Celtic population. It was conquered during Augustus time (27 b.H. – 6 p.H.) and colonized with Italic populations. The province was high urbanized and militarized. During Traianus government, after Dacia conquest (105 – 106 p.H.) the province wad divided in Superior Panonia in West, and Inferior Panonia along the Danube.

The relief is flat, depending on Danube, and Sosa, and Drava rivers. The province is known as having a high development in animals rearing and agriculture.

This province too, as others, have a high importance for Dacia, because part of Dacian colonists had their origin in this province. Also, part of military units from Dacia became from this province and not at last, the economical relationships, the domestic animals brought by Romans respectively, has this province as origin.

MATERIAL AND METHOD

All archeological research from the localities of above mention province realized during 1974 – 1998 were studied, and their results analyzed on osteological pieces emphasizing the faunistic spectrum on sites, localities, and species.

Primary tables, on localities, species with osteological pieces number, were realized, also investigating the osteometric data on the main bone pieces identified. A very accurate recording of animal traits from the studied area was noted.

RESULTS AND DISCUSSION

Osteological analyses on settlements

Panonia inferior province

The studied fauna samples became from the following archeological sites:

Faunistic spectrum on sites:

- Sopron - Scarbatina - Roman town – forum (Bököny, 1986);

	Nr	%	NMI	%
Bos taurus	997	63.10	37	31.62
Ovicaprinae	166	10.51	23	19.66
Eqvus caballus	113	7.15	9	7.69
Sus scrofa domesticus	256	16,2	33	28.21
Canis domesticus	23	1.45	6	6.13
Catus	2	0.13	2	1.71
Cervus elaphus	8	-	-	-
Capreolus capreolus	5	-	-	-
Sus scrofa ferus	9	-	-	-
Gallus	17	1.08	5	4.27
Lepus	3	-	-	-

- Albertfalva – civil settlement, fort (Choyke, 1992, 1993);

	Nr	%	NMI	%
Bos taurus	63	40.9	-	-
Ovicaprinae	36	23.3	-	-
Eqvus caballus	5	3.2	-	-
Sus scrofa domesticus	43	27.9	-	-
Canis domesticus	1	0.6	-	-
Cervus elaphus	2	1.2	-	-
Sus scrofa ferus	1	0.6	-	-
Gallus	3	1.9	-	-

- Szakàley – Rèti Földek - rural settlement (Vörös, 1982);

	Nr	%	NMI	%
Bos taurus	559	57.2	-	-
Ovicaprinae	140	14.0	-	-
Eqvus caballus	54	5.5	-	-
Sus scrofa domesticus	163	16.6	-	-
Canis domesticus	17	1.7	-	-
Cervus elaphus	23	2.3	-	-
Sus scrofa ferus	9	0.9	-	-
Gallus	8	0.8	-	-
Capreolus capreolus	4	0.4	-	-

- Acs - Vaspuszta –Roman fort (Barosiewicz, 1989);

	Nr.	%	NMI	%
Bos taurus	81	50.0	-	-
Ovicaprinae	23	14.1	-	-
Eqvus caballus	9	5.5	-	-
Sus scrofa domesticus	43	26.5	-	-
Canis domesticus	1	0.6	-	-
Cervus elaphus	2	1.2	-	-
Gallus	1	0.6	-	-
Capreolus capreolus	2	1.2	-	-

- Sremska Mitrovica, Sirmium - Roman town, hippodrome (Giliç, 1994): concerning this site, the author refers only to identified equine bones. It is an enough large sample (230 fragments) attributed to 8 individuals. In prelevated sample predominates the axial skeleton bones, especially mandible fragments and isolated teeth, but also exists some complete long bones of members which permit to realize considerations concerning animals' characteristics.
- Budapesta - Aquineum - Roman town (Choyke, 1998): considering that the paper concerns especially the distribution and animals characteristics generally, and that bones becoming from many places of the Roman town were analyzed, the author prefers not to use exact numbers (NISP), using only a graphic representation from which we note that the cattle represents over 10 - 40%, followed by swine, 5 – 20%. Canidaes (dog), equine, and hen were identified in low proportions.

- Tàc – Gorsium – Roman town (Bököny, 1974)

	Nr.	%	NMI	%
Bos taurus	6781	33.95	458	31.0
Ovicaprinae	4274	21.41	332	22.45
Eqvus caballus	1499	7.52	110	7.45
Equus asinus	17	0.085	7	0.47
Sus scrofa domesticus	3172	15.88	257	17.39
Canis domesticus	3132	15.68	95	6.43
Felis catus	49	0.24	19	1.28
Cervus elaphus	37	0.19	9	0.61
Gallus	665	3.33	98	6.63
Capreolus capreolus	5	0.02	3	0.2
Lepus europaeus	45	0.22	10	0.68
Meles meles	2	0.01	1	0.07
Vulpes vulpes	3	0.0150	2	0.14
Canis lupus	1	0.005	1	0.07
Sus scrofa ferus	30	0.15	8	0.54
Bos primigenius	49	0.24	10	0.68

Osteometric data

- Sopron - Scarbatina - Roman town – forum (Bököny, 1986)

Specie	Anatomical element	Ltot	Lep	Led
Bos taurus	***Radius***	276-330 mm (299 mm)	86-92	42-55
	Metacarpus	171-220 (196,1 mm)	47-69	26.5-35
	Astragalus	57-64 (60.5 mm)	-	-
	Calcaneus	113-141 (128 mm)	-	-
	Metatarsus	192-264 (229.6 mm)	37,56	25.5-37
Ovicaprinae	*Metacarpus*	138	24,7	17,8
Sus scrofa domesticus	Astragalus	42	26	-
	M III	28-35	-	-
Eqvus cabalus	Tibia	360	96	46.5
	Astragalus	62-65	-	-
	Metatarsus	260	46	37
Canis fam	Humerus	165	30.5	25

- Albertfalva – civil settlement, fort (Choyke, 1992, 1993)

Specie	Anatomical element	Ltot	Lep	Led
Bos taurus	***Radius***	305	88	84.1
Ovicaprinae	*Metatars*	-	22.9	-
Sus scrofa domesticus	Radius	-	30.6	-
Eqvus cabalus	Phalans I	97.6	59.5	-
	Tibia	365.0	98.9	77.7
	Metatarsus	273.0	52.1	49.5

- Szakàley – Rèti Földek - rural settlement (Vörös, 1982)

Specie	Anatomical element	Ltot	Lep	Led
Bos taurus	***Radius***	283-303	74-87	43-45
	M 3	31-42 (36.4)	-	-
	Tibia	332	88	42
	Metatarsus	254-213	55-51	34-33
	Astragalus	73-55 (63)	-	-
Ovicaprinae	*Metacarpus*	110	19	14
	M 3	23,4	-	-
	Astragalus	32	-	-
Sus scrofa domesticus	Astragalus	30-50	-	-
	Calcaneus	68	-	-
Eqvus cabalus	Metacarpus	226	47-49	39-35
	Astragalus	52-54	-	-
Canis dom	-	Complete skeleton (2 pieces)	-	-

- Acs - Vaspuszta - Roman fort (Barosiewicz, 1989): Die to the small sample, the author did not used the metric data, preferring only a comparison with the situation from Tàc – Gorsium.
- Sremska Mitrovica - Sirmium - Roman town, hippodrome (Giliç, 1994)

Specie	Anatomical element	Ltot	Lep	Led
Eqvus cabalus	***Metacarpus***	221	48.6	49
		241.5	53.1	49.7
		241	52.3	50.7
		242.5	50	49.1
		240	50.8	49.3
		229	48.2	44.6
		240	50.8	50.1
		249	52.9	48.6
		242.1	53.7	52.8
		230	47.8	45.1
		233.5	49.5	46.5
		248.5	55.8	49
	Media	238.175	51.125	48.70833
	Mediana	240.5	51.125	49.05
	Metatarsus	297.5	52.7	50.3
		266.5	48.2	51.4
		280	50.8	47.5
		284.5	-	48.2
		238.5	52.4	50.2
		254	49.5	50.3
		289	51.3	50.9
	Media	272.8571	51.06667	49.82857
	Mediana	280	51.3	50.3
	Tibia	347.8	99.5	77
		390	106	76
	Radius	351.5	78.2	74.7
		363	81.6	77.2
	Humerus	286.5	-	-
	Calcaneus	114.6	-	-
		117.2	-	-

- Budapesta - Aquineum – Roman town (Choyke, 1998)

Specie	Anatomical element	Ltot	Lep	Led
Bos taurus	***Metacarpus***	210	46	-
		240	47.5	-
		215.4	43.6	-
		203.6	42	-
		201.5	41.8	-
		212.2	45	-
		210	44.5	-
		244	51.7	-
		211.1	39.0	-
		227	48.6	-

- Tàc – Gorsium – Roman town (Bököny, 1974). We have no metric data, because we do not have the original paper.

Animals characteristics

Sopron - Scarbatina - Roman town – forum (Bököny, 1986):

Cattle: Is the most important specie from alimentary point of view both considering the identified pieces number, and estimated number of individuals. Division on ages shows the adults predomination – 26 individuals, young individuals being only 6, other categories being low represented. This means that the animals were slaughtered at conventional age of 3 – 3.5 years old (Udrescu, 1999). At least 2 types of cattle could be identified: primigenious and brachicerous types. Primigenious type has origin in Italy, being the superior, improved type. Brachicerous type belongs to the local not improved type. The author also presumes the presence of a third type, resulted from crossings between above mentioned types. The identification was performed considering the cranial types, the ratio between brachicerous : primigenious : mix types being of 9:6:3. Calculated sizes are variable enough, but the author observes the clear distinction between both types - brachicerous and primigenious. Brachicerous type cattle had size between 105.6 – 122.8, and for primigenius 126.6 – 144.4 cm. Animals' destination is clear – utility first (work), milk production, then alimentary.

Sheep and goats: The second category of alimentary importance is represented by sheep and goats, both as remainders number and individuals numbers. Individuals belonging to Capra genus were identified, the ratio between sheep and goats being of 29:14. Adult individuals are predominant (55%) followed by young individuals (25%). This means that animals over 3.5 years of age 18 months respectively were slaughtered (Udrescu, 1999). Calculated size is 67 cm. Animals destination is for food consumption in a higher proportion than in cattle, but must not be neglected the aspect of wool and milk production.

Swine: It is the third specie as importance (number of remainders and individuals). Adult animals are predominant (56%) and young animals too (34%). Size is not estimated for this specie, but based on an astragalus length we can calculate this value, obtaining with Teichert factors (Udrescu, 1999) 77.4 cm. The author specifies that in this sit were found primitive, not improved animals, representing the transition between the wild and domestic stage, existing no improving interest as in cattle. The author underlines the importance and strictly alimentary destination of this specie, showing the use of meat dried or smoked based on processing traces from the bone surface.

Equine: Animals age is not mentioned, but is clear that majority of individuals are adults. Due to the existence of some long bones the size could be calculated. Values begin with 138.5 up to 142.5, with an average about 1.40 m. Animals identified in Sopron belongs to thin extremities class as Brauner scale shows. Utility was the main destination of the animals, but the author did not excluded the alimentary destination.

Canidae: The identified dogs were in majority adults. Calculated seizes considering the long bones show the existence of some animals with sizes between 55.6 – 47.9 cm, being animals with average and high size (Udrescu, 1999).

Birds: The studied reminders show a low number of bones belonging to hen. Based on metric data, the author consider that they became from low dimensions individuals, belonging to a local not

improved race. A single individual belonging to *Gallus* genus could belong to an improved race, with an Italic origin, as author presumes.

Bones belonging to domestic goose (*Anser anser*) were also identified. The author did not offer more data concerning this specie.

CONCLUSION

Considering the data obtained using all analyzes, we can conclude:

- The most important species in Roman provinces situated in Dacia neighborhood are domestic, being represented by large ruminants (cattle), swine, small ruminants (sheep and goats), equine (horse), birds (gallinaceae), and dog. Wild species (stag, deer, wild boar) are of low importance.
- The proportions between these species are constant relatively, existing low variations between them. Low differences appear due to the different character of the sites (town–civil settlement, rustic village, forts, etc.). The hunting species are rather insignificant in faunistic spectrum.
- In food were almost exclusively used large ruminants, swine, and small ruminants. Gallinacea (hen) were of low alimentary importance. Equine meat use in food remains a disputed problem, especially due to the fact that some evidences concerning this hypothesis exists (Haimovici, 1996; Bököny, 1986, etc). Dog bones presence in domestic bones does not proof the alimentary consumption.
- The quoted studies did not approach important problems as those concerning veterinary medicine (diseases, healing, etc.), or some aspects of medical practice (geldings, etc.), except some cases (Szakály – Rèti Földek – Vörös, 1982), but some breeding problems, and systematic and controlled animal rearing aspects are emphasized.

REFERENCES

1. Damian, A., C.Lisovschi-Cheleşanu, 1999, The way of processing the osteological pieces in the Intra-carpathians area of Romanian during the first Iron Age, Bul. USAMV Cluj-Napoca.
2. Giurco, I, N.Gudea, C.Lisovschi, 1992, Studiul paleofaunistic al materialului osos descoperit în locuinţa LM-1 din sectorul LM al oraşului roman Porolissum, în Acta MP XVI.
3. Gudea,Al., 2007, Contributii la istoria economica a Daciei Romane – Studiu arheozoologic, Cluj-Napoca, Editura Mega.
4. Lisovschi, C., A.Gudea, A.Damian, I.Paşca, 1994, Investigaţii osteologice preliminare asupra paleofaunei descoperită în clădirea vămii din oraşul Porolissum, în Acta MP XVIII.
5. Lisovschi, C., A.Gudea, 1996, Analiza materialului osos apărut în clădirea vămii în Porolissum. Monografie arheologică.

ACTUALITATI IN DIAGNOSTICUL PARVOVIROZEI CANINE SI BOLII CARRÉ

ACTUALITIES IN CANINE PARVOVIROSIS AND CANINE DISTEMPER

DANEŞ Doina[1], BARAITAREANU S.[1], COBZARIU D.[1], DANEŞ M.[2]
[1]FMV Bucureşti
[2]INMV Pasteur

Necesitatea furnizarii unor rezultate sigure intr-un timp scurt a determinat clinica veterinara a animalelor de companie sa apeleze la metodele de diagnostic rapid imunocromatografic.Usurinta utilizarii si rapiditatea obtinerii rezultatului recomanda acest tip de teste in diagnosticul parvovirozei canine si bolii Carre. Concepute să identifice antigene sau anticorpi (IgM, IgG) testele rapide sunt folosite individual sau complementar in protocoale de diagnostic ce se doresc a fi cat mai precise.

Din pacate, ignorarea sau necunoasterea principiilor imunologice care au stat la

baza dezvoltarii metodelor de diagnostic rapid imunoenzimatice sau ImmunoComb au dus la obtinerea unor rezultate neconcordante cu simptomatologia sau inutilizabile in managementul bolii.

Interesul practicienilor fata de comunicarile noastre anterioare pe aceasta tema, ne-a determinat sa detaliem mecanismele imunologice ce stau la baza metodelor de diagnostic rapid imunocromatografic. In aceasta lucrare este explicata si corelația dintre patogeneza infecțiilor cu virusul parvovirozei canine CPV si virusul bolii Carré CDV şi posibilele rezultatele furnizate de aceste teste, in funcție de proba cercetată.

Decizia utilizării unuia sau mai multor metode de diagnostic rapid în diagnosticul de confirmare a parvovirozei canine şi bolii Carré îşi are baza în datele epidemiologice şi clinice relevante pentru identificarea stadiului evolutiv al bolii şi implicit a relației agent patogen-organism.

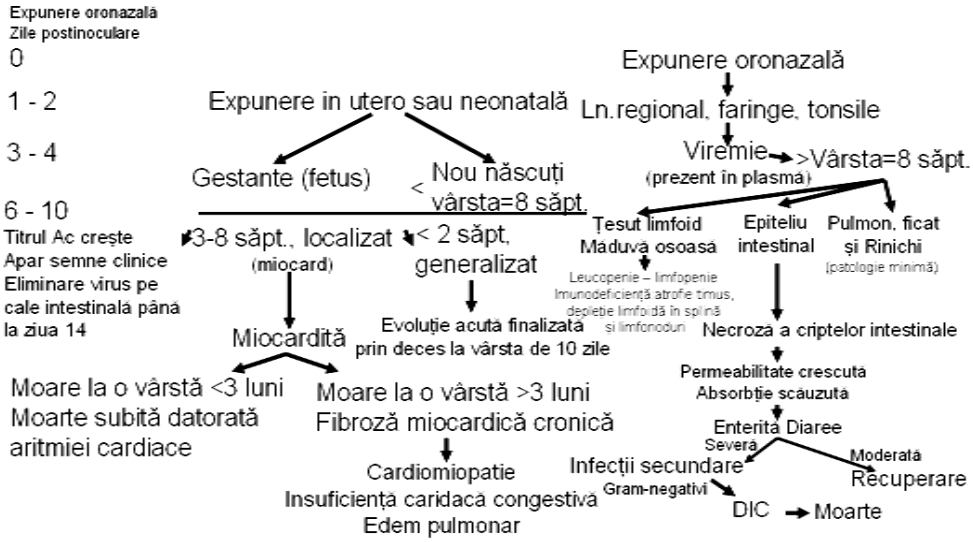
Cuvinte cheie: CPV, CDV, diagnostic de confimare, caine,imunologie

Deopotriva *CPV* si *CDV* se constituie in agenti patogeni extrem de importanti in managementul sanitar veterinar al caniselor, pensiunilor canine, spitalelor, adaposturilor precum si in activitatea de zi cu zi din cabinetele medicale veterinare.

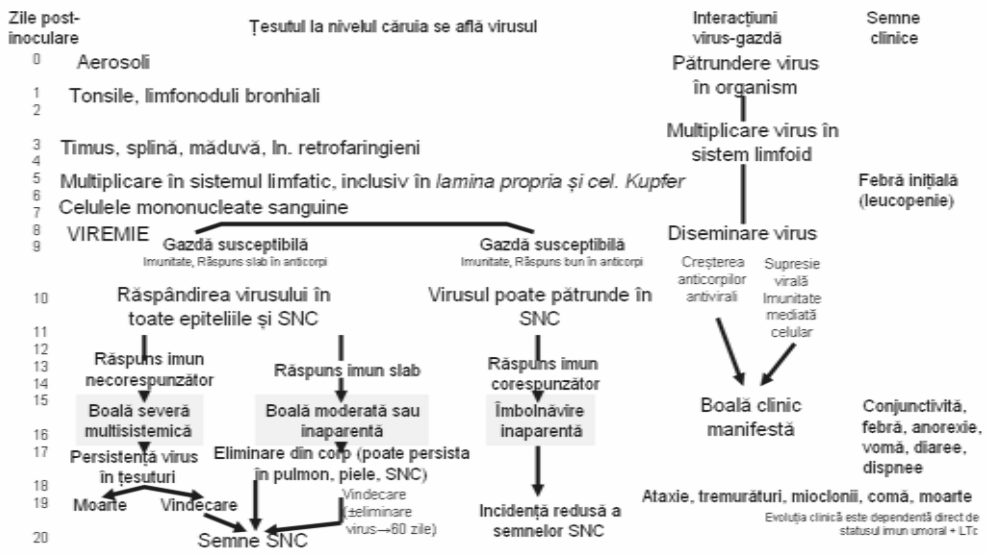
Semiotica celor doua boli, cu aparitia tot mai frecventa a formelor atipice a dus in ultimul timp la creșterea insucceselor terapeutice. Ca in orice boala și in paroviroza canina și boala Carré recuperararea are sanse mult mai mari daca se intervine din timp cu tratament specific. Un asemenea deziderat ar fi posibil prin confirmarea suspiciunii de boala inca de la primele semne, dar aceasta presupune elaborarea unor protocoale de monitorizare si diagnostic care trebuie sa tina cont de patogeneza si metodele de diagnostic disponibile.

La acest moment mecanismele generale ale patogenezei infectiei cu CPV și CDV sunt in mare mare masura cunoscute (schemele 1 și 2), fiind cunoscut timpul necesar restructurarilor imunologice, durata viremiei, prezentei virusurilor in diferite secretii si excretiii, precum si dinamica anticorpilor maternali și postvaccinali.

Corelarea acestor timpi cu specificatiile testelor de diagnostic disponibile creste fidelitatea rezultatelor obtinute prin interpretarea distincta a tipului de proba biologica investihată.



Schema 1. Patogeneza infectiei cu CPV



Schema 2. Patogeneza infectiei cu CDV

Introducerea testelor de diagnostic rapid în protocoalele de diagnostic ajuta la identificarea rapidă a câinilor care au venit în contact cu agentul cercetat şi creştere siguranta programelor de supraveghere/monitorizare. Testele disponibile pe piată (inclusiv in Romania) sunt concepute să identifice antigene sau anticorpi (IgM, IgG), sunt monovalente sau bivalente.

Testele imunocromatografice de identificare a antigenului din proba de cercetat utilizează un Ac anti CPV sau CDV conjugat cu particule de aur şi un alt Ac anti CPV sau CDV fixat pe o membrană nitrocelulozică. Dacă Ag este prezent, acesta se cuplează cu conjugatul, formează un complex Ag-Ac ce va fi ulterior capturat de Ac fixat pe membrana nitrocelulozică cu dezvoltarea unei benzi roşu-purpuriu.

Din pacate, ignorarea sau necunoasterea principiilor imunologice care au stat la baza dezvoltarii metodelor de diagnostic rapid imunoenzimatice sau ImmunoComb au dus la obtinerea unor rezultate neconcordante cu simptomatologia sau inutilizabile in managementul bolii.

Decizia utilizării unuia sau mai multor metode de diagnostic rapid în diagnosticul de confirmare a parvovirozei canine şi bolii Carré îşi are baza în datele epidemiologice şi clinice relevante pentru identificarea stadiului evolutiv al bolii şi implicit a relaţiei agent patogen-organism.

Utilizarea testelor de detecție a Ag/Ac se corelează cu momentul infecției și semnele clinice prezente. Testul de detecție Ag se utilizează doar dacă, patogenetic, se cunoaşte că în proba de analizat poate exista virusul la acel moment (informații epidemiologice, anamneză, semne clinice). Identificarea IgM sau IgG la un câine nevaccinat susține venirea în contact cu CPV/CDV, coroborarea cu datele clinice duce la emiterea diagnosticului de boală. Identificarea IgM la câine vaccinat în urmă cu peste 40 zile susține contactul cu virusul cercetat, corelara rezultatului cu semnele clinice permite diagnosticul de certitudine. Utilizarea testelor de identificare a IgG la câinii imunizați este irelevantă pentru susținerea suspiciunii clinice de parvoviroză sau boală Carre.

BIBLIOGRAFIE

1. Green E. Craig. Canine Distemper. In Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat. Ed. Green E. Craig. W.B. Saunders Co.Phi.PA.1984; 386-405.
2. Green E. Craig. Canine Viral Enteritis. In Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat. Ed. Green E. Craig. W.B. Saunders Co.Phi.PA.1984; 437-460.
3. Daneș Doina, Baraitareanu S, Danes M. Teste de diagnostic rapid in parvoviroza canina si boala Carre. Al X-lea Congres Național de Medicină Veterinară, Poiana Brașov, 18-21 Sept 2007. Rezumate 168-169.
4. Cobzariu D. Cercetări privind optimizarea procedeelor de diagnostic, combatere și profilaxie în enteropatiile virale la carnasierele de companie. Teza Doctorat. 2006.

CERCETĂRI BACTERIOLOGICE PRIVIND PREZENŢA SEROTIPULUI ESCHERICHIA COLI O_{157} : H_7 ÎN CARNE ŞI PRODUSE DE CARNE.

DRĂGAN G.[1], CARP-CĂRARE C.[2], CARP-CĂRARE M.[2]
[1]DSVSA Brăila
[2]FMV Iaşi

Bacteriological investigations followed the presence and incidence of Escherichia coli O_{157}: H_7 serotype in some aliments of animal origine. Food samples were represented by: hashed beef, fresh sausages, pork, lamb meat and different meat products. From the 558 analysed samples, 286 (51,25%) Escherichia coli were isolated, and only 7 (2,45%) were biochemically identified as being O_{157}: H_7 serotype.

2 (3,38%) Escherichia coli strains O_{157}: H_7 serotype were isolated in the hashed beef, 2 (4,65%)in fresh sausages, 2 (2,75%) in different meat products and 1 (1,25%) in fresh lamb meat. In fresh pock wasn't identified the presence of Escherichia coli O_{157}: H_7.

The obtained results show that the incidence of the bacteria in meat and some meat products is very rare, comparative with other countries (Canada, USA and United Kingdom) and are very similar to other investigations from Romania (Teveloiu and col., 1995; Mocuţa, 2001).

Key words: serotype, Escherichia coli, food, meat

Escherichia coli este o bacterie de temut deoarece poate să determine îmbolnăviri grave la om, manifestate, prin colită hemoragică şi mai rar prin sindrom hemolitic şi uremic (HUS) ce au caractere epidemiologice de toxiinfecţie alimentară. Sursa de infecţie a acestor îmbolnăviri o constituie diverse alimente, contaminate pe diferite căi de fecalele animalelor purtătoare şi eliminatoare de *Escherichia coli* enterohemoragice (EHEC) (Garber L.P. şi col.,1995).

Tulpinile EHEC sunt producătoare de verotoxină (shiga-like toxina) iar, serotipul *Escherichia coli* O_{157} ; H_7 este cel mai important şi cel mai frecvent întâlnit.

În România nu sunt comunicate până în prezent episoade de toxiinfecţii alimentare produse de *Escherichia co*li O_{157} ; H_7, deşi cercetările întreprinse de Ganovici şi col.(1992) pe 91 tulpini de *Escherichia coli* izolate din fecalele a 465 bolnavi cu enterită, internaţi în două spitale din Bucureşti, au arătat că 13 (2,79%) tulpini erau enterohemoragice şi aparţineau serotipului O_{157} ; H_7 (Bărzoi D., 1999).

Întrucât, alimentele al căror consum a stat la originea celor mai multe episoade de toxiinfecţie alimentară, sunt cele de provenienţă animală şi, în principal, carnea de vită preparată sub diferite forme, dar netratată termic sau tratată insuficient., ne-am propus a cerceta prezenţa şi izolarea serotipului Escherichia coli O_{157} : H_7 din carne şi diferite produse de carne.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe un număr de 558 probe de alimente în cadrul "Programului de supraveghere şi prevenirea transmiterii de boli de la animale la om". Cele 558 probe de alimente au fost reprezentate de: carne de vită tocată, cârnaţi proaspeţi, carne porc, carne miel şi mezeluri diferite(tabelul 1 şi fig. 1.).

Tabelul 1.
Provenienţa produselor examinate bacteriologic

Nr.crt.	Produsul examinat	Probe examinate	
		Nr.	%.
1	Carne vită tocată	142	25,44
2	Cârnaţi proaspeţi	98	17,56
3	Carne porc	87	15,59
4	Carne miel	105	18,81
5	Mezeluri diferite	121	22,60
T o t a l		**558**	**100,00**

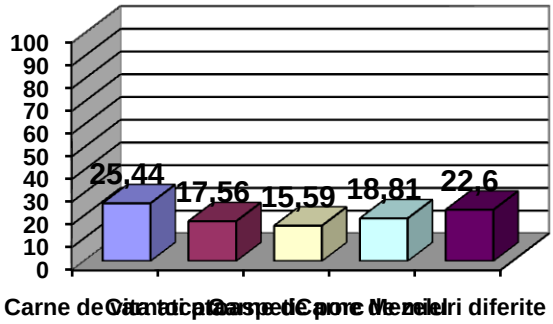


Fig.1. Provenienţa produselor examinate bacteriologic

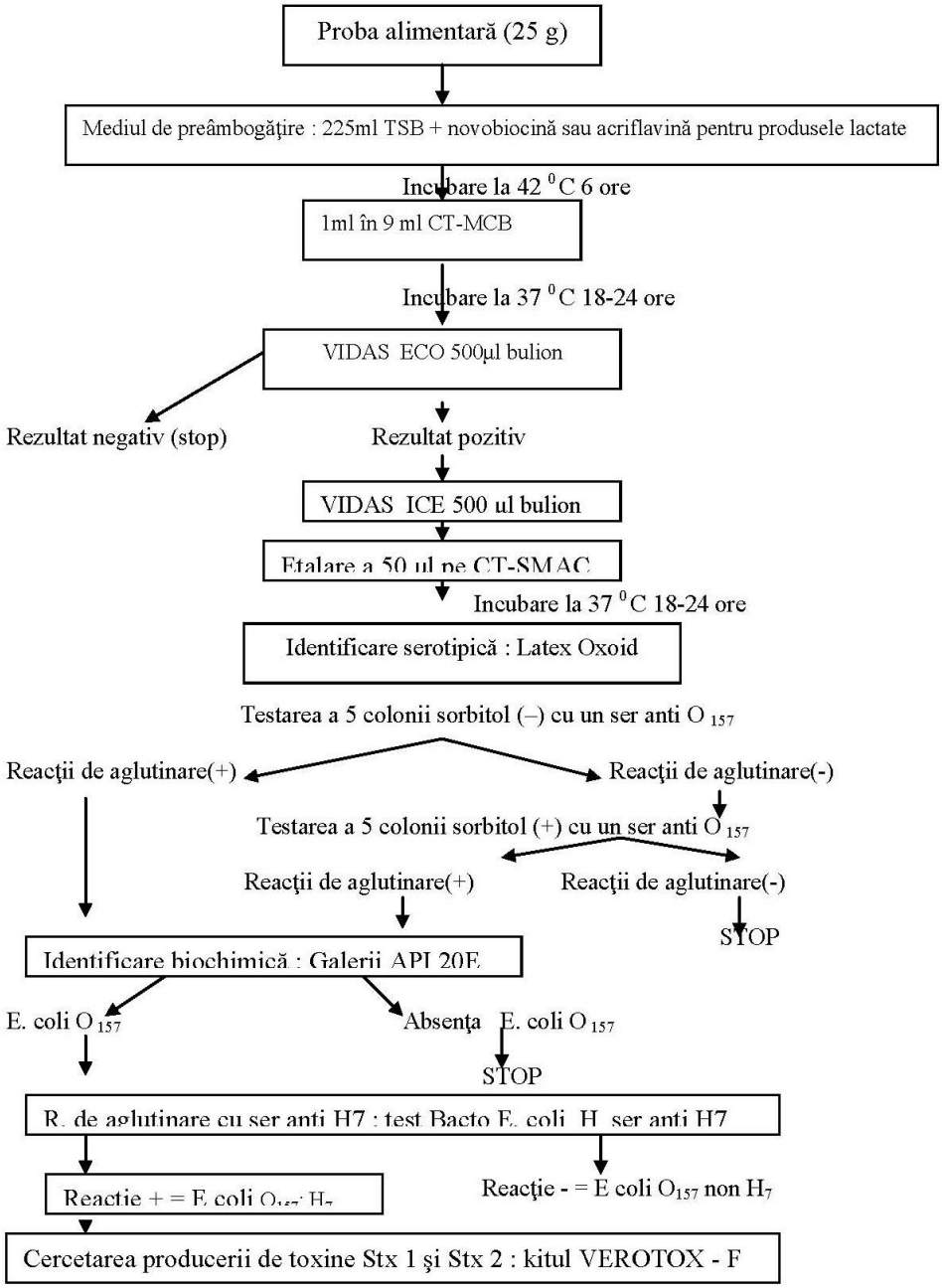


Fig. nr.2 Schema de detecţie şi de izolare a tulpinilor verotoxigene VTEC SR EN ISO 16654

Probele , cât mai proaspete, s-au recoltat în condiţii aseptice în cantitate de 300 g (o probă), s-au introdus în pungă de polietilenă integră la prima folosire, la teperatura de refrigerare (0-8°C).

Pentru detecţia şi izolarea serotipului Escherichia coli O_{157} : H_7 s-a folosit metoda orizonatală (ISO 16654:2001), cuprinzând 4 etape succesive (fig.2).

Pentru faza de îmbogăţire s-a folosit bulion Escherichia coli modificat+novobiocină, pentru izolare, agarul Mac Conkey cu sorbitol, BCIG şi MUG, iar pentru identificare şi confirmare producerea de indol, mobilitatea, seroaglutinarea cu ser anti O_{157} şi ser anti H_7

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Investigaţiile bacteriologice privind prezenţa serotipului *Escherichia coli* O_{157} : H_7 în 558 probe de carne şi preparate de carne au permis obţinerea rezultatelor prezentate în tabelul 2 şi fig.3.

Tabelul 2.

Rezultatul examenului bacteriologic privind izolarea Escherichia coli serotip $O_{157}H_7$ din carne şi produse de carne

Nr. Crt.	Specificare	Nr. probe	Rezultatul examenului bacteriologic					
			Tulpini E. Coli izolate		E. coli O_{157} :H_7		E. coli non $O_{157}H_7$	
			Nr.	%.	Nr.	%.	Nr.	%.
1	Carne vită tocată	142	59	41,45	2	3,38	57	96,62
2	Cârnaţi proaspeţi	98	43	43,87	2	4,65	41	95,35
3	Carne porc	87	32	37,94	-	-	32	100,00
4	Carne miel	105	79	75,23	1	1,25	78	98,75
5	Mezeluri diferite	121	73	60,33	2	2,75	71	97,25
T o t a l		558	286	51,25	7	2,45	279	97,55

Din analiza rezultatelor obţinute rezultă că din cele 558 probe analizate, s-au izolat 286 (51,25%) tulpini de Escherichia coli , din care numai 7 tulpini au fost identificate biochimic şi serologic ca aparţinând serotipului O_{157} : H_7 ceea ce reprezintă 2,45%.

Tulpinile de Escherichia coli serotip O_{157} : H_7 au fost izolate din carnea de vită tocată 2 (3,38 %), cârnaţi proaspeţi 2 (4,65 %), mezeluri diferite 2 (2,75 %) şi din carnea prospătă de miel 1 (1,25 %). De menţionat că, în carnea proaspătă de porc nu s-a evidenţiat prezenţa serotipului Escherichia coli O_{157} : H_7.

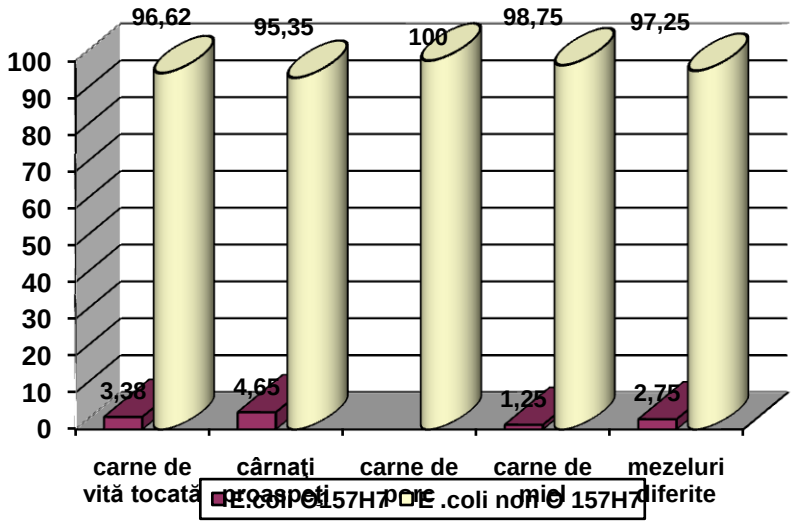


Fig.3 Rezultatul examenului bacteriologic privind izolarea Escherichia coli serotip $O_{157}H_7$ din carne şi produse de carne

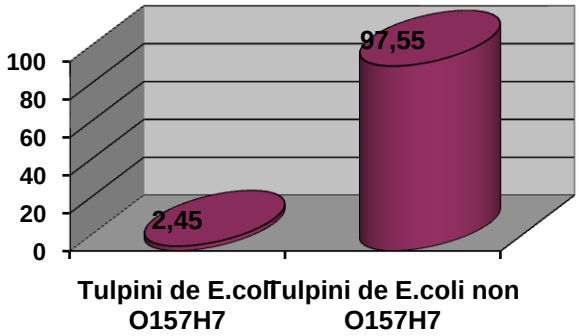


Fig.4. Incidenta serotipului E.coli O $_{157}$ H_7 în carne si preparate din carne

Rezultatele obţinute evidenţiază o incidenţa redusă a bacteriei în carne şi produse din carne, comparativ cu prezenţa serotipului în alimentele din alte zone, dar asemănătoare altor investigaţii din România. Astfel, contaminarea cărnii de vită variază între 15 şi 40 % în Canada (Johnson, 1996), în Statele Unite (Samadpour, 1994) şi în Regatul Unit (Willshawe, 1993). În România Ţeveloiu şi col.(1995) invetigînd incidenţa bacteriei în diferite produse alimentare de origine animală a demonstrat că ea este foarte rară: din 514 probe de alimente diverse s-au izolat 296 tulpini *de Escherichia coli*, din care numai 3 (1%) aparţineau serotipului O_{157} ; H_7 : două din probe de brânză proaspătă de vaci, iar una dintr-o probă de caş de oaie.

Rezultate asemănătoare a obţinut şi Mocuţa N. (2001), care cercetând un număr de 87 tulpini de *Escherichia coli* izolate din probele de alimente examinate în cadrul Programului de supraveghere şi prevenirea transmiterii de boli de la animale la om, a constatat că numaiu una singură (1,14%) provenind din cârnat proaspăt s-a dovedit a fi pozitivă.

Prezenţa şi izolarea serotipului *Escherichia coli* O_{157} ; H_7, în unele produse alimentare de origine animală, deşi în număr redus, nu fac decât să sporească interesul pentru punerea în practică a măsurilor de igienă preventivă cu rigurozitate în vederea prevenirii toxinfecţiilor alimentare la om.

CONCLUZII

Investigaţiile bacteriologice privind prezenţa serotipului *Escherichia coli* O_{157} ; H_7 în carne şi priodusele din carne, au dus la următoarele concluzii:

1. Din 558 probe analizate, s-au izolat 286 (51,25%) tulpini de *Escherichia coli* , din care numai 7 (2,45%) tulpini au fost identificate biochimic şi serologic ca aparţinând serotipului O_{157} : H_7 .
2. *Escherichia coli* serotip O_{157} : H_7 s-a izolat din carnea de vită tocată 2 (3,38 %), cârnaţi proaspeţi 2 (4,65 %), mezeluri diferite 2 (2,75 %) şi din carnea prospătă de miel 1 (1,25 %).
3. În carnea proaspătă de porc nu s-a evidenţiat prezenţa serotipului *Escherichia coli* O_{157} : H_7.
4. Rezultatele obţinute evidenţiază o incidenţa redusă a bacteriei în carne şi produse din carne, comparativ cu prezenţa serotipului în alimentele din alte zone, dar asemănătoare altor investigaţii din România.

BIBLIOGRAFIE,

1. BARZOI D., APOSTU S. Microbiologia produselor alimentare. Editura RISOPRINT, Cluj-Napoca, 2002, p. 60-70.
2. Bărzoi D., Meica S., Neguţ M. (1999) – Toxiinfecşiile alimentare – Bucureşti, Ed. Diacon Coresi
3. Dorn C.R. (1995) – Escherichia coli O_{157} : H_7 (Review) – JAMA, 5, 206 (10) 2487.
4. Mocuţa N. (2001) – Detecţia tulpinilor de E.coli O_{157} : H_7 prin metoda PCR în laboratorul D .S.V. Sălaj. – Re.Rom.Med.Vet., vol 11, nr.2., 201-204
5. Ţeveloiu I., Meica S., Bărzoi D., Neguţ M., Tatu Dorina (1995) – Incidenţa bacteriei Escherichia coli O_{157} : H_7 în unele produse alimentare de origine animală din ţara noastră. – Caiet de inf. Şi document. Tehnică (LCCPOAF-Bucureşti), 1, 49-55.
6. STĂNESCU V.- Igiena şi Controlul alimentelor. Ed. Fundaţiei “Romania de Maine”- Bucureşti, 1998, p. 300-304.

CERCETĂRI PRIVIND IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA SEROTIPULUI *ESCHERICHIA COLI* O_{157} : H_7 DIN MATERII FECALE DE BOVINE

DRĂGAN G.
DSVSA Brăila

Food toxiinfections produced by the enterohaemoragic strains of Escherichia coli (EHEC) represent a major problem of public health. From these ones, O_{157}: H_7 serotype, present in the intestine of the healthy animals is the most important and most frecquent encountered. Because the ruminants and, specially bovine, are considered the main germs reservoir and releaser, presence and isolation of O_{157}: H_7 serotype was investigated in 652 fecal `samples taken from 3 bovine farms, 3 ages categories.

To detect Escherichia coli O_{157}: H_7 orizontal method (ISO 16654:2001) was used, with 4 succesive phases (enrichment, separation and concentration, isolation and confirmation).

From the 652 examined faeces samples, 306 Escherichia coli strains were isolated and identifcated, representing 45,39%. From these ones 17 (5,55%) strains were serological identified as being serotype O_{157}: H_7, and 289 (94,45%) non - Escherichia coli O_{157}: H_7 strains.

Escherichia coli O_{157}: H_7 strains were isolated in faeces taken from 6 (35,29) calves, 4 (32,35%) nursing calves and 4 (32,35%) lactation cows.

Key words: Escherichia coli, serotype, faeces

Rolul bacteriei *Escherichia coli*, în producerea toxiinfecţiilor alimentare la om a fost în decursul timpului unul din cele mai controversate. Semnificaţia speciei pentru sănătatea publică şi pentru igiena alimentară a crescut enorm în urma identificării seroripzului O_{157} : H_7 ca agent al unor îmbolnăviri grave la om (Bărzoi D., şi col., 1999). Acest patotip, prezintă o importanţă deosebită pentru medicina umană şi veterinară. În patologia umană Escherichia coli O_{157} ; H_7 a devenit în scurt timp unul din cei mai temuţi agenţi ai toxiinfecţiilor alimentare umane. Pentru mediciuna veterinară, studiile referitoare la Escherichia coli O_{157} H_7 au scos în evidenţă că rezervorul principal este reprezentat de animalele apărent sănătoase, mai frecvent de viţeii sugari şi de vacile în lactaţie. Aceste animale pot fi purtătoare intestinale ale acestei bacterii, pe care o elimină odată cu fecalele, sursă de contaminare pentru carnea lor şi pentru alte alimente (laptele) de origine animală şi pentru vegetale (salată, ridichi de lună, pătrunjel) cultivate pe terenuri fertilizate cu îngrăşământ natural provenit de la bovine sau irigate cu apă din surse contaminate prin fecalele animalelor purtătoare (Garber L.P. şi col.,1995).

Având în vedere gravitatea toxiinfecţiilor alimentare la om şi rolul animalelor ca rezervor de germeni , ne-am propus a cerceta prezenţa serotipului Escherichia coli O_{157} ; H_7 în materiile fecale la diferite categorii de bovine.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe un număr de 652 probe de materii fecale, recoltate în pungi de plastic, de la 3 categorii de vârstă, din trei ferme de creşterea bovinelor pentru producţia de pentru lapte (tabel nr. 1 si fig.1).

Tabelul 1

Provenienţa materiilor fecale investigate pentru detecţia Escherichia coli O_{157}:H_7.

Nr.crt.	Produsul	Total .probe	Originea fecalelor	Din care:	
				Nr.	%.
1	Materii fecale	652	Viţei sugari	224	34,35
			Viţei înţărcaţi	241	36,95
			Vaci în lactaţie	187	28,70
	Total			**652**	**100,00**

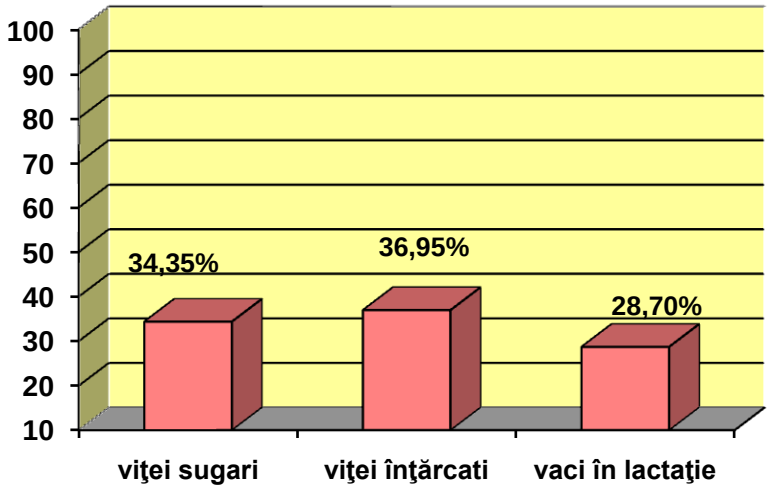


Fig. 1. Provenienţa materiilor fecale cercetate pentru prezenţa serotipului E.coli O_{157} : H_7

Pentru detecţia şi izolarea serotipului Escherichia coli O_{157} : H_7 s-a folosit metoda orizonatală (ISO 16654:2001), care cuprinde 4 etape succesive (îmbogăţirea, separarea şi concentrarea, izlarea şi confirmarea).

Cu ajutorul ansei bacteriologice s-a efectuat strierea directă a fecalelor pe suprafaţa agarului Mac Conkey cu sorbitol. După o incubare de 24 ore la 37°C , coloniile sorbitol negative (incolore) s-au transferat pe suprafaţa agarului nutritiv înclinat, iar cultura obţinută s-a supus seroaglutinării rapide pe lamă cu ser anti-O_{157}. Dacă reacţia a fost pozitivă s-a efectuat şi reacţia de seroaglutinare rapidă cu ser anti - H_7. Pentru a uşura recunoaşterea coloniilor specifice dezvoltate pe suprafaţa agarului Mac Conkey cu sorbitol, la acest mediu s-a adăugat 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid de sodiu (BCIG)- pentru a pune în evidenţă β-galactozidazei- şi 4-metillumbeliferyl-β-D-glucuronid (MUG)- pentru a evidenţia glucuronidaza.

Escherichia coli O_{157}:H_7 nu elaborează β-galactozidază şi deci nu descompune substratul specific, iar colonia este incoloră; de asemenea ea nu elaborează β-D-glucuronidază şi deci nu hidrolizează indicatorul MUG, formând colonii nefluorescente

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Insămânţările prin striere cu ansa bacteriologică pe suprafaţa mediului de cultură solid (agar) Mac Conkey cu sorbitol au dus la obţinerea rezultatellor înregistrate în tabelul 2 şi fig.2.

Analiza rezultatelor evidenţiază că din cele 652 probe de materii fecale examinate, s-au izolat şi identificat 306 tulpini de Escherichia coli, ceea ce reprezintă 45,39%. Dintre acestea 17 (5,55%) tulpini au fost identificate serologic ca aparţinând serotipului Escherichia coli O_{157} : H_7, iar 289 (94,45%) tulpini non-Escherichia coli O_{157} : H_7. Un număr de 6 (35,30%) tulpini de Escherichia coli O_{157}:H_7, s-au izolat din materii fecale recoltate de la viţei înţărcaţi, 4 (32,35%) tulpini de la viţei sugari şi 4 (32,35%) de la vaci în lactaţie. Diferenţele rezultate între cele două categorii de vârstă (viţei sugari şi viţei înţărcaţi), după Wellis (1991) pot fi datorate stadiului de dezvoltare a rumenului şi a sistemului imunitar, dietei, lipsei de colostru ingerat sau altor factori.

Detecţia şi identificarea serotipului Escherichia coli O_{157} : H7 s-a reuţit din materii fecale recoltate de la diferite categorii de bovine sănătoase, care nu prezentau manifestări gastrointestinale, dar care s-au dovedit a fi purtătoare şi eliminatoare ale bacteriei.

Tabelul 2

Rezultatul examenului bacteriologic privind izolarea Escherichia coli serotip $O_{157}H_7$ din fecalele de bovine

Nr. Crt.	Ferma	Specificare	Nr. probe	Rezultatul examenului bacteriologic					
				Total tulpini E.coli		E. coli O_{157} ; H_7		E.coli non $O_{157}H_7$	
				Nr.	%.	Nr.	%.	Nr.	%.
1.	T.	Viţei sugari	75	56	74,64	2	3,57	54	96,43
		Viţei înţărcaţi	80	47	58,75	3	6,38	44	93,62
		Vaci în lactaţie	54	25	46,27	1	4,00	24	96,00
		T o t a l	**209**	**128**	**61,24**	**6**	**4,68**	**122**	**95,32**
2	P	Viţei sugari	65	26	40,00	1	3,84	56	96,16
		Viţei înţărcaţi	82	42	51,21	3	7,14	37	92,86
		Vaci în lactaţie	63	25	6,96	2	8,00	23	92,00
		T o t al	**210**	**93**	**44,28**	**6**	**6,12**	**87**	**93,88**
3	Î	Viţei sugari	84	49	58,33	1	2,04	48	97,96
		Viţei înţărcaţi	79	35	44,30	3	8,57	32	91,43
		Vaci în lactaţie	70	27	38,57	1	3,70	26	96,30
		T o t a l	**233**	**111**	**47,64**	**5**	**4,50**	**106**	**95,50**
Total general			**652**	**306**	**45,39**	**17**	**5,55**	**289**	**94,45**

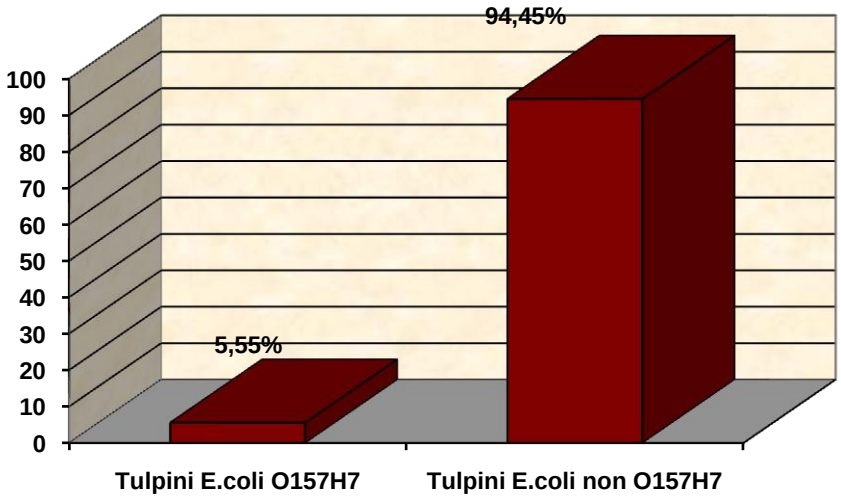


Fig. 2. Rezultatele examenului bacteriologic

De fapt, după Wells (1991), identificarea serotipul Eescherichia coli O_{157}:H_7 este mai frecvent realizată la animalele sănătoase, ceea ce poate lăsa să se presupună că această bacterie face parte din flora digestivă convivă, în special a viţeilor şi a vacilor crescute pentru lapte .

Starea de purtator, în special la viţeii după înţărcare, este tranzitorie (mai puţin de o lună), dar într-o fermă, excreţia poate dura mai mulţi ani, cu un vârf în vară şi începutul toamnei (Beutin (1993). Într-un alt studiu, Zhao (1995) a putut demonstra că 11 loturi, în prealabil negative în ce priveşte Escherichia coli O_{157}:H_7, au devenit pozitive pentru această bacterie. Invers, 7 din loturile pozitive pentru prezenţă de Escherichia coli O_{157}:H_7, au devenit trei luni mai târziu negative. Aceste rezultate sugerează că infecţia loturilor examinate cu Escherichia coli O_{157}:H_7 este tranzitorie şi că necesită examinarea mai multor animale, pe o perioadă mai lungă de timp.

Rezultatele obţinute, evidenţiază faptul că, viţeii după înţărcare sunt mai receptivi la infecţia cu Escherichia coli serotip O_{157} : H_7, comparativ cu cei sugari şi cu vacile în lactaţie. Astfel, după Garder (1995), viţeii după înţărcare ar fi de trei ori mai susceptibili la infectia cu *E.coli* O_{157}:H_7, decât înainte de înţărcare.

De asemenea, din analiza rezultatelor obţinute, se constată prezenţa serotipului Escherichia coli O_{157}: H_7 în cele 3 ferme examinate şi la toate categoriile de vîrstă (fig.3).

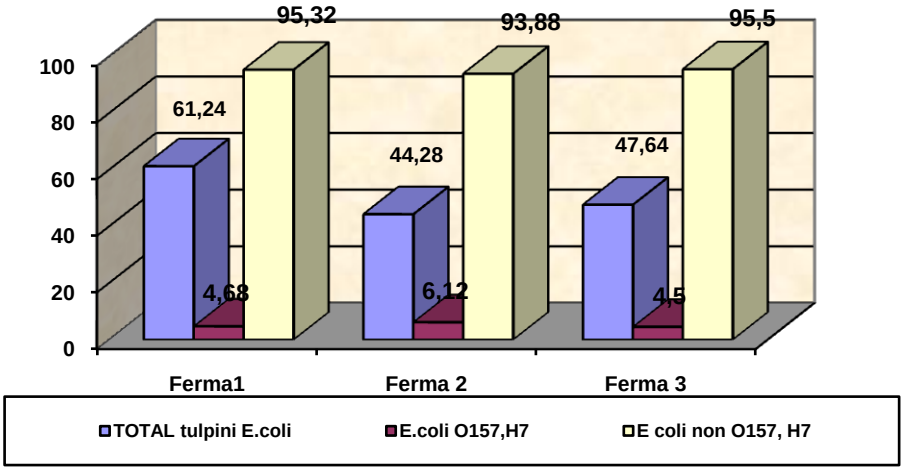


Fig.3.Incidenta serotipului E.coli O 157 H7 în fermele cercetate

CONCLUZII

Rezultatele examenului bacteriologic efectuat pentru detecţia şi izolarea serotipului Escvherichia coli O_{157} : H_7 din materii fecale recoltate de la viţei sugari, viţei înţărcaţi şi vaci în lactaţie din 3 ferme, conduc la următoarele concluzii:

1. Din cele 652 probe de materii fecale examinate, s-au izolat şi identificat306 tulpini de Escherichia coli, ceea ce reprezintă 45,39%.
2. Tulpinile de Escherichia coli au fost identificate serologic ca serotip O_{157} H_7 - 17 (5,55%) tulpini şi non - O_{157} : H_7 - 289 (94,45%) tulpini.
3. Serotipul Escherichia coli O_{157}:H_7, s-a izolat din materii fecale recoltate de la viţei înţărcaţi, 6 (35,30%) tulpini, de la viţei sugari 4 (32,35%) tulpini şi de la vaci în lactaţie 4 (32,35%).
4. Rezultatele obţinute evidenţiază faptul că, viţeii după înţărcare sunt mai receptivi la infecţia cu Escherichia coli serotip O_{157} : H_7, comparativ cu cei sugari şi cu vacile în lactaţie

BIBLIOGRAFIE

1. BARZOI D., APOSTU S. Microbiologia produselor alimentare. Editura RISOPRINT, Cluj-Napoca, 2002, p. 60-70.
2. Bolton D.J., Byrne C.M., Sheridan J.J., Mc Dowell D. and Blair I.S. (1999) –The survival characteristics of a non-toxigenic strain of Escherichia coli O_{157} : H_7. – Jour. Of Applied Microbiol., 86, 407-411
3. Garber L.P. şi col. (1995) – Risk factors for fecal shedding of Escherichia coli O_{157} : H_7 in dairy calves. – JAMA, 207, 46.
4. ORSKOV F., ORSKOV I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and disease in man and animals. Can J. Microbiol., 38 : 699-704.
5. WANG G., ZHAO T., DOYLE M.P. (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol., 62 : 2567-2570.

DINAMICA UNOR FACTORI UMORALI AI IMUNITĂŢII NESPECIFICE ÎN MIAZA CUTANATĂ INDUSĂ EXPERIMENTAL LA OVINE

HUMORAL NONSPECIFIC IMMUNITY FACTORS DYNAMIC IN EXPERIMENTALLY INDUCED FLY STRIKE IN SHEEP

FIŢ N., RĂPUNTEAN Gh., SPÎNU Marina, ŞANDRU Carmen Dana, ŞUTEU E., NADĂŞ G.
USAMV Cluj-Napoca
nfit@usamvcluj.ro

The study on the dynamic of the defense humoral effectors involved in sheep blowfly was realized on a group of 24, 12 of them from Romney March breed and 12 from Ţigaie. At 20 of the sheep blowfly was experimentally induced using first stage L.sericata larvae. Blood samples were collected at day 0, 7 and 14 after the infestation debut, determining total serum antibody concentration, circulant immune complexes and serical lysosim. We observed a increase of the medium total serum antibody values for the infested groups comparatively to the witness group, within the 14-th day post-infectant. Immune circulant complexes for the infested groups decreased after 7 days (5±4,18 U.C. for Romney March group and 4,6±1,14 U.C. for Ţigaie group) respect o witness group (8,0±2,83 U.C.) and the initial values, reaching the initial values 14 days post-infestant. Medium serical lysosim values decreased by the end of the experiment for the infested groups, with a major difference to Ţigaie breed (55,20±28,65 µg/ml day 0 and 35,0±29,92 day 14 post-infection).

Răspunsul imunologic faţă de agresiunea insectelor parazite se reflectă şi prin producerea diferitelor clase de anticorpi care se găsesc în plasma sanguină. Creşterea producţiei de imunoglobuline serice circulante favorizează cuplarea acestora cu secreţiile şi excreţiile insectelor, având ca urmare o atenuare a reacţiilor inflamatorii şi a modificărilor patologice la reinfestarea cu acelaşi parazit (Şuteu, 1998).

În miaza cutanată la ovine, determinată de diverse larve de califoride s-au depistat în ser anticorpi din clasa IgG activi faţă de *L. cuprina*, care se formează la 24 ore postinfestaţie dar nu conferă o protecţie animalelor. Acelaşi tip de imunoglobulină a fost observată şi în exsudatele recoltate înaintea deteriorărilor tisulare extensive, reprezentând clasa majoră de anticorpi (O'Mera şi colab., 1995; Seaton şi colab., 1992;).

Studiile "in vitro" asupra influenţei mediatorilor imuni în dezvoltarea larvelor de *L. cuprina* au arătat că aceştia nu inhibă dezvoltarea larvară, în primele 20-50 ore de la infestaţie, ei având un rol imunoreglator în producerea răspunsului imun (Colditz şi colab., 1996).

În scopul conturării unei imagini mai complete asupra implicării mediatorilor umorali în miaza cutanată la ovinele din rasele Romney March şi Ţigaie, în lucrarea de faţă ne-am propus urmărirea dinamicii unor efectori umorali nespecifici (concentraţia gamaglobulinelor serice totale, complexele imune circulante, lizozimul seric) la ovinele cu miază indusă experimental cu larve de *L. sericata* de stadiul I.

MATERIALE ŞI METODE

Experimentul s-a realizat în luna iunie-iulie 2005 în Clinica Facultăţii de Medicină Veterinară Cluj Napoca pe un lot total de 24 ovine din care 12 de rasă Romney March (6 femele şi 6 masculi) şi 12 Ţigaie (6 femele şi 6 masculi) cu vârstă cuprinsă între 5 şi 7 luni.

Infestarea ovinelor s-a realizat cu larve de *L.sericata* de stadiul I, obţinute în condiţii de laborator din femele recoltate din diferite biotopuri din Nord-Vestul Transilvaniei.

Pentru a se putea evidenţia modalităţile de reacţie a organismului în urma infestării experimentale cu larve de *L.sericata* şi a se putea face o corelaţie între aspectele clinice şi activitatea organelor hematopoetice, s-au prelevat probe de sânge pe anticoagulant (heparină) şi fără

anticoagulant în ziua 0, 7 şi 14 post infestaţie, efectuându-se următoarele determinări după protocoalele descrise de Ghergariu şi colab., (2000):

- **dozarea gamaglobulinelor serice**-metoda turbidimetrică exprimată în grade Vernes,
- **dozarea complexelor imune circulante**-metoda de precipitare cu PEG 4,2%,
- **dozarea lizozimului seric** -metoda difuzimetrică în plăci exprimată în µg/ml

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic în sistemul de operare Windows XP prin utilizarea programului de statistică GraphPad InStat 3, cu care s-au calculat:

- -media aritmetică, deviaţia standard, realizându-se si exprimarea lor în dinamică sub formă grafică.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

- Imunoglobinele serice totale

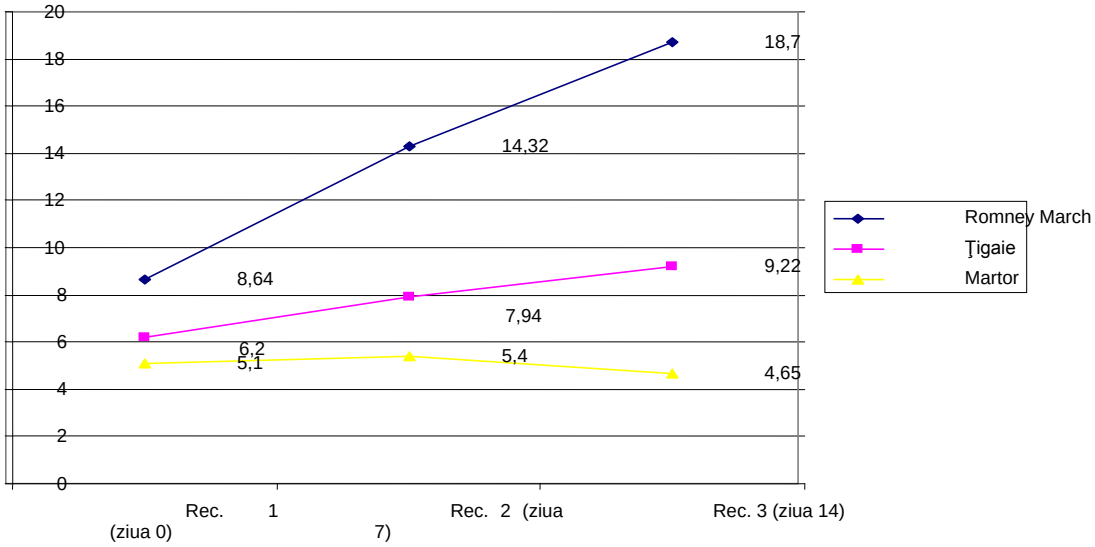
Dinamica mediilor imunoglobulinelor serice totale la loturile de ovine experimentale luate în studiu sunt prezente în tabelul 1 şi graficul 1

Se observă o creştere a valorilor medii a imunoglobulinelor serice totale la loturile infestate comparativ cu lotul neinfestat, creşterea valorilor este constantă până la 14 zile p.i. (sfârşitul experimentului). La lotul Romney March s-au obţinut cele mai mari medii ale valorilor imunoglobulinelor serice totale care au crescut mai bine de două ori (8,64±2.55 grade Vernes la recoltarea 1 şi 18,70±6.15 la ultima recoltare) comparativ cu lotul 2 Ţigaie la care creşterea a fost de circa 30% (6,2±4,62 grade Vernes iniţial; 9,22±4,82 grade Vernes la la 14 zile p.i).

La lotul martor diferenţele dintre valorile medii ale imunoglobulinelor totale nu au prezentat modificări semnificative (5,1±1,27 grade Vernes la prima recoltare şi 4,65±1,91 grade Vernes după 14 zile).

Tabel 1 Valorile medii şi deviaţiile standard ale imunoglobulinelor serice totale la loturile de ovine infestate cu L.sericata (grade Vernes)

Recoltări		Romney March	Ţigaie	Martor
Rec. 1 (ziua 0)	Media	8,64	6,20	5,10
	Dev.st	2,55	4,62	1,27
Rec. 2 (ziua 7)	Media	14,32	7,94	5,40
	Dev.st	8,37	4,46	0,85
Rec.3 (ziua 14)	Media	18,70	9,22	4,65
	Dev.st	6,15	4,82	1,91



Grafic 1 Evoluţia nivelurilor imunoglobulinelor serice la ovine infestate cu larve de L.sericata

Imunoglobulinele serice totale ale ovinelor infestate au avut o evoluţie ascendentă până la sfârşitul experimentului, acest lucru dovedeşte că implicarea sistemului umoral specific în acest tip de

leziuni este activă, recunoscând substanţele eliberate de larve ca fiind străine (non-self) de cele proprii iar producerea de imunoglobuline a fost la nivel maxim la 14 zile p.i.

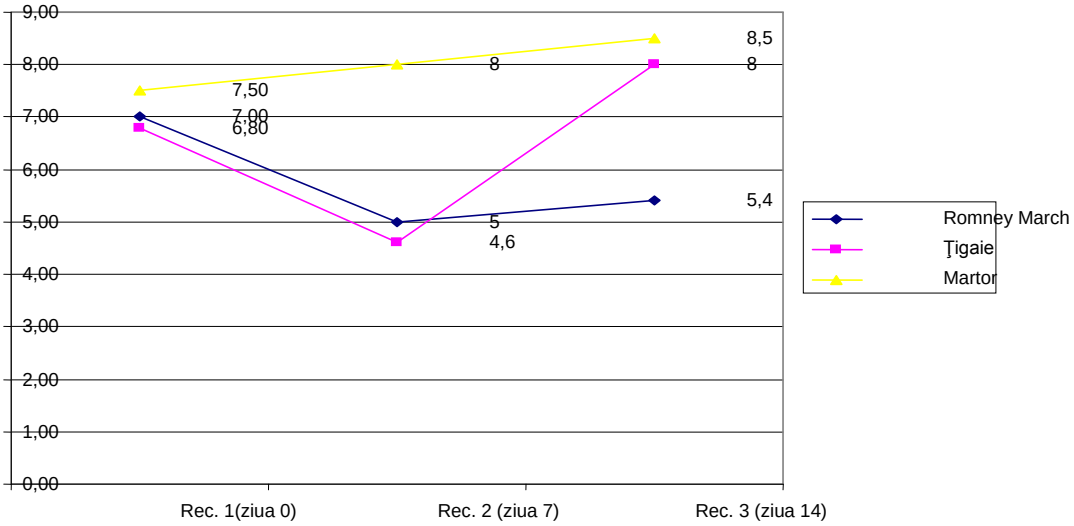
- Complexele imune circulante (C.I.C.)

Au avut o evoluţie diferită faţă de imunoglobulinele serice totale. Astfel, (tabelul 2) se observă că la loturile infestate valorile C.I.C scad considerabil la 7 zile (5±4,18 U.C. la lotul Romney March şi 4,6±1,14 U.C. la lotul II Ţigaie) faţă de martor (8,0±2,83) şi faţă de valorile iniţiale. Ulterior la 14 zile p.i. valorile revin în apropierea limitelor iniţiale (5,4±3,05 U.C.) la lotul Romney March şi la valori ce depăşesc limitele iniţiale (8±6,36 U.C.) la lotul Ţigaie.

La lotul martor valorile medii ale C.I.C. cresc uşor în timpul experimentului de la 7,5±0,71 U.C. la 8,50±9,19 U.C. (Grafic 2).

Tabel 2 Valorile medii ale complexelor imune circulante la loturile de ovine infestate cu larve de L.sericata, exprimate în unităţi convenţionale (U.C.)

Recoltări		Romney March	Ţigaie	Martor
Rec. 1 (ziua 0)	Media	7,00	6,80	7,50
	Dev.st	6,78	3,70	0,71
Rec. 2 (ziua 7)	Media	5,00	4,60	8,00
	Dev.st	4,18	1,14	2,83
Rec.3 (ziua 14)	Media	5,40	8,00	8,50
	Dev.st	3,05	6,36	9,19



Grafic 2 Dinamica complexelor imune circulante la cele trei loturi de ovine infestate cu L.sericata (U.C.)

Dozarea complexelor imune circulante a înregistrat o scădere la 7 zile p.i. la lotul infestat, care poate fi explicată prin intensificarea tuturor mecanismelor de apărare, care pot astfel retrage din circulaţie o parte din aceste complexe imune.

- Dozarea lizozimului

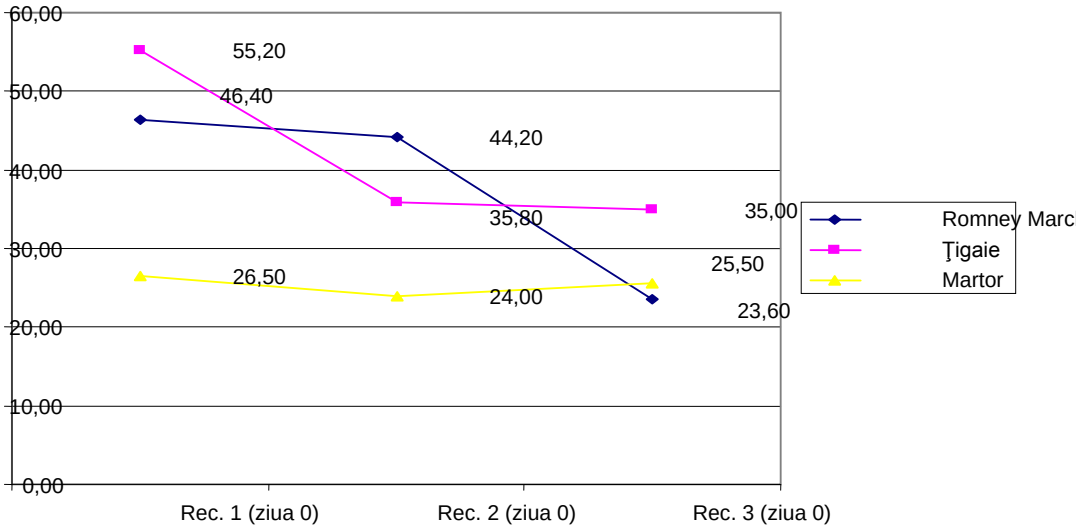
Lizozimul determinat prin metoda difazimetrică din probele de la loturile experimentale a prezentat următoarele variaţii la cele 3 intervale (0,7,14 zile p.i.) prezente în Tabelul 3 şi Graficul 3.

Deşi mediile valorilor lizozimului la cele trei loturi la prima recoltare au fost diferite, pe parcursul experimentului valorile acestui efector umoral s-au apropiat la 14 zile p.i. Astfel, se observă o scădere a mediilor valorilor până la sfârşitul experimentului la loturile infestate. La 7 zile p.i. scăderea este mai accentuată la lotul 2 Ţigaie, de la valori de 55,20±28,65 µg/ml la 35,80±14,17µg/ml la 7 zile p.i. Dminuarea valorilor acestor enzime se menţine la aceste loturi şi la 14 zile p.i. cu valori de 23,60±14,76µg/ml la lotul Romney March şi de 35,0±29,92µg/ml la lotul Ţigaie şi.

La lotul martor se observă o variabilitatea nesesizabilă a valorilor medii în timpul experimentului (26.50± 6.36µg/ml în ziua 0 şi 25.5±4.95µg/ml la 14 zile p.i.).

Tabel 3 Valorile medii ale lizozimului seric la loturile de ovine infestate cu L.sericata (µg/ml)

Recoltarea		Romney March	Ţigaie	Martor
Rec. 1 (ziua 0)	Media	46,40	55,20	26,50
	Dev.st	12,86	28,65	6,36
Rec. 2 (ziua 7)	Media	44,20	35,80	24,00
	Dev.st	26,20	14,17	1,41
Rec.3 (ziua 14)	Media	23,60	35,00	25,50
	Dev.st	14,76	29,92	4,95



Grafic 3 Dinamica valorilor medii ale lizozimului la loturile de ovine infestate cu L.sericata

CONCLUZII

Studiul asupra efectorilor umorali de apărare nespecifică în miaza cutanată, produsă experimental, s-a finalizat cu următoarele concluzii:

- Creşterea constantă a concentraţiilor de imunoglobuline totale după infestaţia ovinelor sugerează prezenţa unui răspuns imun mediat prin efectori umorali care este prezent în limite mari şi la 14 zile după infestaţie.
- Scăderea complexelor imune circulante la ovine la 7 zile p.i. şi revenirea acestora la 14 zile p.i. a fost corelată cu intensificarea proceselor de apărare celulară în prima perioadă şi scăderea lor la sfârşitul bolii.
- Valorile lizozimului au avut o evoluţie descendentă pe parcursul experimentului la loturile de ovine infestate, iar la lotul neinfestat ele au rămas constante.

BIBLIOGRAFIE

1. Colditz I.G., Eisemann C.H., Tellam R.L., McClure S.J., Mortimer S.J., Husband A.J. (1996) – Growth of *Lucilia cuprina* larvae following treatment of sheep divergently selected for fleece rot and fly strike with monoclonal antibodies to T lymphocyte subsets and interferon δ. International Journal for Parasitology 26 (7), 775-782.
2. Ghergariu S., Pop Al., Kadar L., Spînu Marina (2000) – Manual de laborator clinic veterinar. Edit. ALL educational, Bucureşti.
3. O'Mera T.J., Nesa M., Seaton D.S., Sandeman R.M. (1995) – A comparison of inflammatory exudates released from myiasis wounds on sheep bred for resistance or susceptibility to *Lucilia cuprina.* Veterinary Parasitology 56(1/3), 207-223.
4. Seaton D.S., O'Mera T.J., Chandler R.A., Sanderman R.M. (1992) – The sheep antibody response to repeated infection with *Lucilia cuprina.* International Journal for Parasitology 22 (8), 1169-1174.
5. Şuteu E. (1998) – Zooparaziţii şi gazdele parazitare. Edit. Genesis Tipo, Cluj-Napoca.
6. Şuteu I., Cozma V. (2004) – Parazitologie clinică veterinară. Vol. II, Edit. Risoprint, Cluj-Napoca.

VARIAŢIA EFECTORILOR CELULARI DE APĂRARE NESPECIFICĂ ÎN MIAZA CUTANATĂ INDUSĂ EXPERIMENTAL LA OVINE

VARIATION OF THE NONSPECIFIC DEFENSE CELL EFFECTORS IN EXPERIMENTALLY INDUCED BLOWFLY STRIKE IN SHEEP

FIŢ N., RĂPUNTEAN Gh., ŞUTEU E., NADĂŞ G., CĂLINA Daniela, ACHELĂRIŢEI D.
USAMV Cluj-Napoca

The study on the variation of the defence cell effectors involved in blowfly strike in sheep was realized on a group of 24, 12 of them from Romney March breed and 12 from Ţigaie. At 20 of the sheep blowfly was experimentally induced using first stage L.sericata larvae. Blood samples were collected at day 0, 7 and 14 after the infestation debut, determining total leucocite and eosinophils number, leucocitary subpopulations and phagocitary activity. The results revealed an intense defence answer for the sheep of Romney March breed, manifested by a very significant increase (p<0,001) of the total leucocite medium number at 7 days after the infestation. Eosinophile number medium values presented no statisical significant variations between the collections and the groups (p>0,05). Regarding the leucocitary subpopulations in the infected groups, a leucocitosis 7 days post-infectant, neutrophily, moderate limphopeny but no eosinophily was recorded. The evaluation of the phagocitary activity revealed in Romney March breed 7 days after the infection the presence of the specifical blood opsonisant factors that appeared during the infestation, favorizing the phagocitary function increase.

Studii efectuate de numeroşi autori evidenţiază faptul ca în Europa miaza cutanată la ovine este produsă mai frecvent de insecte din specia *L.sericata*, care găseşte condiţii prielnice pentru dezvoltarea larvelor pe ovine (Ruiz-Martinez şi colab., 1993; Lima şi Borja 1997; Vignau şi Arias 1997; Fention şi colab., 1998).

La noi în ţară miaza cutanată este mai frecventă în turmele de ovine din rase perfecţionate, cum sunt Merinos, Corriedale, Romney March, Polwarth, iar cele autohtone, Ţurcană, Ţigaie şi metişii acestora sunt mai rezistente (Şuteu şi Cozma, 2004).

Modificările care au loc în organismele cu miază sunt complexe, Farkas (1998) şi O'Mera şi colab., (1995) dovedesc că organismul reacţionează cu toate sistemele de apărare, la nivelele local şi general, mobilizând efectori celulari şi umorali cu scopul de a stopa procesul parazitar.

Luând în considerare cele menţionate şi datorită faptului că la noi în ţară studiile efectuate până la ora actuală clarifică doar unele aspecte legate de implicarea efectorilor celulari de apărare în miaza cutanată la ovine, ne-am propus:

- urmărirea dinamicii leucocitelor totale, eozinofilelor totale, a subpopulaţiilor leucocitare şi a activităţii fagocitare la ovine din rasele Romney March şi Ţigaie cu miază indusă experimental.

MATERIALE ŞI METODE

Experimentul s-a realizat în luna iunie-iulie 2005 în Clinica Facultăţii de Medicină Veterinară Cluj Napoca pe un lot total de 24 ovine din care 12 de rasă Romney March (6 femele şi 6 masculi) şi 12 Ţigaie (6 femele şi 6 masculi) cu vârstă cuprinsă între 5 şi 7 luni.

Infestarea ovinelor s-a realizat cu larve de *L.sericata* de stadiul I, obţinute în condiţii de laborator din femele recoltate din diferite biotopuri din Nord-Vestul Transilvaniei.

Pentru a se putea evidenţia modalităţile de reacţie a organismului în urma infestării experimentale cu larve de *L.sericata* şi a se putea face o corelaţie între aspectele clinice şi activitatea organelor hematopoetice s-au prelevat probe de sânge, pe anticoagulant (heparină) şi fără anticoagulant în ziua 0, 7 şi 14 post infestaţie, efectuându-se următoarele determinări după protocoalele descrise de Ghergariu şi colab., (2000):

- **numărarea leucocitelor totale** s-a făcut prin metoda cu lichide diluţie Türk utilizând camera de numărat Bürker-Türk iar valorile au fost exprimate în $10^3/mm^3$;
- **numărarea eozinofilelor** s-a făcut ca şi în cazul leucocitelor totale, utilizându-se lichidul de diluţie Howe-French, iar exprimarea s-a făcut în $10^3/mm^3$;

- **formula leucocitară** (exprimată procentual);
- **testul de înglobare a particulelor de carbon** (varianta martor şi varianta stimulată cu antigen total de larve de *L.sericata*);

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic în sistemul de operare Windows XP prin utilizarea programului de statistică GraphPad InStat 3, cu care s-au calculat:

- media aritmetică şi deviaţia standard
- semnificaţia statistică a diferenţelor (testul „t”) dintre variante respectiv loturi

Pragurile de semnificaţie pentru testul „t” au fost considerate: p>0,05 nesemnificativ, p<0,05 semnificativ statistic, p<0,01 distinct semnificativ iar p<0,001 foarte semnificativ.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

- **Leucocitele totale**

Rezultatele privind valorile minime, maxime şi medii ale leucocitelor totale la ovine cu miază experimentală sunt prezentate în tabelul 1. Se poate observa că valorile medii ale ovinelor infestate din lotul I înregistrează o creştere de la 11,48±2,17 la prima recoltare (ziua 0) la 14,53±2,00 la recoltarea a doua (7 zile), valoare care este considerată foarte semnificativă (p<0,001) faţă de valorile de la lotul martor. La ultima recoltare (14 zile) valorile medii scad la 13,08±2,48, nivel care este semnificativ (p<0,005) faţă de lotul martor.

Tabel 1 Valorile medii pe loturi ale leucocitelor totale la loturile de ovine cu miază experimentală (parametrii statistici; $10^3/mm^3$)

Parametrii calculaţi	Lot 1 Romney March (infestat)			Lot 2 Ţigaie (infestat)			Lot Martor (neinfestat)		
	Rec. I	Rec. II	Rec.III	Rec. I	Rec. II	Rec.III	Rec. I	Rec. II	Rec.III
Minim	9,3	11,55	10,05	7,55	9,05	7,3	8,4	9,15	9,25
Maxim	16,9	18,10	18,00	11,8	11,55	11,55	10,6	11,2	13,6
Media	11,48	14,53	13,08	9,36	10,03	9,29	9,38	10,16	10,06
Dev.st	2,17	2,00	2,48	1,40	0,83	1,34	0,48	0,84	1,99
Test t	0,0473	0,0006	0,0188	0,4858	0,4007	0,1549	0,3738	0,3597	0,4453

Rec I- ziua 0; Rec II-ziua 7; Rec III-ziua 14

La lotul 2 numărul mediu de leucocite a înregistrat o creştere, de la valori de 9,36±1,40 la prima recoltare la 10,03±0,83 la recoltarea a doua şi o scădere a valorilor sub cele iniţiale la recoltarea a treia (9,29±1,34). La acest lot valorile indicelui p au fost considerate nesemnificative faţă de lotul martor (p>0,05).

La lotul martor neinfestat media valorilor leucocitelor totale nu a prezentat variaţii semnificative (p>0,05) la cele trei recoltări, valoarea medie cea mai mare obţinându-se la a doua recoltare (10,16±0,84).

La toate trei loturile evoluţia în dinamică a numărului de leucocite a avut un aspect de curbă convexă, cu valori maxime obţinute la recoltarea a doua.

Intensitatea răspunsului a fost direct proporţională cu gravitatea leziunilor, astfel încât valorile medii ale leucocitelor totale au crescut mai mult la lotul Romney March la care leziunile au fost mai grave, comparativ cu lotul Ţigaie. Creşterea numărului total de leucocite în timpul infestaţiei larvare confirmă un răspuns de apărare din partea organismului care încearcă să anihileze larvele şi să stopeze agravarea leziunilor cutanate (Colditz şi colab., 1992; Farkas şi Albert, 2000).

Scăderea numărului de leucocite totale circulante a fost corelată cu vindecarea leziunilor la ovinele infestate.

- **Eozinofilele totale**

Valorile medii ale eozinofilelor determinate la loturile experimentale de ovine s-au situat sub limitele normale ale acestei specii (Tabel 2). Se observă că la lotul I media eozinofilelor la prima recoltare (ziua 0) şi la a doua recoltare (ziua 7) este egală (1,7mii/mm^3) dar cu o deviaţia standard diferită (2,17 mii/mm^3 la prima şi respectiv 2,00 mii/mm^3 la a doua). La a treia recoltare (14 zile) valoarea eozinofileor a crescut uşor la acest lot la 1,8 , dar fără semnificatie statistică (p>0,05). La lotul 2 numărul mediu al eozinofileor la a doua recoltare a crescut faţă de prima recoltare de la 1,6±0,86 la 1,9±1,28. La a treia recoltare valorile medii au scăzut la 1,3±0,67 la acest lot. La lotul

martor media eozinofilelor a crescut uşor de la prima recoltare (1,7±0,95) până la ultima recoltare (2,25±1,29) fără semnificaţie statistică între recoltări (p>0,05).

Tabel 2 Valorile medii ale eozinofilelor la ovine cu miază cutanată experimentală (mii/mm^3)

Parametrii calculaţi	Lot 1 Romney March (infestat)			Lot 2 Ţigaie (infestat)			Lot Martor (neinfestat)		
	Rec. I	Rec.II	Rec.III	Rec. I	Rec.II	Rec.III	Rec. I	Rec.II	Rec.III
Minim	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Maxim	4	3	5	3	4	3	3	3	4
Media	1,7	1,7	1,8	1,6	1,9	1,3	1,75	2	2,25
Dev.st	2,17	2,00	2,48	0,84	1,28	0,67	0,95	0,81	1,29
Test t	0,4681	0,2452	0,1921	0,3882	0,4445	0,0190	0,3524	0,2684	0,1933

Rec I- ziua 0; Rec II-ziua 7; Rec III-ziua 14

- **Subpopulaţiile leucocitare**

Valorile medii şi deviaţiile standard ale subpopulaţiilor leucocitare pe parcursul experimentului sunt prezentate în tabelul 3.

La lotul I Romney March la prima recoltarea valorile medii ale subpopulaţiilor leucocitare s-au încadrat în limite normale, la a doua recoltare s-a constatat o creştere a neutrofilelor (55,20±10,55%) şi o scădere a limfocitelor (39,80±11,71%). La recoltarea a treia aceste valori au revenit aproape de cele normale dar cu o depăşire uşoară în cazul neutrofileor (43,60±9,56%). Valorile celorlalte subpopulaţii celulare nu au prezentat abateri de la limitele normale.

Tabel 3 Valorile procentuale ale subpopulaţiilor leucocitare la loturile de ovine cu miază experimentală

Recoltări		Romney March					Ţigaie					Martor				
		N	E	B	M	L	N	E	B	M	L	N	E	B	M	L
Rec 1 ziua 0	Med	31,6	2,8	0,2	1,6	63,8	25,8	2,4	0,2	1,0	70,6	30,2	1,7	0,25	1,50	66,25
	Dev.st	4,39	1,48	0,45	1,14	2,39	9,55	1,67	0,45	0,71	8,85	11,8	0,5	0,50	0,58	11,27
Rec2 ziua 7	Med	55,2	2,60	0,40	2,00	39,8	42,4	2,60	0,60	1,40	53,0	36,2	4,0	0,25	1,75	57,75
	Dev.st	10,5	1,34	0,55	0,71	11,7	8,26	0,89	0,55	1,14	7,38	2,06	0,8	0,50	0,96	3,50
Rec.3 ziua 14	Med	43,6	3,20	0,60	1,60	51,0	37,6	3,00	0,20	2,40	56,8	39,2	2,2	0,50	2,75	55,25
	Dev.st	9,56	1,64	0,55	0,89	9,19	17,2	2,00	0,45	0,55	17,7	9,00	0,5	0,58	2,22	9,84

La lotul II Ţigaie evoluţia subpopulaţiilor leucocitare în timpul experimentului a prezentat o curbă asemănătoare cu cea de la lotul I dar cu valori medii mai mici ale neutrofilelor, înregistrând o maximă (42,40±8,26%) la recoltarea a doua şi o scădere a valorilor la ultima recoltare (37,60±17,21%).

La lotul martor valorile înregistrate la toate recoltările s-au încadrat în limitele normale.

Leucocitoza constatată la loturile infestate la 7 zile p.i. a fost asociată cu o neutrofilie şi limfopenie moderată dar fără eozinofilie, fapt ce poate reflecta o infecţie sau un stres sever suferit de ovinele din experiment.

- **Fagocitoza**

Valorile medii şi dinamica activităţii fagocitare la cele trei loturi de ovine experimentale, luându-se în considerare varianta I netratată şi varianta 2, stimulată cu antigen total de *L.sericata* „in vitro”, sunt prezentate în tabelele 4 şi 5.

Valorile obţinute reprezintă unităţile de densitate optică (U.D.O.) în probele analizate. Cu cât valorile de U.D.O. sunt mai mari, cu atât funcţia fagocitozei este mai slabă.

Comparând mediile valorilor obţinute în dinamică la prima recoltare faţă de a doua recoltare (7 zile) se poate observa că la ambele loturi funcţia fagocitară este diminuată la 7 zile p. i. cu valori de 0,432±0,251 U.D.O. în ziua 0 şi 0,605±0,297 U.D.O. în ziua 7 p.i. la lotul I Romney March şi la varianta nestimulată şi de 0,634±0,349 U.D.O. în ziua 0 şi 0,642±0,108 în ziua 7 la acelaşi lot în varianta stimulată. La lotul II Ţigaie funcţia fagocitară este mai intens inhibată, diferenţa putându-se sesiza prin valorile medii de 0,613±0,268 U.D.O. în ziua 0 şi 0,805±0,106 U.D.O. în ziua 7 la varianta nestimulată şi de 0,539±0,266 U.D.O. în ziua 0 şi 0,818±0,179 în ziua 7 la varianta stimulată.

Valorile obţinute la loturile infestate în varianta nestimulată (1) relevă o diminuare mai accentuată a funcţiei fagocitare la 7 zile p.i. faţă de lotul martor.

La cea de-a treia recoltare activitatea fagocitară la lotul Romney March scade (0,750±0,187 U.D.O.) la varianta nestimulată faţă de recoltarea a doua iar reactivitatea faţă de antigen a fost

aproape egală (0.64±0256 U.D.O.) cu recoltatea a doua. La lotul II Ţigaie la 14 zile p.i. se constată o revenire a funcţiei fagocitare (0.476±0.267 U.D.O.) faţă de recoltatea la 7 zile în varianta nestimulată iar faţă de antigen reactivitatea se menţine asemănătoare ca la 7 zile p.i.

La lotul martor în varianta nestimulată funcţia fagocitară a fost mai scăzută la 7 zile p.i. (0.820±0,176 U.D.O.). La varianta a doua la 7 zile p.i. s-a evidenţiază o scădere marcantă a fagocitozei de la valori de 0,427±0,315 U.D.O în ziua 0 la 0,700±0,538 U.D.O. în ziua 7 p.i. La această variantă la 14 zile p.i. funcţia fagocitară s-a păstrat la valori similare (0.738±0,177 U.D.O.) cu cele obţinute la 7 zile p.i.

Evaluarea activităţii fagocitare în cele două variante (netratată cu antigen şi tratată cu antigen de *L.sericata*) a permis evidenţierea la lotul Romney March la 7 zile p.i. a prezenţei factorilor specifici opsonizanţi în sânge, dobândiţi în cursul infestaţiei care au favorizat astfel creşterea funcţiei fagocitare. Prezenţa celulelor cu rol fagocitar şi a opsoninelor la nivelul plăgilor miazigene a fost semnalată şi de către Bowles şi colab., (1994), Colditz şi colab., (1994), Elhay, (1994), Farkas şi Albert, (2000).

Tabel 4 Parametrii statistici privind activitatea fagocitară la loturile de ovine infestate experimental cu L.sericata (UDO)

Recoltări		Romney March						Ţigaie					
		Varianta 1			Varianta 2			Varianta 1			Varianta 2		
		0’	20’	45’	0’	20’	45’	0’	20’	45’	0’	20’	45’
Rec. 1	Media	0,398	0,393	0,432	0,601	0,625	0,634	0,620	0,619	0,613	0,524	0,535	0,539
(ziua 0)	Dev.st.	0,222	0,222	0,251	0,340	0,353	0,349	0,266	0,277	0,268	0,256	0,246	0,266
Rec. 2	Media	0,568	0,571	0,605	0,634	0,620	0,642	0,804	0,783	0,805	0,773	0,785	0,818
(ziua 7)	Dev.st.	0,276	0,261	0,297	0,120	0,106	0,108	0,093	0,076	0,106	0,149	0,174	0,179
Rec.3	Media	0,715	0,725	0,750	0,612	0,611	0,640	0,461	0,470	0,476	0,613	0,604	0,828
(ziua 14)	Dev.st.	0,164	0,157	0,187	0,220	0,199	0,256	0,277	0,272	0,267	0,291	0,260	0,677

UDO- unităţi de densitate optică; ’-minute

Tabel 5 Parametrii statistici privind activitatea fagocitară la lotul martor de ovine neinfestate (UDO)

Recoltări		Martor					
		Varianta 1			Varianta 2		
		0’	20’	45’	0’	20’	45’
Rec. 1	Media	0,739	0,722	0,722	0,331	0,393	0,427
(ziua 0)	Dev.st.	0,239	0,264	0,252	0,243	0,258	0,315
Rec. 2	Media	0,884	0,820	0,804	0,653	0,668	0,700
(ziua 7)	Dev.st.	0,176	0,105	0,136	0,508	0,501	0,538
Rec.3	Media	0,754	0,748	0,754	0,651	0,627	0,738
(ziua 14)	Dev.st.	0,021	0,049	0,013	0,115	0,037	0,177

UDO- unităţi de densitate optică; ’-minute

CONCLUZII

Studiul asupra efectorilor celulari de apărare nespecifică în miaza cutanată, produsă experimental, s-a finalizat cu următoarele concluzii:

- Răspunsul imunologic mediat prin efectorii celulari de apărare a fost mai intens la ovinele din rasa Romney March faţă de ovinele din rasa Ţigaie. Acest lucru s-a corelat cu evoluţia miazei cutanate experimentale şi gravitatea leziunilor întâlnite la cele două rase;
- Infestaţia cu larve de *L.sericata* la ovine a produs o creştere a numărului total de leucocite, cu o neutrofilie şi leucopenie semnificativă la 7 zile p.i., şi o revenire la normal a acestor parametrii după 14 zile de la debutul infestaţiei.
- Activitatea fagocitară a fost inhibată în timpul infestaţiei la 7 şi 14 zile p.i., mai intens la lotul de ovine de rasă Ţigaie, iar la lotul Romney March valorile s-au menţinut aproape constante la toate recoltările.

BIBLIOGRAFIE

1. Bowles V.M., Meensen E.N.T, Chandler K., Verhagen A., Nash A.D., Brandon M.R. (1994) – The immune response of sheep infected with larvae of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* monitored via efferent lymph. Veterinary Immunology and Immunopathology 40 (4), 341-352.
2. Colditz I.G., Lax J., Mortimer S.I., Clarke R.A., Beh K.J. (1994) – Cellular inflammatory responses in skin of sheep selected for resistance or susceptibility to fleece rot and fly strike. Parasite Immunology 16 (6), 289-296.
3. Colditz I.G., Woolaston R.R., Lax J., Mortimer S.J. (1992) – Plasma leakage in skin of sheep selected for resistance or susceptibility to fleece rot and fly strike. Parasite Immunology 14 (6), 587-594.
4. Elhay M.J., Hanraham C.F., Bowles V.M., Seow Heng Fong, Andrews A.E., Nash A.D. (1994) – Cytotoxine mRNA expression in skin in response to ectoparasite infection. Parasite Immunology 16 (9), 451-461.
5. Farkas R., Albert M. (2000) – Histological and cellular immune responses in the skin of sheep naturally infested with larvae of *Wohlfahrtia magnifica.* COST Action 833, Ceske Budejovice, Cehia.
6. Farkas R., Hall M. (1998) – Prevalence of traumatic myiasis in Hungary: a questionnaire survey of veterinarians. Veterinary Record 143(16), 440-443.
7. Fenton A., Woll R., French N. (1998) – The incidence of sheep strike by *Lucilia sericata* on sheep forms in Britain: a simulation model. Veterinary Parasitology 76(3), 211-228.
8. Ghergariu S., Pop Al., Kadar L., Spînu Marina (2000) – Manual de laborator clinic veterinar. Edit. ALL educational, Bucureşti.
9. Lima M.A.M., Borja G.E.M. (1997) – Comparative study of the myiasis produced by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) and *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) *(Diptera: Calliphoridae)* in artificially infected sheep. Revista Brasiliera de Medicina Veterinaria 19(5), 200-205.
10. O'Mera T.J., Nesa M., Seaton D.S., Sandeman R.M. (1995) – A comparison of inflammatory exudates released from myiasis wounds on sheep bred for resistance or susceptibility to *Lucilia cuprina.* Veterinary Parasitology 56(1/3), 207-223.
11. Ruiz–Martinez I., Perez-Jimenez J.M., Cruz-Mira M. (1993) – Epidemiology of wohlfahrtiosis in sheep and goats. Investigacion Agraria, Producciion y Sanidad Animales 8 (3), 299-311.
12. Şuteu I., Cozma V. (2004a) – Parazitologie clinică veterinară. Vol. II, Edit. Risoprint, Cluj-Napoca.
13. Vignau M.L., Arias D.O. (1997) – Cutaneous myiasis in small animals. Parasitologia la Dia 21(1/2), 36-39.

AMPLIFICAREA RASPUNSULUI IMUN MEDIAT CELULAR CU AJUTORUL UNUI ADJUVANT VACCINAL CU PROPRIETATI IMUNOMODULATARE

GÂJÂILĂ G., GÂJÂILĂ Iuliana, COTOR G.
USAMV Bucureşti
immunogg@yahoo.com

The use of vaccinal adjuvants represents a method to amplify the immune response, and ethanolamine derivates, known as "AVR products", are considered possible stimulators of the immune response in animals. The swine is the species chosen for testing the modification induced by the AVR product to the immune system. In this faze of the research program, the accent was put on the effect induced by the AVR product to unvaccinated and healthy piglets. The animals were divided into 4 groups, each group consisting of 10 animals: the witness group, the experimental group A that was administrated 15 mg/Kg AVR product intramuscularly, the experimental group B that was administrated 45 mg/Kg AVR product intramuscularly and the experimental group C that was administrated 45 mg/Kg AVR product orally. The experiment took place on a period of 45 days. The evaluation of the modification induced by the AVR products to the immune response

was made through leucograms, numeric and functional evaluation of the T lymphocytes and B lymphocytes population and subpopulation. Also, a numeric and functional evaluation of neutrophiles was done. For a better analysis of the impact of administrating AVR product on the molecular component of the immune response, level determinations of serum antibodies (IgG, IgM) and level determinations of complement system proteins were made. The results obtained in this faze of the experiment highlighted the immunomodulatory qualities of the AVR product, offering the optimum dose from which its effects start manifesting themselves.

Unul din obiectivele majore ale cercetărilor din domeniul imunologiei îl reprezintă elaborarea de vaccinuri menite să inducă un eficient răspuns imun mediat celular. Utilizarea adjuvanților vaccinali constituie o cale de amplificare a răspunsului imun, iar derivații etanolaminei, denumiți convențional „produşi AVR" reprezintă posibili stimulatori ai răspunsului imun la animale. Porcul reprezintă specia aleasă de noi pentru testarea modificărilor induse de produsul AVR sistemului imun. Prin fiziologia sa apropiată de cea a omului, porcul constituie un interesant model de studiu, în special în domeniul mecanismelor imune de cooperare celulară.

În această fază a programului de cercetare s-a avut în vedere studiul efectelor induse de produsul AVR la purcei nevaccinați şi cu o bună stare de sănătate.

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul biologic utilizat în derularea experimentului a fost reprezentat de 40 de purcei cu greutatea medie de 15 kg şi vârsta cuprinsă între 60-70 zile. Animalele au fost repartizate în patru loturi, cu câte 10 animale: lotul martor, lotul experimental A la care s-a administrat intramuscular produs AVR în doză de 15 mg/kg corp, lotul experimental B la care s-a administrat intramuscular produs AVR în doză de 45 mg/kg corp şi lotul experimental C la care s-a administrat 45mg/kg corp produs AVR pe cale orală. Experimentul s-a derulat pe o perioadă de 45 de zile.

Evaluarea modificărilor induse de produse AVR răspunsului imun s-a realizat prin efectuarea leucogramei, evaluarea numerică şi funcțională a populațiilor şi subpopulațiilor de limfocite T şi limfocite B. De asemenea s-a realizat o evaluare numerică şi funcțională a fagocitelor polimorfonucleare neutrofile. Pentru o mai bună analiză a impactului administrării produsului AVR asupra componentei umorale a răspunsului imun s-au efectuat şi determinări ale nivelului anticorpilor serici (IgG, IgM) şi nivelul proteinelor sistemului complement.

Separarea celulelor sanguine s-a realizat pe baza gradientului de densitate, prin centrifugarea sângelui în mediile Ficoll şi Percoll. Tehnicile aplicate au permis separarea în stare pură a populațiilor de limfocite şi neutrofile.

Evaluarea numerică a subpopulațiilor de limfocite s-a realizat prin tehnica de separare pe vată de nailon şi tehnicile de rozetare E şi EA. Capacitatea de blastizare a limfocitelor T şi B a fost analizată

prin testul de transformare limfoblastică, varianta de dozare a glucozei consumate în mediul de reacţie. Mitogenul utilizat în cazul ambelor populaţii de limfocite a fost fitohemaglutilina.

Populaţia de neutrofile din sângele total a fost separată prin tehnica în gradient de densitate cu mediul Percoll, analizându-se ulterior capacitatea de migraţiune, pe strat filtrant de tip Boyden. Determinarea capacităţii de digestie intracelulară şi a activităţii bactericide s-a realizat utilizând ca indicatori tulpini standardizate de *Staphylococcus aureus*.

Stabilirea impactului produsului testat asupra statusului imun umoral a urmărit determinarea titrului imunoglobulinic al claselor IgG şi IgM prin tehnica de imunodifuzie radială Mancini. Serurile de referinţă utilizate au fost etalonate prin tehnici imunoenzimatice.

Titrarea complementului total s-a efectuat prin imunodifuzie radială, pe bază de seruri standardizate de concentraţie cunoscută.

REZULTATE

Valorile corespunzătoare parametrilor analizaţi au fost sintetizate în funcţie de lot şi intervalul de administrare. Stabilirea statusului imunitar iniţial al animalelor testate s-a realizat pe probe de sânge recoltate anterior administrării produsului.

Mediile valorilor corespunzătoare parametrilor studiaţi la animalele din cele patru loturi aflate sub observaţie sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 1

Rezultatele comparative obţinute la animalele aflate sub observaţie, din cele patru loturi, fără administrare de produs AVR

Parametru analizat	**Lot martor**	**Lot A**	**Lot B**	**Lot C**
Raport limfocite neutrofile (L/N)	0,76	0,93	0,85	0,75
Raport LT/LB	0,64	0,70	0,64	0,76
Raport LTh/LTs	1,60	1,27	1,32	2,33
Indici stimulare LT	7,60	8,40	7,81	12,40
Indici stimulare LB	12,71	11,90	14,20	13,10
Indicator migraţiune celulară	127,50	114,20	122,10	142,50
Indicator digestie celulară	53,80	67,80	48,50	59,80
IgG	12,4	11,5	12,1	11,8
IgM	4,8	4,2	6,1	5,7
Dozare complement	93,4	86,7	74,2	105,2

Valorile medii ale parametrilor studiaţi obţinute după 15 zile de la administrarea produsului AVR la animalele din cele patru loturi aflate sub observaţie sunt prezentate în tabelul 2.

Tabel 2

Rezultatele comparative obţinute la animalele aflate sub observaţie, La 15 zile de la administrarea produsului AVR

Parametru analizat	**Lot martor**	**Lot A**	**Lot B**	**Lot C**
Raport limfocite neutrofile (L/N)	0,62	1,19	1,20	0,87
Raport LT/LB	0,78	1,10	0,96	0,78
Raport LTh/LTs	1,85	1,15	1,22	1,22
Indici stimulare LT	8,60	11,20	12,80	18,70
Indici stimulare LB	11,42	10,32	13,60	14,10
Indicator migraţiune celulară	112,20	127,80	115,20	214,50
Indicator digestie celulară	57,40	72,10	68,10	61,10
IgG	11,2	13,4	12,0	14,8
IgM	3,9	6,8	5,8	6,2
Dozare complement	106,2	98,7	62,4	67,8

Valorile medii ale parametrilor studiaţi obţinute după 30 de zile de la administrarea produsului AVR la animalele din cele patru loturi aflate sub observaţie sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3

Rezultatele comparative obţinute la animalele aflate sub observaţie, La 30 zile de la administrarea produsului AVR

Parametru analizat	Lot martor	Lot A	Lot B	Lot C
Raport limfocite neutrofile (L/N)	0,53	1,24	0,72	0,52
Raport LT/LB	0,52	2,33	3,00	0,31
Raport LTh/LTs	0,85	2,57	2,84	0,61
Indici stimulare LT	18,10	19,6	26,10	10,61
Indici stimulare LB	12,22	12,12	16,10	9,50
Indicator migraţiune celulară	105,00	121,00	138,10	116,80
Indicator digestie celulară	68,40	32,40	79,00	68,10
IgG	8,4	10,2	16,7	13,6
IgM	2,2	6,4	7,1	8,1
Dozare complement	61,2	71,2	44,5	58,2

Valorile medii ale parametrilor studiaţi obţinute după 45 de zile de la administrarea produsului AVR la animalele din cele patru loturi aflate sub observaţie sunt prezentate în tabelul 4.

Tabelul 4

Rezultatele comparative obţinute la animalele aflate sub observaţie, La 45 zile de la administrarea produsului AVR

Parametru analizat	Lot martor	Lot A	Lot B	Lot C
Raport limfocite neutrofile (L/N)	0,48	0,65	0,74	0,46
Raport LT/LB	0,61	1,00	2,12	0,63
Raport LTh/LTs	0,92	0,92	2,03	1,27
Indici stimulare LT	10,02	15,18	19,12	18,32
Indici stimulare LB	8,70	14,20	18,30	9,60
Indicator migraţiune celulară	92,00	81,00	128,15	38,14
Indicator digestie celulară	71,00	97,00	88,20	71,10
IgG	9,6	7,8	10,1	12,1
IgM	3,4	2,1	5,2	2,3
Dozare complement	56,2	*test ratat	51,2	71,8

CONCLUZII

Rezultatele obţinute în această fază a experimentului au permis formularea următoarelor concluzii:

1. Produsul AVR administrat pe cale parenterală şi orală nu a produs reacţii adverse locale şi generale.
2. Populaţiile celulare analizate din punct de vedere cantitativ au prezentat modificări semnificative faţă de lotul martor în cazul lotului experimental B unde s-a constatat o creştere a valorilor raportului LT/LB precum şi a valorilor raportului LTh/ LTs.
3. Valorile înregistrate la lotul experimental B prezintă modificări majore în ceea ce priveşte indicele de stimulare blastică a limfocitelor T şi B, ceea ce denotă că întreaga populaţie de limfocite este stimulată funcţional de către produsul AVR.
4. Evaluarea funcţiei fagocitare a neutrofilelor demonstrează o stimulare numai la nivelul indicatorul digestie celulară, cu valori semnificative la lotul experimental B.
5. Titrul imunoglobulinic nu prezintă diferenţe perceptibile la loturile analizate, ceea ce denotă o slabă influenţă a produsului faţă de anticorpogeneza nespecifică.
6. Titrul complementului seric a suferit scăderi sub limitele fiziologice normale, dar au fost efect al aportului nutritiv scăzut, datorat unei perioade de caniculă prelungită.
7. Experimentul a evidenţiat calităţile imunomodulatoare ale produsului AVR, furnizând doza optimă de la care acesta începe să-şi manifeste efectul.

BIBLIOGRAFIE

1. **Bordea M., Ardeleanu C., Dolganiuc A.**, **Olinescu A., Vrăbiescu Al. –** Morphofunctional aspects of the influence of procaine and diethylaminoethanol treatment on the immune system of rabbits. Rom.J. Physiol., 1998, 35,1-2, p. 111-126.

2. **Gâjâilă G., Iuliana Gâjâilă, Andreea Şerban, Mitrea I.L.** – Evaluarea activităţii fagocitare la porc în urma administrării de muramildipeptide – Lucrări Ştiinţifice, Seria C, Medicină Veterinară, Bucureşti, 2001.
3. **G. Gâjâilă -** Sistemul imunitar la suine**,** Editura Cartea Universitară, 2003, Bucureşti.
4. **Dawson H.D., Royace A.R., Nishi S., Kuhar D., Schitzlein W.M. –** Identification of key immune mediators regulating T helper 1 responses in swine. Veterinary Immunology and immunopathology, 2004, Volume 100, Nr. 1-2, 105-111.
5. **Vrăbiescu Al.**, **Radu D., Ardeleanu C.** – New Data on zje influence of diethylaminoethanol therapy on the immune system of rabbits. Rom. J. physiol., 2001, 38, 1-4, p. 153-165.
6. **Vrăbiescu Al., Dobre V., Dolcos Fl., Poli Th.** – Researches concenrning diethylaminoethanol antiinflammatory action. Rom. J. physiol., 2001, 38, 1-4, p. 59-61.

THE STANDARD OF THE BUCOVINA ROMANIAN SHEPHERD DOG BREED

GAŞPAR C-tin. V., GAŞPAR C., GAŞPAR G.
FMV IAŞI

The official start point in creating and homologation a breed is the standard that carefully presents all the details of it's morpho-physiologic and ethologic characteristics.

In the paperwork we will present the board lines of the official standard of the Bucovina Romanian Shepherd (B.R.S.) Dog breed.

STANDARD

Origine: România

Utilizare: câine ciobănesc pentru turmele de oi şi bovine. Excelent câine de pază.

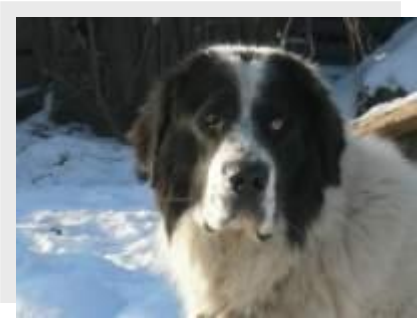
Clasificare F.C.I. : grupa a II –a Pinscher-Schnauzer, Molossoizi. Câini de cireadă şi de munte elveţieni şi alte rase Secţiunea 2,2 – Molossoizi, tip montan. Fără probă de lucru.

Scurt istoric : Ciobănescul Românesc de Bucovina este o rasă naturală care s-a format în arealul Carpaţilor, în Bucovina, mai exact în nord-estul României. Această rasă a beneficiat de o atenţie specială în ceea ce priveşte selecţia şi ameliorarea, ceea ce a condus la existenţa tipului actual. În această regiune, exemplarele rasei sunt utilizate cu mare succes la paza turmelor şi a proprietăţii. Acest câine mai este foarte cunoscut şi sub denumirea de „ Dulău ” sau „ Căpău” . Primul standard a fost redactat în 1982 şi reactualizat în 2001 de către Asociaţia Chinologică Română. Standardul actual datând din 29-03-2002, a fost redactat şi actualizat în conformitate cu modelul stabilit de Adunarea Generală F.C.I. de la Jerusalem, în 1987.

Aspect general: câine de talie mare, impozant, temerar şi mândru; dimorfismul sexual este bine marcat.

Proporţii importante: raportul între lungimea botului şi lungimea craniului este de 1 la 1, lungimea corpului fiind uşor mai mare decât înălţimea la grebăn; angulaţia scapulo-humerală măsoară circa 100˚-110˚ .

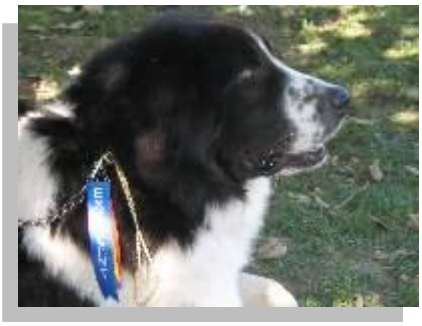
Comportament : caracter echilibrat, calm, foarte devotat, iubeşte copiii; excelent câine de pază pentru turme, plin de curaj şi foarte combativ cu eventualii prădători (urs, lup, râs); are un lătrat foarte puternic; apropierea de teritoriul său a necunoscuţilor sau a animalelor este semnalată printr-un lătrat foarte puternic, cu tonalitate joasă ce poate fi auzit de la distanţe foarte mari, pe timpul nopţii el patrulează în jurul proprietăţii sau a turmelor.



Cap: *masiv, portul său este uşor ridicat în raport cu linia spatelui.*

Regiunea craniană: craniul potrivit de lat; axele longitudinale ale craniului şi ale botului sunt uşor convergente; craniul, văzut din faţă este uşor bombat; văzut din profil, este aproape plat; lăţimea craniului este la masculi de 16-18 cm, iar la femele este de 15-17 cm; arcade zigomatice potrivit de dezvoltate; protuberanţa occipitală puţin marcată .

Stop: uşor marcat



Regiunea facială - trufa: bine dezvoltată şi lată, de culoare neagră

-bot: tronconic; bine dezvoltat, care se îngustează progresiv către extremitate, dar niciodată nu devine ascuţit .

-buze groase şi bine aplicate, puternic pigmentate (de culoare neagră)

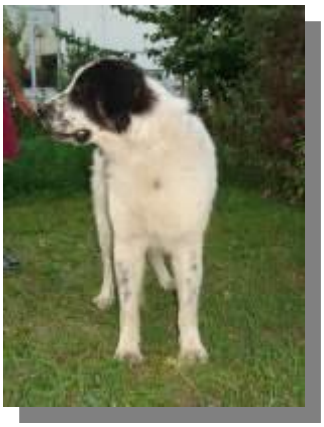
-maxilare/dinţi: maxilare puternice, dentiţie completă cu dinţi sanătoşi, bine implantaţi, de culoare albă; muşcătură în foarfece; muşcătura în cleşte este admisă dar nedorită .

- obraji: nu sunt proeminenţi .

- ochi: mici în raport cu dimensiunile capului; migdalaţi şi oblici, de culoare castanie sau uşor mai deschisă niciodată de culoare galbenă; pleoape bine pigmentate (de culoare neagră)

- urechi: prinse relativ sus, în formă de „V" cu extremitatea uşor rotunjită, căzute şi bine apropiate (chiar lipite) de obraji: amputarea lor este interzisă.

Gât: de lungime potrivită, gros şi puternic, lipsit de salbă.
Corp: masiv, viguros
Linia superioară: orizontală
Grebăn: puţin marcat
Spate: bine susţinut, foarte musculos
Şale: puternice, foarte musculoase
Crupă: musculoasă şi moderat (uşor) înclinată către baza cozii
Piept: lat şi înalt , atingând nivelul coastelor; coaste bine arcuite



Linie inferioară: uşor ridicată

Coada: prinsă destul de înalt (sus); în repaus este purtată jos atingând punctul jaretului sau chiar mai jos; când câinele este atent sau în acţiune, ea este purtată în formă de seceră putând depăşi nivelul spatelui; amputarea este interzisă .

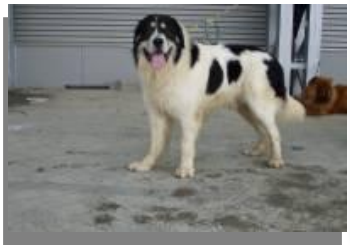
Culoare clasică: fondul trebuie să fie alb cu pete bine definite de culoare nisipiu cărbunos (lupie) tigrată (admisă dar nedorită), sau neagră; pe membre, se admit stropituri negre sau de diferite nuanţe

Culori uniforme: robele uniforme (fără pete), de culoare integral albă, lupie sau neagră sunt acceptate dar nu căutate.

Talie şi Greutate*: înălţimea la grebăn: la masculi 68-78 cm. (ideal 71-75 cm.) la femele 64-72 cm. (ideal 66-68 cm.)*

-greutate: în raport cu talia

Defecte: orice abatere faţă de cele de mai sus constituie defect care se va penaliza în funcţie de gravitatea abaterii respective: constituţie fină sau prea groaie; caractere sexuale insuficient marcate; lipsuri dentare, altele decât PM1; urechi cupate; coadă amputată; exemplare obeze sau fără vigoare; păr împâslit sau scurt (mai puţin de 6 cm.) păr prea lung (depăşind 9 cm.); absenţa coamei sau a franjurilor de pe membre; coadă rulată în formă de inel; labe deschise, răsucite spre interior sau exterior; coate deviate spre exterior (defecte de aplomb); mişcare greoaie .



Defecte grave: expresie străină rasei; ochi rotunzi, proeminenţi (exoftalmici); urechi drepte; linie superioară înşeuată, cifozată sau prea lungă; păr foarte scurt; păr buclat sau de altă textură decât cea prevăzută de standard; ochi galbeni; heterocromie oculară (ceacâr); jareţi de vacă (şi alte defecte de aplomb)

Defecte eliminatorii: câine agresiv sau temător; subiect atipic; prognatism inferior sau superior; absenţa incisivilor sau a caninilor; albinism; alte culori decât cele descrise în standard; coada absentă sau atrofiată (lipsa cozii sau atrofia acesteia) talie sub 65 cm. sau peste 85 de cm. la masculi; talie sub 62 cm. sau peste 75 de cm. la femele.

Orice câine care prezintă în mod evident anomalii de ordin fizic sau comportamental va fi descalificat.

N.B. Masculii trebuie să aibă două testicule cu aspect normal, complet coborâte în scrot.

Acest standard a fost revizuit de reprezentanţii F.C.I , domnii Raymond Triquet si Bernard Denis, la Gura Humorului, în 22 august 2004, şi aprobat de Comisiile F.C.I. de Standarde şi Stiinţifică la data de 18-19 sept, 2004, Sarlat – Franţa –

BIBLIOGRAFIE

1. Bugnariu, Petre-Niţu: Compendiu de zootehnie şi patologie canină, Timiş, Editura Helion, 1999;
2. Dinu I.: Dicţionar enciclopedic de zootehnie,Editura Ceres, Bucureşti, 1982;
3. R. Falappi : Cunoaşterea, recunoaşterea şi creşterea celor mai cunoscute rase de câini din lume, Editura All, Bucureşti, 1999;
4. x x x - Colecţia “Câinii noştri” (1979-1990), Bucureşti;
5. x x x - Colecţia Revistei “Lumea animalelor” (1994-1997), Bucureşti;
6. x x x - Revista Carpaţi, 1936;
7. x x x - Revista ştiinţelor veterinare 1934;
8. x x x - Colecţia “Dog Magazin”;
9. x x x - A.Ch.R. Standardul Rasei Ciobănesc Românesc de Bucovina
10. x x x - A.Ch.R. Regulamentul Cărţii de Origine;
11. x x x - A.Ch.R. Regulamentul de creştere a câinilor de rasă
12. x x x - A.Ch.R. Regulamentul expoziţiilor canine;
13. x x x - FCI Regulamentul internaţional de creştere.
14. www.**bucovina**dogs.ro

THE BECOMING OF THE BUCOVINA ROMANIAN SHEPHERD DOG BREED

GAŞPAR C-tin. V., GAŞPAR C., GAŞPAR G.
FMV IAŞI
gabibreik@yahoo.com

The efforts of many passionate Romanians , during many decades , for creating a national dog breed that represents the region of the Carpathian Mountains , were accomplished with success even thaw there have been many obstacles, doubts, difficulties .

We present here a short history of the Bucovina Romanian Shepherd (B.R.S.) Dog Breed that is now small step away from official confirmation from the International Chinologic Federation (F.C.I.).

Ciobănesc Românesc de Bucovina – Etalon

Scurt istoric : Ciobănescul Românesc de Bucovina este o rasă naturală care s-a format în arealul Carpaţilor, în Bucovina, mai exact în nord-estul României. Această rasă a beneficiat de o atenţie specială în ceea ce priveşte selecţia şi ameliorarea, ceea ce a condus la existenţa tipului actual. În această regiune, exemplarele rasei sunt utilizate cu mare succes la paza turmelor şi a proprietăţii. Acest câine mai este foarte cunoscut şi sub denumirea de „ Dulău ” sau „ Căpău” . Primul standard a fost redactat în 1982 şi reactualizat în 2001 de către Asociaţia Chinologică Română. Standardul actual datând din 29-03-2002, a fost redactat şi actualizat în conformitate cu modelul stabilit de Adunarea Generală F.C.I. de la Jerusalem, în 1987.

1937 în revista Carpaţii apare primul proiect de standard pentru Câinele Ciobănesc de Rasă Românească,proiect de standard care a rămas din păcate doar la acest stadiu.

1939 În revista Jandarmeriei apare fotografia unui câine Ciobănesc de Rasă Românească de culoare clasică – fond alb cu pete de culoare neagră

CARPAŢII • 1936. No. 9. 241

Câteva cuvinte despre cânele ciobănesc carpatin

de: MIHAI MOŞANDREI

Dulăul, cânele ciobănesc de stână, — iată un subiect care dacă preocupă mai puţin pe vânători, interesează mai cu seamă pe chinologi, şi poate în deosebi pe cei streini, ce adesea mi-au cerut lămuriri despre el.

In puritatea rasei acest animal nu numai că e un impunător tovarăş, prin măreaţa înfăţişare ce are în ea ceva sălbatec, dar şi prin calităţile lui de câne de *straje* şi *atac* ce sunt neîntrecute.

Ce am făcut totuşi până azi pentru acest soiu de ciobănesc, pe care mulţi români îl confundă cu orice câne vagabond de lăptar, ce cutreeră străzile capitalei? Trebue să mărturisim: nimic, sau aproape nimic, cu toată generoasa şi semnificativa iniţiativă regală, cu toată vechea lui origină neaoşă românească, ce se confundă cu aceea a primilor păstori rătăcitori peste povârnişurile şi platurile noastre muntoase.

Au avut loc expoziţii, s'au dat premii importante, totuşi avem noi un standard al rasei când s'au decernat aus zisele distincţiuni? Există azi vre-un club, sau vre-un crescător, ce selecţionează în mod conştient calităţile lui fizice şi morale? Am luptat noi în vre-un fel să facem cunoscut undeva peste graniţe această meritoasă rasă? Am înscris noi, şi am luptat pentru recunoşterea ca soi special al ciobănescului carpatin, înaintea *Federaţiunei Canine Internaţionale*, cu sediul la Bruxelles, aşa cum demult vecinii noştri ungurii au făcut pentru al lor breo maghiar sau ciobăneştii: 1. comondor, 2. kuvasz, 3. pulli, 4. pumi, etc.?...

Sub multe aspecte, dar mai cu seamă al nobilei lui înfăţişări, toate aceste rase rămân cu mult inferioare, ciobănescului nostru, totuşi încă şi el destul de variat ca forme morfologice.

Cred să fi scris despre el cel dintâiu, în reviste streine — aşa cum observă cu atâta prietenie distinsul director al revistei „Carpaţii", Dl. Ionel Pop — şi aceasta în lipsă de orice date scrise, dar după o îndelungă observare a lui în jurul stânelor, şi după migăloase colocviuri cu ciobanii.

In limita timpului liber, voi încerca să fac la fel, pentru oropsitul nostru copoi.

De ce aş şovăi să spun aci ceva mai mult, şi anume că aceste rase băştinaşe nu numai că nu sunt la noi selectate şi crescute în vederea unor anumite scopuri, dar nu de multă vreme fac ţinta chiar, a unei stăruitoare asupriri, dela legiuitor, până la ultimul pazmic de vânat.

Propăşirii şi utilizării lor i-se pune tot felul de piedici, în loc ca prin alte mijloace să se caute suprimarea supraplusului mediocru, dar păstrarea rasei.

Să nu se uite, că măruntul nostru copoi, împreună cu cânele ciobănesc, sunt sigurele rase autohtone, care dacă ar fi intrat în mâni cunoscătoare ar fi putut sta azi printre cele mai valoroase specii.

Dacă rasa noastră de câni ciobăneşti în special, şi-a păstrat o vădită uniformitate, fără intervenţia chinologului amator, apoi aceasta se datoreşte la două cauze principale: 1. izolarea îndelungă în văile şi platourile carpatine, cu lipsa deci de contacturi prelungite cu alte rase; 2. consaguinităţii repetate, ce în viaţa sălbatică păstorească, a fortificat varietatea.

Majoritatea câinilor de păstori din: Balcani, Carpaţi, Abruzi, Alpi şi Pirinei, îşi au trunchiul în strămoşul comun, *dogul tibetan*, de mărimi impresionante şi cu lătrătură ce seamănă aşa cum ne povestesc călătorii, cu răgetul leului.

Totuşi prin alte încrucişări în decursul secolelor, s'a putut forma diferite rase, şi pe care e o greşală să le selectăm având drept model, strămoşul tibetan. Calităţile morale, şi aptitudinile în anumite direcţii, au schimbat mult greoiul tip primitiv.

Iată, după mine, în linii largi şi ce n'au nimic de absolut riguros, standardul sub care trebuie să

„FLOREA", frumos model de câne ciobănesc de Carpaţi. De remarcat grosimea gâtului, abundenţa părului şi perfectul aplomb

„CĂPITAN", câne ciobănesc. Nu toţi câinii noştri ciobăneşti sunt scurţi. Ar fi totuşi de dorit, ca viitorul crescător să-şi facă astfel. Câinii cei mai frumoşi de stână ce-i am văzut, nu aveau coadă

XVI Nr. 1– ? IANUARIE-FEBRUARIE 1938

EVISTA JANDARMERIEI

FONDATĂ IN ANUL 1922

APARE LUNAR

Ciobănesc de rasă românească

Trunchiul rotund şi îndesat, spinarea dreaptă.

Coada lungă, stufoasă, vârful îndoit în sus. Ciobănescul carpatin este adeseori anur (fără coadă) din naştere.

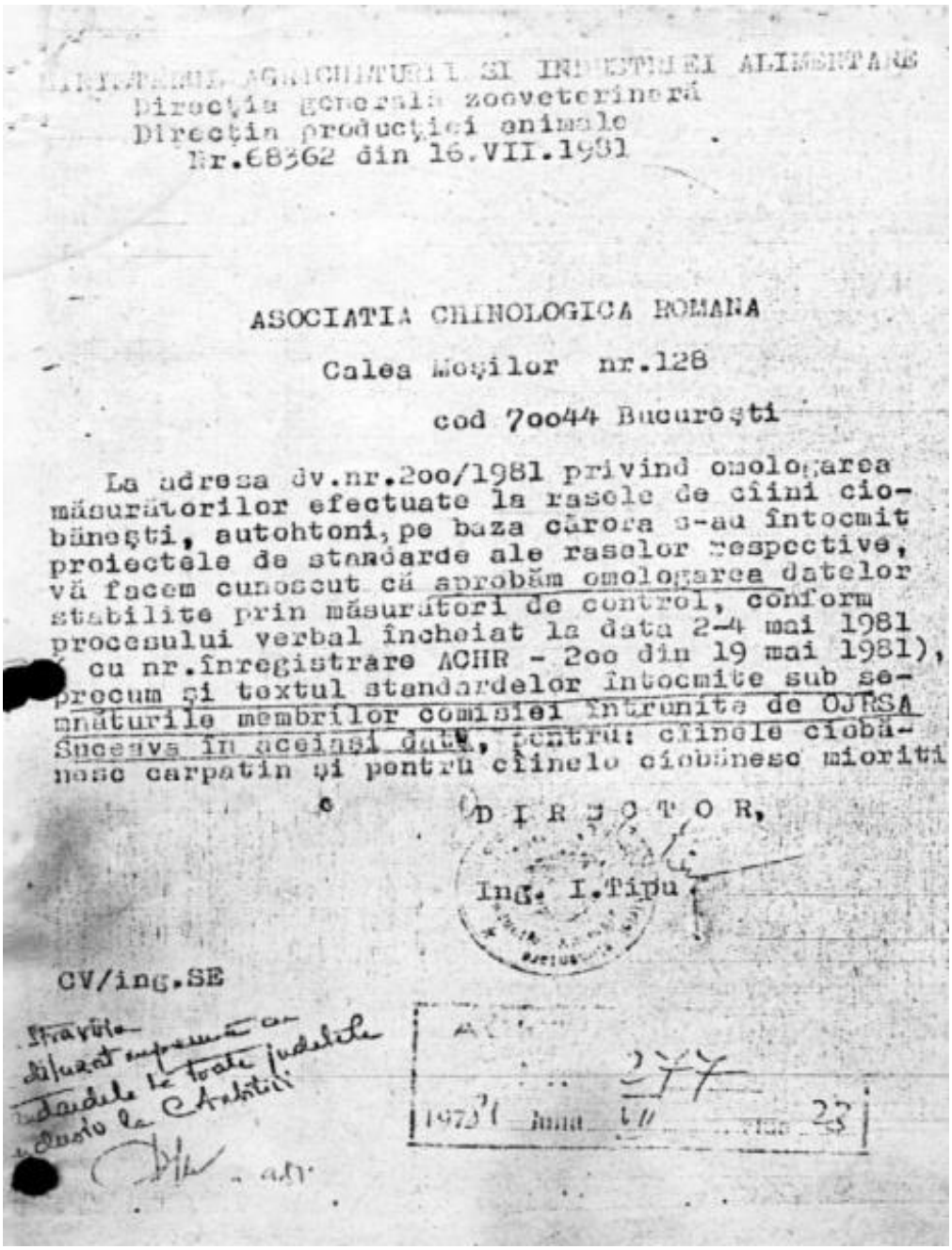
Picioare puternice, nu prea lungi, să nu fie sucite nici înăuntru nici în afară.

Laba cât mai măruntă şi bine strânsă, ca la pisică.

Părul lung, aspru în afară, dar cald şi lânos lângă piele,

— 131 —

1981 – Au fost omologate măsurătorile pentru rasa Ciobănesc Românesc Mioritic şi Ciobănesc Românesc Carpatin (de Bucovina)



MINISTERUL AGRICULTURII SI INDUSTRIEI ALIMENTARE
Direcţia generală zooveterinară
Direcţia producţiei animale
Nr.68362 din 16.VII.1981

ASOCIATIA CHINOLOGICA ROMANA

Calea Moşilor nr.128

cod 70044 Bucureşti

La adresa dv.nr.200/1981 privind omologarea măsurătorilor efectuate la rasele de câini ciobăneşti, autohtoni, pe baza cărora s-au întocmit proiectele de standarde ale raselor respective, vă facem cunoscut că aprobăm omologarea datelor stabilite prin măsurători de control, conform procesului verbal încheiat la data 2-4 mai 1981 cu nr.înregistrare ACHR - 200 din 19 mai 1981), precum şi textul standardelor întocmite sub semnăturile membrilor comisiei întrunite de OJRSA Suceava în aceeaşi dată, pentru: câinele ciobănesc carpatin şi pentru câinele ciobănesc mioritic

DIRECTOR,

Ing. I.Ţipu

CV/ing.SE

Se va
difuza exemplare
la toate judeţele
şi Bucureşti la C.Arabiţă

1981 iunie 27 23

1987- Au fost omologate pe plan intern rasele de câini Ciobănesc Românesc Mioritic şi Ciobănesc Românesc Carpatin (de Bucovina) fără a exista documentaţia necesară conform cerinţelor F.C.I.

1991- Înfiinţarea Asociaţiei Chinologice Bucovina care a avut drept scop declarat , de la înfiinţare , promovarea celor trei rase de Ciobăneşti , în general şi a Ciobănescului Românesc de Bucovina în special.

A.Ch.Bucovina a organizat – 18 expoziţii chinologice cu o participare de fiecare dată a unui număr important de Ciobăneşti Româneşti în general şi Ciobăneşti Româneşti de Bucovina în special - 2 simpozioane şi o masă rotundă având ca temă ciobăneşti româneşti

1995 se întocmeşte primul registru genealogic pentru C.R.M. si C.R.C .-C.R.B.

1996 se deschide registru genealogic numai pentru C.R.B.având ca bază de cercetare populaţia de C.R.B. din Bucovina

2002 – 29 martie A.Ch.R. decide în mod tranşant existenţa a trei rase:
Ciobănesc Românesc Mioritic ,Ciobănesc Românesc Carpatin
Ciobănesc Românesc de Bucovina

2003 -Subcomisia pentru Ciobănesc Românesc de Bucovina depune la sediul A.Ch.R. întreaga documentaţie pentru rasa Ciobănesc Românesc de Bucovina, documentaţie care a stat la baza dosarului pentru omologare depus la F.C.I.

iobănesc
omânesc de
ucovina
punerea
sarului de
nologare
ernaţională

Daniela Constantin

data de 01.02.2003, subcomisia tehnică pentru Ciobănesc Românesc de Bucovina a predat retariatului AChR documentele primare pentru întocmirea dosarului de omologare inter-tională a acestei rase, ocazie cu care a organizat o scurtă conferinţă de presă (surpriză chiar pentru AChR!). Am profitat de această ocazie pentru a lua un interviu Preşedintelui acestei comisii - dr. vet. Viorel Gaşpar.

Pe baza registrului genealogic s-au întocmit cele 8 linii , fiecare linie având minimum 2 masculi şi 6 femele cu o ascendenţă pe 3 generaţii în care nu se regăsesc strămoşi comuni

Linia I M. 1 Cdru 2311 ; 2 Catalan 2410

F . 1 Tisa 2333 ; 2 Molda 2503 ; 3 Moroaica II 2507 ; 4 Breaza 2579 ; 5 Dolca 2591 ;6 Lunca 2607

Linia II M. 1 Pintea 2227 ; 2 Hurmuz 2421 ; 3 Frincu 2380

F . 1 Roua II 2265 ; 2 Naluca 2358 ; 3 Laura 2273 ; 4 Pusa 2460 ; 5 Stela 2480 ; 6 Luna 2604

Linia III M. 1 Bour 2190 ; 2 Bursuc 2402

F . 1 Baba 2116 ; 2 Agrisa 2264 ; 3 Zada 2296 ; 4 Ranura 2431; 5 Aluna 2457 ; 6 Duta 2499 ; 7 Lina 2514

Linia IV M. 1 Ursan 2321; 2 Rarau 2637 ; 3 Calin 2655

F .1 Codruta 2282 ; 2 Frnzana 2371 ; 3 Raza II 2563 ; 4 Putna 2596 ; 5 Furnica 2628 ; 6 Frumoasa 2644

Linia V M. 1 Novac 2535 ; 2 Ochiut 2557 ; 3 Caliman 2565

F .1 Haita 2118 ; 2 Trinca 2440 ; 3 Lusa 2472 ; 4 fetita 2526 ; 5 Dorina II 2625 ; 6 Cimbra I 2634

Linia VI M. 1 Baltag 2621 ; 2 Haiduc 2642

F . 1 Duna 2210 ; 2 Solda 2485 ; 3 Duda 2559 ; 4 Molda II 2572 ; 5 Fulga 2585 ; 6 Azora 2643

Linia VII M. 1 Mures 2426 ; 2 Ursu 2538

F .1 Fraga 2289 ; 2 Astra 2540 ; 3 Runca 2569 ; 4 Mura 2574 ; 5 Dunga 2590 ; 6 Voica 2580

Linia VIII M. 1 Horia 2325 ; 2 Arcan 2684

F .1 Balasa 2268 ; 2 Blinda 2354 ; 3 Salba 2448 ; 4 Tant 2484 ; 5 Frunz 2453 ; 6 Albina 2584 ; 7 Ciuleandra 2588

Expoziţia de Omologare
August 2004
Cele trei Rase C.R.M. C.R.C. si C.R.B.au fost verificate de Comisia Mixtă F.C.I. formată din reprezentantul Comisiei de Standarde şi Comisiei Ştiinţifice F.C.I

Belgrad
Martie 2005
Reverificarea de către Conducerea F.C.I.a celor trei rase

Suceava 13 - octombrie – 2007
Simpozionul Naţional
De Ciobăneşti Româneşti

BIBLIOGRAFIE

1. Bugnariu, Petre-Niţu: Compendiu de zootehnie şi patologie canină, Timiş, Editura Helion, 1999;
2. Dinu I.: Dicţionar enciclopedic de zootehnie,Editura Ceres, Bucureşti, 1982;
3. R. Falappi : Cunoaşterea, recunoaşterea şi creşterea celor mai cunoscute rase de câini din lume, Editura All, Bucureşti, 1999;
4. x x x - Colecţia "Câinii noştri" (1979-1990), Bucureşti;
5. x x x - Colecţia Revistei "Lumea animalelor" (1994-1997), Bucureşti;
6. x x x - Revista Carpaţi, 1936;
7. x x x - Revista ştiinţelor veterinare 1934;
8. x x x - Colecţia "Dog Magazin";
9. x x x - A.Ch.R. Standardul Rasei Ciobănesc Românesc de Bucovina
10. x x x - A.Ch.R. Regulamentul Cărţii de Origine;
11. x x x - A.Ch.R. Regulamentul de creştere a câinilor de rasă
12. x x x - A.Ch.R. Regulamentul expoziţiilor canine;
13. x x x - FCI Regulamentul internaţional de creştere.
14. www.**bucovina**dogs.ro

ASPECTE LEGALE, PRINCIPII ŞI STANDARDE PRIVIND OBŢINEREA PRODUSELOR AGROALIMENTARE ECOLOGICE, DE LA ANIMALE

LEGAL ASPECTS, PRINCIPLES AND STANDARDS REGARDING THE OBTAINING OF ECOLOGIC PRODUCTS FROM ANIMALS

GONCEAROV Magdalena, TUDOR L., MITRĂNESCU Elena
FMV Bucureşti
magdagonciarov@yahoo.com

As far as the chimc substances used in organic agriculture differ from the conventional one by using, in relatively low qunatities, sintetic substances such as:pesticides, herbicides, fertilizators and sintetic antifungic substances, veterinary drugs (antibiotics, growth hormones), auxiliary substances and sintetic conservants. Therefore limiting the potential riscs caused by sintetic residues. This fact meets the consumers standards regarding healthy organic aliments.

The markets demands for organic aliments is rising, firstly because of the consumers conception regarding the quality and safety of these products, and secondly because of the positive impact of the metods applied in organic agriculture towards the environment.

Lucrarea de faţă îşi propune să arate de ce produsele organice trebuie să satisfacă toate standardele de calitate şi siguranţă, aplicate alimentelor obţinute prin metode convenţionale.

În acest sens, este de menţionat faptul că statele membre UE işi aliniază în permanenţă standardele alimentare şi reglementările privind siguranţa alimentelor la cerinţele internaţionale impuse de acordurile dintre Organizaţia Mondială a Comerţului (WTO) şi Uninea Europeană.

Acest fapt a contribuit la îmbunătăţirea completă a implementării măsurilor privind siguranţa alimentelor mai ales în ţările candidate la admiterea în Uninea Europeană.

În ceea ce privesc substantele chimice, agricultura organică se deosebeşte de agricultura convenţională prin utilizarea în măsură foarte restrânsă a componentelor agricole sintetice, cum ar fi : pesticide, ierbicide, fertilizatori şi fungicide sintetice, medicamente de uz veterinar (antibiotice, hormoni de creştere), substanţe auxiliare şi conservanţi sintetici. Astfel, sunt prevenite potenţialele riscuri cauzate de reziduurile componentelor sintetice. Acest fapt susţine asteptările consumatorului ca alimentele organice să fie sănătoase.

Cerinţele pieţei pentru alimentele organice sunt în creştere în primul rand datorită percepţiei consumatorilor asupra calităţii şi siguranţei acestor produse şi în al doilea rând datorită impactului pozitiv al metodelor aplicate în agricultura organică asupra mediului înconjurător.

Se preconizează că această cerere va continua să crească în viitorul apropiat. Date fiind aşteptările consumatorilor, este important ca grupurile guvernamentale, industriale şi ale consumatorilor să examineze cu atenţie consideraţiile legate de calitatea şi siguranţa alimentelor organice şi să intervină ori de câte ori este necesar pentru a asigura protecţia consumatorului la un nivel corespunzător.

S-a demonstrat că alimentele produse organic prezintă nivele reduse de pesticide şi reziduuri de medicamente de uz veterinar şi în multe cazuri de nitraţi. Metodele de hrănire a animalelor aplicate în creşterea şeptelului organic au condus, de asemenea, la reducerea contaminării produselor alimentare de origine animală.

În plus, eticheta ,,organic'' oferă consumatorilor garanţia că nici un ingredient alimentar nu a fost supus iradierii şi că au fost excluse organismele modificate genetic.

Agricultura organică ajută la reducerea contaminării apei de suprafaţă şi de profunzime şi asigură rezervele de apă potabilă în anumite zone, contribuind prin aceasta la siguranţa alimentelor într-un sens larg şi la o agricultură susţinută.

Ţinând seama de potenţialul beneficiu adus mediului inconjurător de catre producţia organică şi de compatibilitatea acesteia cu demersurile de integrare a agriculturii la dezvoltarea mediului rural, agricultura organică poate fi considerată ca o modalitate de dezvoltare în unele ţări.

Este de menţionat şi faptul că structurile foarte variabile din cadrul fermei, condiţiile de mediu şi infrastructura, necesită evaluarea posibilităţilor locale (studiu de fezabilitate) pentru a determina atractivitatea faţă de modelul organic.

La ora actuală, agricultura biologică este în expansiune în nordul Europei, mai ales în Germania şi în Olanda (campioană a agriculturii industriale şi a dezastrelor sale ecologice). Puterile publice colaborează atât în organizarea unor piete, cât şi la nivelul programelor de cercetare. Situaţia agriculturii biologice pare mai puţin favorabilă în ţările Europei de Sud şi de Est, unde fie deteriorarea puternică a mediului, fie schimbările social-politice din ultimii ani, frânează dezvoltarea unei strategii ecologice pe termen lung.

Bilanţuri comparative, stabilite cu precizie pe plan local în mai multe ţări din Europa şi asupra unui mare număr de ferme agricole din SUA, arată că randamentele medii ale culturilor biologice sunt, în general, cu puţin mai scăzute, dar rentabilitatea agriculturii biologice este egală şi uneori superioară datorită costului minimal de producţie. Nu mai este necesară cumpărarea masivă de produse agrochimice costisitoare, sunt mai puţine investiţii şi imprumuturi pentru cumpărarea de material agricol, se consumă mai putină energie, iar mâna de lucru este mai intens folosită.

Un aspect prea puţin relevant dar foarte important este mai buna calitate a produselor biologice care au mai multă savoare, valoare nutriţională mai ridicată (continut ridicat in elemente minerale, oligoelemente şi vitamine in produsele vegetale) şi sunt lipsite de reziduurile agrochimice toxice (in carne mai ales).

În plus, plantele sunt mai sănătoase şi mai rezistente, iar animalele sunt crescute în condiţii conforme cu nevoile lor fiziologice şi cu modul lor natural de viaţă.

Pe lângă rentabilitate şi calitatea produselor, agricultura biologică mai prezintă şi alte avantaje :

- asigură o mai mare stabilitate producţiei, atât vegetale cât şi animale.
- policultura şi alegerea de varietăţi şi soiuri sau de rase bine adaptate la condiţiile climatice permit evitarea dezastrelor, cum sunt, spre exemplu, cele provocate de anii secetoşi succesivi. Creşterea animalelor în aer liber permite să se evite epidemiile devastatoare (ciuma porcină, boala ,,vache folle'', etc), care afectează crescătoriile industriale şi care obligă uneori la sacrificarea a zeci de mii de animale.
- mai buna protecţie a mediului, înconjurător. Protecţia solurilor este asigurată de utilizarea pe termen lung şi de practicile antierozive (menţinerea unui covor vegetal bine închegat, refacerea gardurilor vii, a talazurilor, a tufărişurilor). Preferinţa pentru soiurile şi rasele locale conservă diversitatea genetică creată de om, plecând de la biodiversitatea naturală.
- eliminarea poluării generalizate a ecosistemelor, prin pesticide, favorizează refacerea biodiversităţii naturale.
- neutralizarea ingrăşămintelor chimice de sinteză, mai ales a nitraţilor şi absenţa ,,producţiei'' de materii reziduale în exces, rezultate de la crescătorii (şi care sunt adesea toxice), diminuează poluarea pînzelor freatice cu nitraţi.
- acţiunea benefică asupra amenajării peisajului natural. Dezvoltarea policulturii, asociată cu creşterea de animale, preconizată de către partizanii agriculturii biologice, va permite remedierea banalizării peisajelor rurale, provocată de extinderea monoculturii, de dispariţia crescătoriilor tradiţionale şi de dezvoltarea crescătoriilor industriale (in hangare super – artificializate şi automatizate). De altfel, costurile pentru instalaţii şi cele de producţie, relativ scăzute in agricultura biologică, vor face posibilă reinserţia unei agriculturi de tip familial şi o mai mare solicitare a mâinii de lucru.

CONCLUZII

1. Produsele organice trebuie să satisfacă toate standardele de calitate şi siguranţă aplicate alimentelor obţinute prin metode convenţionale.
2. În ceea ce priveşte substantele chimice, agricultura organică se deosebeşte de agricultura convenţională prin utilizarea în măsură foarte restrânsă a componentelor

agricole sintetice, cum ar fi : pesticide, ierbicide, fertilizatori şi fungicide sintetice, medicamente de uz veterinar (antibiotice, hormoni de creştere), substanţe auxiliare şi conservanti sintetici.

3. Cerinţele pieţei pentru alimentele organice sunt în creştere în primul rand datorită percepţiei consumatorilor asupra calităţii şi siguranţei acestor produse şi în al doilea rând datorită impactului pozitiv al metodelor aplicate in agricultura organică asupra mediului inconjurător.
4. S-a demonstrat că alimentele produse organic prezintă nivele reduse de pesticide şi reziduuri de medicamente de uz veterinar şi în multe cazuri de nitraţi. Metodele de hrănire a animalelor, aplicate în creşterea şeptelului organic au condus, de asemenea, la reducerea contaminării produselor alimentare de origine animală.
5. Eticheta ,,organic'' oferă consumatorilor garanţia că nici un ingredient alimentar nu a fost supus iradierii şi că au fost excluse organismele modificate genetic.
6. Agricultura organică ajută la reducerea contaminării apei de suprafaţă şi de profunzime şi asigură rezervele de apă potabilă în anumite zone, contribuind prin aceasta la siguranţa alimentelor într-un sens larg şi la o agricultură susţinută.
7. Ţinând seama de potenţialul beneficiu adus mediului inconjurător de catre producţia organică şi de compatibilitatea acesteia cu demersurile de integrare a agriculturii la dezvoltarea mediului rural, agricultura organică poate fi considerată ca o modalitate de dezvoltare în unele ţări.

BIBLIOGRAFIE

1. DECUN M. – Legislaţie pentru managementul calităţii produselor de origine animală. Editura Mirton, Timişoara, 1999
2. FRĂŢILĂ RODICA – Marketingul produselor alimentare ecologice (1). Revista Biotera, Cluj Napoca nr.2, 2000, p. 29-30
3. HONIKEL – K.O. – Quality of ecological produced foods of animal origin. Dtsch tierarztl wochenschr, 1998, vol. 105, nr.8, p. 293-298
4. xxx. – HG nr. 917 din 13 septembrie 2001 pentru aprobarea Normelor metodologice de aplicare a prevederilor Ordonanţei de Urgenţă a Guvernului, nr. 34/2000 privind produsele agroalimentare ecologice. Emitent Guvernul României, publicată în Monitorul Oficial nr. 640 din 12 octombrie 2001.
5. xxx. – Legea nr. 38 pentru aprobarea Ordonanţei de Urgenţă a Guvernului nr 34/2000, privind produsele agroalimentare ecologice. Emitent Parlamentul României, publicată în Monitorul Oficial nr. 122 din 12 martie 2001.
6. xxx. – Ordin al Ministerului Agriculturii, Alimentaţiei şi Pădurilor şi al Preşedintelui Autorităţii Naţionale pentru Protecţia Consumatorilor pentru aprobarea Regulilor specifice privind etichetarea produselor agroalimentare ecologice, publicat în Monitorul Oficial nr. 778 din 25 octombrie 2002.

CONSIDERAŢII PRIVIND REGLEMENTĂRILE VETERINARE ARMONIZATE SAU RATIFICATE DE ROMANIA, CE PRIVESC PROTECŢIA ANIMALELOR

CONSIDERATIONS REGARDING THE VETERINARY REGLEMANTATIONS ARMONISED OR DEVELOPED BY ROMANIA FOR THE ANIMALS PROTECTION

GONCEAROV Magdalena, MITRĂNESCU Elena, TUDOR I.
FMV Bucureşti
magdagonciarov@yahoo.com

The reglementation of necessary measures for assuring the good conditions of living as well as wellbeeing of animals, with or without am owner (the master, any person who is carrying for it, as well as any other physic or juridical person which cares for the animal) is assured on Romanian territory through veterinary and zooigienic laws regarding the housing of the animals, the feeding, carrying after them, their reproduction, and usage as well as those acts referring to the animals protection and wellbeing.

Along with the law No. 205/2004, referring to the protection of animals, Romania has borrowed into its constitution a series of other European conventions from this domain applied for the wellbeing of animals. The legislation borrowed refers to the wellbeing of animals during transportation, during theirs exploitation, during their sacrification (killing), as well as the wellbeing of animals used for laboratory research.

Primul act normativ care trata de sine statator protectia animalelor , datează în Romania din 1935, fiind reprezentat de Decretul nr. 500 publicat in M.Of. nr.056 din data 03/07/1935, intitulat “Protectia animalelor” care a fost abrogat prin Decretul nr.24 publicat in B.Of. nr. 2 din 06/02/1960.

Reglementarea masurilor necesare pentru asigurarea condițiilor de viață şi bunăstare a animalelor cu sau fără deținător (proprietar, persoană care deține cu orice titlu valabil, pecum şi orice persoană fizică sau juridică în îngrijirea careia se află animalul) este asigurată pe teritoriul Romaniei prin norme sanitare veterinare şi de zooigienă privind adapostirea, hranirea, îngrijirea, reproducția, exploatarea precum şi a celor referitoare la protecția şi bunastarea animalelor.

Deținătorii de animale au obligația de a avea un comportament lipsit de brutalitate față de acestea , de a asigura condițiile elementare necesare scopului pentru care sunt crescute, precum si de a nu le parasi sau izgoni.Detinatorii de animale au obligatia de a asigura acestora în funcție de nevoile etologice, specie, rasa, sex, vîrstă şi categorie de producție, un adapost corespunzător, hrană şi apă suficiente, posibilitatea de mişcare suficiente, îngrijire şi atenție.Detinătorilor de animale le este interzis să aplice tratamente rele (comportament brutal, abuz în utilizarea animalelor, maltratarea şi supunerea animalelor la eforturi inutile, neasigurarea condițiilor minime necesare vieții şi bunăstării acestora).

Orice act de cruzime față de animale, reprezentat de: omorîrea animalelor, din perversitate, precum şi prin practicarea tirului pe animale domestice sau captive; organizarea de lupte între animale sau cu animale ;folosirea de animale vii pentru dresajul ciinilor sau pentru a le controla agresivitatea; folosirea de animale pentru expoziții, publicitate, realizare de filme în scopuri asemanatoare, daca aceste activitati le provoaca suferinte fizice şi psihice, afecțiuni sau răni ; abandonarea unui animal a cărui existență depinde de îngrijirea omului; administrarea unor substanțe destinate stimulării capacității fizice ale animalelor în timpul competițiilor sportive, sub forma dopajului,sunt sancționate de legislația natională în vigoare (Legea 205/2004).

Deţinătorii de animale au obligaţia de a îngriji ăi trata în mod corespunzător un animal bolnav sau rănit.

Autoritatea Natională Sanitară Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor şi Ministerul Administraţiei şi Internelor, prin organele abilitate, monitorizeaza aplicarea prevederilor legii pentru protectia animalelor, persoanele împuternicite, au acces în clădiri, adăposturi şi alte locuri unde sunt ţinute animalele, precum şi dreptul de a solicita informaţii şi documente necesare controlului şi de a preleva probe pentru cercetări şi analize de laborator. În situaţia ţn care locul unde sunt ţinute animalele se afla la domiciliul sau resedinţa detinătorilor de animale, accesul persoanelor abilitate în acest spaţiu se face cu acordul deţinătorului. În lipsa acordului, deţinătorul de animale are obligaţia de a face dovada respectării condiţiilor de îngrijire a animalului (Legea 205/2004).

Pe lîngă Legea 205/2004, lege privind protecţia animalelor, Romania a mai transpus şi o serie de alte convenţii europene cu aplicabilitate în domeniul protecţiei animalelor. Legislaţia transpusă reglementează bunăstarea în timpul transportului, bunăstarea animalelor de fermă, bunăstarea animalelor destinate tăierii sau uciderii, precum şi pe cea a animalelor de experienţă.

Conventiile europene privind protectia animalelor sunt: Conventia europeana privind transportul animalelor în timpul transportului internaţional(1968), Convenţia europeană revizuită privind protecţia animalelor în timpul transportului (2003), Convenţia europeana pentru protecţia animalelor de fermă(1976), Convenţia europeană pentru protecţia animalelor destinate sacrificării(1979), Conventia europeana pentru protectia animalelor vertebrate utilizate pentru experimente sau în alte scopuri ştiinţifice(1986), Convenţia europeană pentru protecţia animalelor de companie(1987). Dupa cum se observa, interesul pentru asigurarea conditiilor de bunăstare ale animalelor exploatate sau aflate în grija omului a fost şi continuă să fie un domeniu de interes internaţional. Unele din aceste convenţii au fost supuse unor protocoale de amendare: Convenţia din 1968 a beneficiat de un protocol aditional în 1976, Convenţia din 1976 a avut un protocol de amendare în 1992, iar Convenţia din 1986 a avut un protocol de amendare în 1998.

Romania a semnat şi ratificat o parte din Convenţiile Europene care fac referire la protectia animalelor în rimpul transportului internaţional, protectia animalelor de companie, protectia animalelor utilizate în scopuri ştiinţifice şi experimentale. Astfel, prin HG nr. 267/1991

Statul roman adera la Convenţia europeană privind protecţia animalelor în transpotul internaţional (elaborată în 1968). Prin Legea 60/2004 s-a ratificat de ţara noastră Convenţia Europeană pentru protecţia animalelor de companie, semnată la Strasbourg la 23 iunie 2003, iar ultima conventie ratificată de Romania este Convenţia europeană pentru protecţia animalelor în transport internaţional (forma revizuită-2003).

CONCLUZII

1. Protecţia animalelor a constituit o problemă de real interes pînă la venirea la putere a regimului comunist ,care a şi abrogat normativele existente şi care reglementau acest subiect.
2. Orice act de cruzime faţă de animale, abandonarea unui animal a cărui existenţă depinde de îngrijirea omului; administrarea unor substanţe destinate stimulării capacităţii fizice ale animalelor în timpul competiţiilor sportive, sub forma dopajului,sunt sancţionate de legislaţia naţională în vigoare prin adoptarea în anul 2004 a Legii 205, lege privind protecţia animalelor.
3. Pe lîngă Legea 205/2004, Romania a mai transpus şi o serie de alte convenţii europene cu aplicabilitate în domeniul protecţiei animalelor. Legislaţia transpusă reglementează

bunastarea în timpul transportului, bunăstarea animalelor de fermă, bunăstarea animalelor destinate tăierii sau uciderii, precum şi pe cea a animalelor de experientă.

BIBLIOGRAFIE

1. Legea nr. 205 din 26/05/2004(cu modificările şi completările ulterioare) - Emitent: Parlamentul României- privind protecţia animalelor
2. Convenţia europeană pentru protecţia animalelor în transportul internaţional (forma revizuita-2003)
3. .Ordinul nr. 83 din 31/03/2006 - Emitent: Autoritatea Naţională Sanitară Veterinară şi pt Siguranţa Alimentelor, pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind respectarea condiţiilor de bunăstare a animalelor pe durata transportului
4. Ordinul nr. 180 din 11/08/2006 - Emitent: Autoritatea Naţională Sanitară Veterinară şi pt Siguranţa Alimentelor pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind protecţia animalelor în timpul sacrificării şi uciderii
5. Ordinul nr. 75 din 15/08/2005 - Emitent: Autoritatea Naţională Sanitară Veterinară şi pt Siguranţa Alimentelor pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind protecţia animalelor de fermă
6. Legea nr. 471 din 09/07/2002 - Emitent: Parlamentul României privind aprobarea Ordonanţei Guvernului nr. 37/2002 pentru protecţia animalelor folosite în scopuri ştiinţifice sau în alte scopuri experimentale

BIODIVERSITATEA STEREOMICROSCOPICA A BACTERIILOR DIN GENURILE LEPTOSPIRA SI PASTEURELA

IPATE Iudith, BOGDAN A.T., IVANA Simona, CAPLAN Magdalena, STRATEANU Amalia, PARASCHIVESCU M., COSTACHE Delia
ACADEMIA ROMANA
CENTRUL DE STUDII SI CERCETARI DE BIODIVERSITATE AGROSILVICA- ACAD.DAVID DAVIDESCU
ipate.iudith@gmail.com

By the 1999 the Pasteurella family of compoud with two principally species: Pas. multocida and Pas. Haemolytica. With occasion of the Internatinale Conferince of Mabula, South Africa, 1999 to agree as Pasteurella on the species Pas. Haemolytica to present characteristics the molecular taxonomy it`s more different for to be include in the same specie. Through this cause the taxon it is abandone and the underspecies has been bestover in treee new species: Mannheimia haemolytica, Mannheimia glucosida and Pasteurella trehalosi. Now the Pasteurella gen have 22 species: Pas. multocida, with tree underspecies: gallicida, multocida and septica; Pas. Trehalosi ,one the etiological agent from the transportation fevre , who include the all biotips T of the past Pas. haemolytica (T_3, T_4, T_{10}, T_{15}); Pas. aerogenes, Pas. anatis, Pas. avium (the old name is: Haemophilus avium), Pas. bettyae, Pas. canis, Pas. dogmatis, Pas. gallinarum, Pas. langaaensis, Pas. mairii, Pas. pneumotropica, Pas. salmonicida, Pas. stomatis, Pas. estudinis, Pas. trehalosi and Pas. volantium, izolated by local infection and comensal of the breathing apparatus.Also the Leptosira gen have the periods the taxonomy change. Befor Listeria have two gen: Lps. interrogans, with 212 patogenenical serovary and Lps. biflexa, with the 63 nepatogenical serovary. Now to endure two clasification: the conventional, to basis from patogenity fenotips and antigenical structure and genetical clasification to accessibil from molecular biological laboratory. In consequence of Global Plan Action for Monitoring Biodiversity- Interlaken 2007, the all people have obligation for identification and monitorizing the biodiversity of species, inclusively of the bacterian species.

OBIECTIVE:

Pentru a putea lupta impotiva zoonozelor bacteriene in primul rand este necesara identificarea acestora. In decursul timpului, o data cu dezvoltarea metodelor stiintifice au fost identificate si alte specii. Conform Global Plan Action for Monitoring Biodiversity- Interlaken 2007, fiecare tara are obligatia de a identifica si monitoriza biodiversitatea speciilor, inclusiv a speciilor bacteriene- stereomicroscopice.

Scopul lucrarii noastre este de a indica speciile din genurile Pasteurella si Listeria pentru o cunoastere cat mai corecta a identificarii acestora prin tehnici moderne, inclusiv de biologie moleculara.

MATERIALE SI METODE DE IDENTIFICARE A LEPTOSPIRELOR

Se pot folosi urmatoarele metode: examinarea directă a leptospirelor , examinarea culturilor de leptospire; detectarea secvenţelor specifice de ADN după amplificare prin reacţia de polimerizare în lanţ (PCR).

Examenul microscopic direct. Se execută din lichidele organice perfect transparente (ser sangvin, lichid peritoneal, pericardic, etc.).

Examinarea se face în câmp întunecat, leptospirele apărând ca filamente regulat spiralate, luminoase, foarte mobile, cu mişcări de înşu-rubare şi de flexie, dar cu deplasare redusă în spaţiu.

Examinarea trebuie efectuată cât mai repede (de la câteva minute până la cel mult 2-3 ore de la prelevarea probelor).

Frotiurile din preparate fluide sau din amprente ale probelor necropsice (ficat, rinichi, avortoni) trebuie colorate Giemsa, ori prin impregnaţie argentică. Impregnaţia argentică este utilă pentru preparatele histopatologice.

Microscopia pe fond întunecat cere experienţă din partea examinato-rului în ceea ce priveşte diferenţierea leptospirelor de artefacte (de exemplu, expansiunile filamentoase ale trombocitelor).

Impregnațiile argentice sunt laborioase, iar interpretarea imaginilor poate fi îngreunată de precipitate (Nicoleta Andreescu).

Izolarea leptospirelor este cea mai sensibilă metodă de demonstrare a prezenței lor, în situația în care sunt absente reziduurile de antibiotice, autoliza tisulară nu este avansată, iar țesuturile sunt procesate în vederea cultivării leptospirelor rapid după prelevare şi - în cazul urinei – la un pH corespunzător. Dacă țesuturile sau fluidele nu pot fi transportate prompt la laboratorul pentru cultivarea leptospirelor, probele se păstrează la 4°C pentru a preveni dezvoltarea altor bacterii şi autoliza probei de țesut. Ca mediu de transport se utilizează mediul lichid sau soluția de 1% albumină serică bovină (BSA) ce conține 100-200µg/ml de 5-fluorouracil.

Mediile de cultură sunt semisolide (agar 0,1-0,2%) şi pot conține BSA şi orice Tween 80 (ex.: mediu Tween 80/BSA sau EMJH) [Hookey JV, 1992] sau BSA şi un amestec de Tween80 şi Tween 40 [Ellis WA, 1986]. Pentru a preveni contaminarea se adaugă anumiți agenți selectivi cum ar fi: 5-fluorouracil [Johnson RC şi Rogers P, 1964], acid nalidixic [Johnson RC şi Seiter CW, 1977], fosfomicin [Oie S şi col., 1986], şi un amestec de rifampicin, polimixină, neomicină, 5-fluorouracil, bacitracină, şi actidionă [Adler B şi col., 1986]. Totuşi, utilizarea agenților selectivi poate duce la reducerea şanselor de izolare a leptopsirelor, mai ales când în probă se găseşte un număr redus de leptospire viabile, iar multe tulpini de leptospire nu cresc în mediile selective ce conțin numeroase antibiotice. Adăugarea a 0,4-1% ser de iepure la mediul de cultură semisolid creşte şansele izolării unor serovaruri leptospirice pretențioase. Culturile se incubează la 29 +/- 1°C pentru cel puțin 16 săptămâni şi preferabil pentru 26 săptămâni [Ellis WA, 1986]. Timpul necesar pentru detectarea culturilor pozitive variază cu serovarul leptospiric şi numărul organismelor prezente în probe. Serovarurile mai puțin pretențioase (ex. L. pomona şi L. grippotyphosa) pot furniza rezultate pozitive în mai puțin de 7-10 zile după inoculare; alte serovaruri (ex: L. hardjo şi L. bratislava) pot necesita un timp mult mai mare. Culturile se examinează prin microscopie cu câmp întunecat la fiecare 1-2 săptămâni. Este important să se folosească o sursă de lumină de 100 watt şi un microscop cu câmp întunecat de calitate foarte bună.

Prezența leptospirelor poate fi de asemenea demonstrată printr-o varietate de tehnici de colorare imunochimice, ex. imunofluorescență [Bolin CA şi col, 1989; Ellis WA şi col, 1982], şi variate tehnici imunohistochimie [Barnett JK şi col, 1999; Ellis TM şi col., 1983; Scanziani EM 1991; Zaki SR şi Shieh WJ,1986]. Acestea sunt utile în diagnosticarea infecțiilor din materialul patologic care nu mai este utilizabil în cultivare sau când se solicită un diagnostic rapid. Deoarece succesul acestor tehnici este dependent de numărul organismelor prezente, acestea nu sunt recomandate în identificarea purtătorilor cronici, la care numărul organismelor poate fi foarte redus sau acestea pot fi localizate într-un singur țesut. Leptospirele nu se colorează satisfăcător cu coloranți anilinici şi tehnica colorației argentice are sensibilitate şi specificitate redusă, deşi acestea sunt tehnici auxiliare de ajutor pentru diagnosticul histopatologic [Baskerville A, 1986].

Tehnicile PCR sunt la acest moment utilizate în unele laboratoare de diagnostic şi în majoritatea laboratoarelor de referință. Prin această tehnică este posibilă detectarea leptospirelor atât în țesuturi cât şi în lichide. Numeroase seturi de primeri PCR au fost deja descrişi [Alt DP şi col., 2001;Barocchi MA şi col, 2001;Gerritsen MJ şi col, 1991; Gravekamp C şi col, 1993; Hookey JV, 1992; Kawabata H şi col, 2001; Merien F şi col, 1992; Smythe LD şi col, 2002; Truccolo J şi col, 2002; van Eys GJ şi col, 1989; Woodward MJ şi col, 1991], o serie dintre ei oferă specificitatea de gen iar alții specificitatea de serovar. Tehnica PCR poate fi foarte sensibilă, dar lipsa specificității (rezultate fals pozitive) poate constitui o problemă. Controlul calității tehnicilor PCR utilizate la diagnosticul leptospirozei solicită atenție deosebită în design-ul laboratorului şi modului de lucru pentru a preveni contaminarea reagenților şi utilizarea probelor de control corespunzătoare [Dragon EA şi col, 1993;McCreedy BJ şi Callawayth H., 1993]. În plus, procesarea probelor în PCR este un alt punct critic şi trebuie corelată cu țesutul, lichidul şi speciile ce urmează a fi testate. O procedură pentru prepararea probelor de urină destinate PCR utilizând baghete magnetice căptuşite cu anticorpi anti-leptospirici reprezintă o perspectivă în identificarea detecției leptospirelor patogene în urină [Taylor MJ şi col, 1997].

Identificarea izolatelor leptospirice este posibilă numai în laboratoarele specializate, iar identificarea completă presupune utilizarea combinată a mai multor proceduri cu scopul stabilirii speciei de *Leptospira* căreia îi aparține izolatul, serogrupului, serovarului şi patogenității. O cultură

leptospirică pură este identificată ca aparţinând unei specii patogene sau saprofite printr-o varietate de teste: abilitatea de a infecta animalele; rezistenţa relativă la 8-azaguanină; activitatea lipazei; toleranţa la sare şi temperatură [Johnson RC şi Faine S, 1984; Johnson RC şi Harris VG, 1967]; amplificarea PCR a secvenţei ADNr 23S [Woo TH şi col, 1997]; şi conţinutul în G+C al ADN-ului [Johnson RC şi Faine S, 1984].

Speciile aparţinând genului *Leptospira* pot fi diferenţiate la nivel de serogrup prin reacţia de aglutinare încrucişată [Dikken H şi Kmety E, 1978]. Diferenţierea ulterioară la nivel de serovar este efectuată clasic prin absorbţie aglutinare încrucişată (cross-agglutination absorption) deşi pentru multe izolate aceasta este la acest moment înlocuită cu metode care consumă mai puţin timp: factor analysis [23], anticorpi monoclonali (MAbs) [Terpstra WJ şi col, 1987, 1985], analiza endonucleazelor de restricţie [Herrmann JL şi bol, 1992; Marshall RB şi col, 1981; Thiermann AB şi col, 1986, 1985] şi diferite tehnici PCR [Brown PD şi Levett PN, 1997; De Caballero OL şi col, 1994; Gerritsen MA şi col, 1995; Perolat P şi col, 1994; Ralph D şi col, 1995; Ramadass P şi col, 1997; Savio ML şi col, 1994; Zuerner RL şi col, 1995, 1997].

Testarea serologică este o procedură de laborator foarte frecvent utilizată pentru a confirma diagnosticul clinic, pentru a determina prevalenţa în populaţie şi pentru a dirija studiile epidemiologice. Anticorpii leptospirici apar în câteva zile de la debutul bolii şi persistă timp de săptămâni sau luni şi în unele cazuri timp de mai mulţi ani. De reţinut că titrul anticorpilor poate fi scăzut la nivele nedetectabile deşi animalele rămân infectate cronic. Pentru a elimina această problemă, sunt necesare metode sensibile de decelare a leptospirelor în urină sau tractul genital al purtătorilor cronici.

Sunt descrise o largă varietate de teste serologice, cu sensibilitate şi specificate, iar două dintre acestea au rol în diagnosticul medical veterinar: testul de microaglutinare (MAT) şi testul imunoenzimatic (ELISA).

Testul de microaglutinare ce utilizează antigene vii este cel mai răspândit test serologic. Acesta este testul de referinţă faţă de care se face evaluarea altor teste serologice şi este recomandat pentru comerţul internaţional.

Pentru ca rezultatele metodei să asigurare sensibilitatea dorită este necesară utilizarea de antigene reprezentative pentru toate serogrupurile cunoscute în arealul de cercetat şi, de preferat, tulpinile să aparţină tuturor serogrupurilor cunoscute. Prin utilizarea izolatelor locale mai mult decât a tulpinilor de referinţă sensibilitatea testului poate fi îmbunătăţită, dar tulpinile de referinţă ajută la interpretarea rezultatelor între laboratoare. Testul de microaglutinare are specificitate bună; anticorpii anti- alte bacterii uzuale nu reacţionează încrucişat cu genul *Leptospira*. Totuşi, există o cross-reactivitate semnificativă între serovarurile de *Leptospira,* un animal infectat cu un serovar poate să aibă anticorpi împotriva serovarului infectant care la testul de microaglutinare reacţionează încrucişat cu alte serovaruri. În plus, animalele care au fost vaccinate împotriva leptospirozei pot avea anticorpi împotriva serovarurilor prezente în vaccinul utilizat, iar situaţia vaccinărilor la animalele aflate în testare trebuie obligatoriu cunoscută. Au fost descrise în detaliu două protocoale de realizare a testului [Hathaway SC şi col, 1986;NVSL, 1987].

Tulpinile selectate pot fi crescute în Tween 80 BSA sau într-un mediu comercial pentru leptospire, incubate la 29 +/- 1°C, culturile se examinează cel mai devreme la 4 zile vârstă, dar nu mai mult de 8 zile. La utilizarea unui spectrofotometru la lungimea de undă de 400 nm antigenul ar trebui să aibă rata transmisiei 60-70%.

Numărul antigenelor de testat este determinat şi un test de screening poate fi efectuat cu o diluţie 1/50 (sau o altă diluţie de start bazată pe principiul testului). În fiecare godeu este adăugat un volum din fiecare antigen, egal cu al volumului de ser diluat, realizând în testul de screening diluţia finală de 1/100. Plăcuţele de microtitrare sunt incubate la 29 +/- 1°C timp de 2-4 ore. Plăcile sunt

examinate prin microscopie în câmp întunecat. Gradul reacţiei este interpretat prin estimarea procentului de leptospire care au aglutinat.

Interpretarea reacţiei de aglutinare a leptospirelor se face astfel: aglutinare 100% = 4+; aglutinare cca. 75% = 3+; aglutinare cca 50% = 2+; aglutinare <50% =1+.

Dacă este efectuat un test de screening, orice ser cu reacţie 2+ la o diluţie 1/100 este titrat la un punt final utilizând dublarea diluţiile serului, pornind la o diluţie finală de 1/100 spre o valoare 1/12.800 sau mai mare. Titrul final este reciproca diluţiei cea mai mare cu o reacţie egală sau mai mare de 2+.

Identificarea antigenelor este un factor crucial în derularea testului de microaglutinare. Antigenele sunt identificare prin utilizarea de ser hiperimun de iepure, anticorpi monoclonali sau metode moleculare care să confirme calitatea lor la anumite intervale de timp, preferabil de fiecare dată când este efectuat testul, dar cel puţin de două ori pe an. Pentru acest scop serul hiperimun de iepure poate fi preparat utilizând un protocol similar cu cel oferit de Subcomitetul pentru taxonomia *Leptospira* [ICSB, 1984]. Pe scurt, sunt selectaţi iepuri sănătoşi cu greutatea de 2-4 kg care exprimă anticorpi anti-leptospira detectabili. La fiecare iepure se inoculează intravenos, la nivelul unei vene auriculare marginale, cultură de leptospire vie bine dezvoltată sau tratată cu formol cu o densitate de aproximativ $2x10^8$ leptospire/ml. La interval de 7 zile sunt administrate cinci injecţii în doză de 1, 2, 4, 6, şi 6 ml. După o săptămână de la administrarea ultimei injecţii se determină titrul omolog de anticorpi prin reacţia de microaglutinare. Dacă titrul este 1/12800, iepurele este anesteziat şi sângerat prin puncţie cardiacă 7 zile mai târziu (14 zile după injecţia finală). Dacă titrul este <1/12800, poate fi administrată o injecţie ulterioară cu 6 ml cultură; la 7 zile după această injecţie este determinat iar titrul de anticorpi omolog. Doar dacă titrul este egal cu 1/12800 procedura ar trebui repetată cu un alt iepure. Pentru a prepara fiecare antiser sunt utilizaţi doi iepuri. Pentru creşterea capacităţii de conservare, este preferat ca antiserul să fie uscat prin congelare în volume de 2 ml şi stocat la 4 ^oC. Alternativ, serul poate fi stocat în volume de 2 ml la -20 ^oC.

Puritatea antigenelor utilizate în microaglutinare se verificată periodic prin cultivare în agar cu sânge şi în bulion tioglicolat. Culturile stoc de antigene se stochează la -70^oC sau în azot lichid. După liofilizare este posibil ca rata de supravieţuire a leptospirelor să fie redusă. Pasajele repetate ale antigenelor în medii lichide are ca rezultat o pierdere a antigenităţii. În acest caz, din cultura stoc se prepară un mediu lichid nou.

În unele situaţii, în testul de microaglutinare pot fi utilizate culturi liofilizate sau cu formol. Principalele avantaje ale utilizării organismelor neviabile sunt acelea că antigenele pot fi standardizate şi costul, dificultatea şi riscul menţinerii culturilor vii de *Leptospira* poate fi evitat. Titrurile determinate prin utilizarea antigenelor vii şi cele determinate cu antigene inactivate pot să nu fie comparabile şi mulţi diagnosticieni au impresia că sensibilitatea maximă a testului de microaglutinare este obţinut prin utilizarea de antigene vii.

Ca un test destinat investigării individuale a animalelor, MAT este de mare folos în diagnosticul infecţiei acute; demonstrarea unei modificări de patru ori a titrului de anticorpi pe perechi de probe de ser din perioada acută şi perioada de convalescenţă are valoare de diagnostic. Testul are limite în a diagnostica infecţii cronice la animale individuale, atât în diagnosticul avortului [Ellis WA şi col, 1982] cât şi în identificarea purtătorilor renali şi genitali [Ellis WA, 1986].

Dacă leptospiroza este o problemă de efectiv (de grup), MAT este mult mai folositor ca test de efectiv. Creşterea mărimii probei îmbunătăţeşte semnificativ

informaţiile epidemiologice, investigarea cazurilor clinice de boală şi supravegherea sănătăţii publice.

În efectuarea unui diagnostic serologic de leptospiroză, serovarul infectant şi starea clinică prezentă trebuie luate în considerare în ansamblu.

Testele ELISA de identificare a anticorpilor anti-leptospira au fost dezvoltate utilizând un număr de preparate antigenice diferite, protocoale de testare şi platforme de testare, incluzând plăci de testare şi teste dipstick. În general, testele ELISA au specificitate mare, dar specificitate de serovar mai slabă decât MAT. A fost dezvoltat şi evaluat în Europa un test ELISA ce măsoară IgG şi IgM canin anti-variate serovaruri leptospira [Hartman EG şi col, 1986, 1984]. IgM anti-leptospira este detectabil prin această metodă în mai puţin de o săptămână după infecţie, înaintea apariţiei anticorpilor aglutinanţi. Anticorpii IgG sunt detectaţi la cânii infectaţi începând cu 2 săptămâni după infecţie şi persistă o perioadă lungă de timp. Deci, câinii cu leptospiroză acută vor avea titruri mari de IgM şi titruri relativ reduse de IgG. Teste ELISA similare au fost dezvoltate şi pentru detectarea anticorpilor anti-leptospirici de bovine, porcine şi ovine [Adler B şi col, 1981; Cho HJ şi col, 1989; Cousins DV şi col, 1985; Mendoza L şi Prescott JF, 1992; Ribotta MJ şi col, 2000; Surujballi O şi Elmgren C, 2000, 1997, 2001; Trueba GA şi col, 1990; Yan KT şi col, 1999]. Rolul major identificat pentru ELISA la speciile de interes economic este utilizarea unui test ELISA IgM pentru identificarea infecţiilor recente [Cousins DV şi col, 1985] şi pentru screening-ul efectivelor în areale unde vaccinarea antileptospirică nu este practicată. Un ELISA Ig-total este de folos în identificarea animalelor cu susceptibilitate totală corespunzătoare pentru activitatea de cercetare [Ellis WA şi Zygraich N, 1989].

Colorația imunofluorescentă directă este o metodă mult mai precisă de diagnostic, însă necesită anticorpi polivalenți anti Leptospira, marcați fluorescent. Se efectuează frotiuri din sedimentul probei de examinat prin următoarele etape: etalarea; uscarea în aer; fixarea 10 minute în alcool absolut; colorarea cu conjugatul fluorescent polivalent, 2 ore la 37°C; se montează sub lamelă în soluție 10% tampon fosfat salin în glicerol; se examinează cu filtrul de excitație BG12 şi de baraj OG1 (pentru marcajul cu fluoresceină).

Cultivarea pe medii de cultură**.** Pentru izolarea germenului se fac însămânțări pe mediul de cultură (mediul Korthof) din sângele animalelor febrile sau din țesuturi care se însămânțează imediat.

Se însămânțează 9-10 eprubete cu mediu Korthof, care conțin, fiecare aproximativ 4 ml de mediu de cultură, cu cantități mici progresiv crescânde de prelevat (Nicoleta Andreescu).

Eprubetele însămânțate se incubează la 28°C. Tulburarea slabă a mediului indică dezvoltarea leptospirelor.

Cultura bacteriană atinge o densitate maximă după 3-10 zile.

*Inoculări la cobai***.** Se injectează cultura contaminată intraperitoneal la cobai (hamster sau şoarece), urmată după 20-60 de minute, de puncție cardiacă, sub anestezie, pentru prelevarea de sânge şi hemocultură. Leptospirele invadează curentul sangvin mai repede decât celelalte bacterii (R. M. Mânzat).Cobaii sunt controlați în prealabil serologic, pentru eliminarea acelora care au anticorpi anti Leptospira.

După inoculare, animalele sunt termometrizate zilnic de 2-3 ori recoltându-se sânge prin puncție cardiacă pentru hemocultură în timpul puseelor febrile de 40-42°C. După a patra zi de boală trebuie controlată apariția anticorpilor prin reacția de aglutinare microscopică. Postmortem, după 21 de zile de urmărire, se observă modificările macroscopice specifice ale organelor şi se efectuează organoculturi în mediul Korthof şi microscopia pe fond negru a amprentelor proaspete din ficat şi corticala renală.

Stabilirea diagnosticului din organe după deces se poate realiza prin:examinarea prin cultură; examinarea prin colorații imunochimice; tehnica PCR; impregnația argentică.

În caz de agalaxie la bovine, leptospirele pot fi cultivate din lapte, dar această metodă este nepracticată.

*Examinarea leptospirelor în culturi***.** Cel mai bun mediu general de izolare al leptospirelor este mediul semisolid EMJH (0,1-0,2% agar). Poate fi modificat prin adăugarea a 0,4-2% ser proaspăt de iepure.

Se utilizează o metodă de cultură în diluţie. Pentru a evita contami-narea mediului se pot folosi o serie de agenţi selectivi, cum ar fi 5-fluorouracilul, acidul nalidixic, fosfomicina sau un cocteil cu rifampicină, polimixină, neomicină, 5-fluorouracil, bacitracină şi actidionă (W. A. Ellis, 2005).

Se utilizează medii de transport ce conţin 5-fluorouracil la nivele între 200-500 micrograme/mililitru. Culturile trebuie incubate la 29-30°C, timp de cel puţin 12 săptămâni, preferabil 26 de săptămâni şi trebuie examinate prin microscopie pe fond întunecat la fiecare 1-2 săptămâni (W. A. Ellis, 2005).

*Evidenţierea leptospirelor prin metode imunochimice***.** Reprezintă cea mai adecvată metodă de diagnostic. Acestea includ: imunofluorescenţa PAP; reacţia cu avidină-biotină; tehnici imunologice cu aur.

*Diferenţierea leptospirelor patogene de cele nepatogene***.** Spre deosebire de leptospirele nepatogene, cele patogene nu cresc la 11-13°C şi sunt sensibile la azoguanină.

Evidenţierea anticorpilor în serul sangvin se face prin reacţia de aglutinare microscopică. Pentru executarea acestei reacţii avem nevoie de antigen reprezentat de tulpina izolată în cultură pură, de trusa cu seruri de referinţă preparate pe iepuri şi specifice serogrupelor cunoscute, precum şi de o colecţie cu tulpini de referinţă internaţională necesară preparării de seruri hiperimune specifice şi absorbţiei aglutininelor pentru identificarea serovarului..

Pentru identificarea serogrupului se procedează astfel: pe o lamă de microscop se amestecă o picătură din suspensia antigenică cu o picătură din fiecare diluţie a serului de referinţă (pentru economie sunt folosite amestecuri polivalente, reprezentative pentru serogrupe cunoscute). Se incubează 30 de minute într-o cameră umedă la temperatura laboratorului. Se examinează picăturile, fără lamelă, la microscopul cu fond negru. Rezultatele se notează astfel: „-” = toate leptospirele vizibile în câmpul microscopic sunt libere, mobile; „1+” = aproximativ 25% din leptospire aglutinate, restul libere, mobile; „2+” = aproximativ 50% din leptospire aglutinate; „3+” = aproximativ 75% din leptospire aglutinate; „4+” = aproximativ toate leptospirele aglutinate.

Aglutinatele apar sub formă de morulă, stea, fulg de nea, păianjen, fruct de ananas, prezentând, la periferie, capetele mobile ale leptospirelor; când apare leptospiriloza, aglutinatele prezintă pierdere de substanţă.

Pentru identificarea serovarului, se impune prepararea pe iepure a unui ser hiperimun faţă de noua tulpină şi utilizarea uneia sau mai multor tulpini de referinţă ale serovarurilor suspecte împreună cu serovarurile hiperimune corespunzătoare.

Reacţia de aglutinare-liză este o tehnică extrem de folosită în practică fiind utilă numai în cazul animalelor care au depăşit faza septicemică.

Clasificarea leptospirelor patogene după structura antigenică
(după Moga Mânzat R., 2001)

Serogrup	Serovar	Serogrup	Serovar
Australis	australis bratislava fugis hawain jalna lora muenchen	icterohaemorrhagiae	birkini copenagheni dakota icterohaemorrhagiae mankarso mwogolo naam ndahambukuje ndambari smithi tonkini
Autumnalis	alice autumnalis bangkinang bulgarica butembo carlos erinaceiauriti fortbragg mooris rachman weerasinghe	javanica	ceylonica coxi javanica poi sofia sorexjalna
Ballum	ballum castellonis	louisiana	louisiana orleans
Bataviae	bataviae djatzi kobbe paidjan	Mini	georgia mini perameles szwajizak
Canicola	bafani benjamini bindjei broomi canicola jonsis kamituga malaya schueffineri sumneri	Panama	Panama
Celledoni	celledoni whitcombi	Pomona	mozdok pomona tropica
Cynopteri	cynopteri	pyrogenes	Zanoni
Djasiman	djasiman sentot	Ranarum	evansi ronarum
Grippotyphosa	canalzonae grippotyphosa ratnapura valbuzzi vanderhoedeni	sarmin	sarmin waskurin weaveri
Hebdomadis	boricana hebdomadis jules kabura kambale kremastos maru nona worsfoldi	Serjoe	balcanica geyaweera hardjo medanensis nyanza polonica wolffi
Tarassovi	atchafalaya atlantae bakeri bravo kaup kisuba tarassovi vughia		

La nivel subspecific, taxonomia continuă să fie bazată pe serovaruri, definite prin serotipare, dar pentru identificarea lor pot fi utilizate şi metode ca: profilul aglutinării cu anticorpi monoclonali; analiza profilului genelor de restricţie a ARN-ului ribozomal în electroforeza în gel.

Genul Leptospira este caracterizat printr-un raport guanină+citozină (G+C) de 35-41 mol% în ADN-ul cromozomal, în funcţie de specie.

Serovarurile icterohaemorrhagiae şi pomona prezintă doi cromozomi circulari: repliconul mare (4400-4600 kb) şi cel mic (350 kb). Tulpinile de Lps. interrogans conţin două gene ARN ribozomal, respectiv de 23S şi 16S, dar numai o singură genă ARN de 5S.

Leptospirele sunt spirochete fine (0,1-0,15 microni în diametru şi 5-15 microni în lungime), cu 10-30 de spire regulate, strânse, puţin adânci şi cu unul sau ambele capete încârligate.

Mobilitatea le este asigurată printr-un axistil format din doi flageli periplasmici în jurul cărora se înrulează cilindrul periplasmatic.

Mişcarea leptospirelor se realizează prin rotaţie şi translaţie, rezultat al unei mişcări în tirbuşon (sfredelire, foraj) în jurul propriului ax. Aceste mişcări sunt posibile în orice direcţie, leptospirele nefiind diferenţiate polar. Concomitent cu aceste mişcări, leptospirele sunt capabile de flexiune, care se produce cel mai frecvent în partea mijlocie a spirochetei. Datorită mişcărilor de flexiune rezultă spirele secundare şi formele de „S” (fig. 8.5) sau „C” (R. M. Mânzat), deseori observate în preparate micros-copice sau în frotiuri.

Leptospirele sunt necapsulogene, nesporogene, Gram negative.

Examenul morfologic se realizează prin următoarele tehnici:

- examenul între lamă şi lamelă, în câmp întunecat se realizează prin adaptarea la microscopul fotonic a unui condensator cardioid.

Leptospirele apar ca nişte filamente regulat spiralate, luminoase, foarte mobile, ce execută mişcări rapide de rotaţie în jurul axului longitudinal, astfel încât spirele dau impresia de granulaţii fine, iar capetele curbate iau aspect de buton terminal (fig. 8.3). Mişcările sunt extrem de active şi se caracterizează prin flexie, pendulare, deplasare în ambele direcţii ale axului (înşurubare) şi de translaţie, dar cu deplasare redusă în spaţiu.

Datorită fineţii şi mobilităţii foarte mari leptospirele trec prin filtrele care reţin celelalte bacterii şi, probabil, astfel se explică şi penetrabilitatea prin mucoasele şi tegumentele intacte (prin spaţiile intercelulare).

- în frotiuri colorate prin metode speciale se urmăreşte supraîncărcarea leptospirelor cu colorant devenind astfel evidente la microscopul optic obişnuit.

În acest sens, cele mai bune rezultate se obţin prin metodele de impregnare argentică, ca de exemplu: Fontana-Tribondeau (pentru frotiuri) şi metodele Levaditi şi Manouelin (pentru colorarea leptospirelor în secţiuni histologice).

- microscopia electronică, prin care se realizează studiul detaliilor de structură.

Condiţii de cultivare şi caractere culturale. Leptospirele se cultivă pe medii care conţin acizi graşi, formaţi din lanţuri lungi, cu un număr de până la 15 atomi de carbon. În acest sens se obţin rezultate foarte bune, prin adăugarea în mediile de cultură a produsului Tween80 (polioxietilen sorbitan manoleat).

Factorii de creştere necesari multiplicării acestor bacterii, sunt vitaminele B_1 şi B_{12}. Factorii stimulatori ai creşterii sunt serul sangvin şi piruvatul. Albumina din serul bovin este de obicei inclusă ca detoxifiant. Glicerolul le intensifică creşterea, iar amoniacul reprezintă unica sursă de azot a leptospirelor. Aceasta poate fi furnizată sub formă de săruri de amoniu sau prin dezaminarea aminoacidului asparagină de către aspara-ginază, care este prezentă în ser.

Leptospirele sunt microorganisme chemoorganotrofe, care cresc pe medii aerobe sau microaerofile.

Se cultivă în medii lichide (apă peptonată 1% tamponată la pH 7,2, cu 10-40% ser inactivat de iepure, la 28-30 de grade Celsius şi un pH de 7,2-7,6, în condiţii de aerobioză. Ca medii lichide se folosesc: mediul Uhlenhuth, Korthof, Verwoort, Terskih.

Pentru izolarea primară, tulpinile mai pretenţioase au nevoie de agenţi protectori faţă de oxigen, ca superoxiddismutaza şi/sau piruvatul sodic.

La izolarea din organism, se dezvoltă lent, în 10-30 de zile. Prin cultivare, rareori mediul devine uşor opalescent, cel mai adesea păstrân-du-şi aspectul limpede, iar prezenţa leptospirelor se poate pune în evidenţă prin examenul între lamă şi lamelă în câmp întunecat.

Într-o cultură bine dezvoltată, concentraţia leptospirelor pe un mililitru este de 160-400 de milioane (cultura ca atare, este folosită ca antigen în identificările serologice prin testul de microaglutinare-liză).

Leptospirele se pot cultiva şi pe oul embrionat de găină, precum şi în lichidul alantoidian. La fel ca şi micoplasmele, diferă de alte bacterii, prin aceea că dezvoltarea lor în mediile de cultură este inhibată de serul omolog, în absenţa complementului.

Mediile solide (cu adaos de agar 1%) se utilizează în vederea clonării tulpinilor, iar mediile semisolide (cu agar 0,2%) pentru păstrarea tulpinilor bacteriene în colecţii.

*Proprietăţi biochimice***.** Nu se examinează curent în cazul leptospi-relor. Elaborează hemolizine şi diferite enzime ca: oxidaza, catalaza, lipaza, fosfataza, hialuronidaza, coagulaza şi ureaza.

Proprietăţi antigenice. Studiul structurii antigenice a permis împăr-ţirea lor în serogrupe şi serotipuri. Pentru identificarea acestora se aplică reacţia de aglutinare-liză.

Leptospirele posedă cel puţin două structuri de perete, lipopolizaha-ridul (LPS), cu specificitate de gen şi poliozizii cu specificitate de serotip.

Lipopolizaharidul este comun atât leptospirelor patogene, cât şi celor nepatogene.

Poliozizii periferici, cu specificitate de tip, după unii cercetători sunt proteinopolizaharide.

Patogenitate. Sunt bacterii virulente, netoxigene, capabile de sensi-bilizare de tipul endotoxinelor.

Virulenţa se datorează diametrului lor foarte mic, mobilităţii foarte mari, mişcărilor de rotaţie şi înşurubare, capacităţii de a pătrunde printre şi în diferite tipuri de celule (Faine şi Hudson, 1975), prin membrana externă; acest lucru explică pătrunderea prin tegumente şi mucoase intacte cu invadare rapidă în curentul sangvin şi organe, unde pătrund intracelular producând alterări.

Posedă şi activităţi enzimatice, cum ar fi cele fosfolipazice (degragează fosfolipidele legate de lipoproteinele serice, hematii) şi lipolitice (degradează lipoproteinele), butiraze, amidaze, transamidaze, hemolizine (diferite de fosfolipaze).

Endotoxinele sunt prezente atât la tipurile patogene, cât şi la cele saprofite (Seter, 1965) şi corespund antigenului comun lipopolizaharidic; prezenţa LPS explică şi rezistenţa leptospirelor la fagocitoză.

*Ecologie***.** Gazdele naturale ale leptospirelor patogene sunt rozătoarele mici (şobolani, şoareci), care trăiesc în medii umede (mine, tranşee, abatoare, canale, orezării) dar şi bovinele, caii, câinii, pisicile şi mai ales porcii, la care evoluează enzootic.

Leptospirele depăşesc filtrul renal şi odată ajunse în urina filtrată, în tubii contorţi din cortexul renal, persistă şi se înmulţesc luni şi ani, acesta reprezentând adevăratul lor habitat natural; se elimină prin urină (leptospirurie) şi contaminează apa, solul şi alimentele.

Rezistă foarte puţin în urina cu pH acid, cum este cea a carnivorelor şi ceva mai mult în urina omnivorelor şi ierbivorelor. Dacă urina ajunge în diverse ape de suprafaţă (reziduale, bălţi, râuri, lacuri) sau medii umede, acestea ajung surse de infecţie pentru animale şi om.

În cazul omului şi al carnivorelor, sursa de infecţie poate fi reprezentată şi de animalele bolnave (leptospiremice).

Transmiterea infecţiei se realizează mai bine în perioadele calde şi umede ale anului, atunci când contactul animalelor şi al omului cu apele infectate, este mai mare.

Sensibilitatea faţă de factorii de mediu. Leptospirele sunt foarte sensibile la acţiunea agenţilor fizici şi chimici.

Cu excepţia fierului, majoritatea metalelor grele sunt letale.

Dezinfectantele uzuale în concentraţii minime (formolul, clorura de var, cloramina) le distrug în mai puţin de un minut. Cel mai activ este *acidul acetic,* care se utilizează în laboratoarele unde se lucrează cu leptospire, pentru dezinfecţia pipetelor şi a meselor.

Uscăciunea le distruge instantaneu. Nu rezistă nici la temperaturi ridicate, dar nici la temperaturi scăzute; la 50-55 de grade Celsius sunt distruse în 30 de minute, iar la 65 de grade Celsius

în câteva minute. Congelarea le omoară rapid. Pot însă să reziste până la 142 de zile la temperaturi cuprinse între 11 şi 14 grade Celsius, în culturi sau în apă curată cu pH 7,3.

Pot tolera însă temperaturi foarte scăzute în medii bogate în proteine. Culturile de leptospire pot fi depozitate pe durată lungă prin crioprezervare la -7°C, până la -140°C. La pH acid (6,8) sunt distruse, dar rezistă într-un mediu alcalin (pH 7,8-7,9).

În apele reziduale, leptospirele patogene nu supraviețuiesc mai mult de 24-48 de ore iar în apele naturale (râuri, lacuri, fântâni), în solul umed (nămol, mlaştini) şi la întuneric rezistă până la 3 luni, în ţesuturile anima-lelor vii sau moarte (în rinichi, leptospirele au supraviețuit 21 zile, la 4°C).

Sunt sensibile aproape faţă de toate antibioticele, în mod deosebit faţă de penicilină, streptomicină şi tetraciclină dar nu şi faţă de sulfamide.

Serotipurile de leptospire identificate şi afecţiunea produsă
(după Carp-Cărare M., 1997)

Serotipul	**Gazda principală**	**Lipază**	**Hemoliză**	**Sindromul sau boala produsă**
Lps. icterohaemorrhagie	şobolan	+	-	Sindromul Weil la om Hepatită
Lps. tarassovi (Lps. hyos)	suine	-	-	Avorturi la scroafe
Lps. Pomona	suine	+	+	Avorturi la scroafe Urinare cu sânge la bovine
Lps. grrippotyphosa	şobolanul de câmp	+	+	Avorturi la bovine
Lps. Sejroe	şoareci	-	-	Avorturi la bovine
Lps. Canicola	câine	+	+	Hepatită la câine (uremie)

Serovaruri de leptospire patogene pentru porc

Serovarul de *Leptospira*	**Gazde principale**	**Gazde accidentale**
Pomona	porcul, unele specii de şoareci	taurinele, ovinele, cabalinele, cani-dele, şobolanii, şoarecii
tarassovi	Porcul	taurinele, cabalinele, marsupialele, unele rozătoare

Câinele este gazdă naturală pentru *Lps. canicola*, şobolanul pentru *Lps. icterohaemorrhagiae*, iar diverse specii de şoareci sunt gazde naturale pentru *Lps. grippotyphosa, Lps. hebdomadis, Lps. icterohaemorrhagiae*, etc.

Animalele infectate rămân purtătoare de leptospire în rinichi (tubii contorţi) şi eliminatoare prin urină un timp destul de lung care depinde de specia de animal infectat şi de tipul de leptospire infectante. Astfel, rozătoarele pot rămâne purtătoare toată viaţa, câinele până la 700 de zile, suinele şi taurinele timp de 6 luni.

Animalele bolnave elimină leptospire timp de câteva zile prin diverse secreţii şi excreţii, iar după trecerea prin boală numai prin urină, contaminând mediul ambiant.

În ţara noastră au fost izolate până în prezent de la animale serovarurile: pomona (suine, bovine, cabaline, ovine), tarassovi (suine, bovine), canicola (canide, suine), icterohaemorrhagiae (suine, canide), serjoë (cabaline). Prin reacţia de aglutinare-liză, au fost identificate şi infecţii cu serotipurile: bataviae, grippotyphosa, hebdomadis, ballum, autumnalis şi australis.

Au fost izolate şi 33 de tulpini de *Lps. pomona* şi 3 tulpini de *Lps. tarassovi*, direct din ape de suprafaţă, iar serologic au fost puşi în evidenţă anticorpi, la mai multe specii de animale sălbatice, ca: mistreţul, ariciul, vulpea, diverse specii de şoareci de câmp, păsări sălbatice sau animale inferioare, cum sunt reptilele şi batracienii.

Materiale si metode de identificare a genului Pasteurella

Sunt necesare: Tampoane naso-faringeale sau 0,5 ml sânge integral **recoltat** pe EDTA, Când există riscul livrării cu întârziere în sau în timpul perioadelor foarte calde, toate tipurile de probe livrate se refrigerează înainte de livrare şi se transportă în pachete reci. Se recomandă ca probele congelate să fie transportate în aşa fel încât să rămână congelate în timpul transportului.

Transportul probelor lichide. Se colectează probe proaspete de sânge în EDTA (dop purpuriu) sau ACD (dop galben), se închide etanş tubul şi se răstoarnă imediat de mai multe ori pentru a asigura buna omogenizare a sângelui cu compusul deja existent în tub.Alte probe de lichide (lavaj, lichid cerebrospinal, fecale lichide) se colectează în tuburi simple sau alte containere similare, etanşe.

Probele de lichid se trimit în aceeaşi zi sau peste noapte. Probele se refrigerează dacă livrarea va fi întârziată mai mult de câteva ore. Transportul la temperatura camerei este indicat numai dacă probele vor fi în tranzit o durată de până la ~24 ore sau dacă deplasarea nu se face pe vreme foarte caldă – în aceste cazuri este indicată livrarea probelor cu pachete reci (nu gheaţă uscată) într-un container termoizolant.

Probele nelichide: Swab-urile, probele de ţesut, probele de fecale solide şi alte probe nelichide se introduc în containere individuale, curate, etanşe, sigilate fără mediu de transport cum ar fi tuburile simple sau pungile tip ziplock. Se livrează la temperatura camerei în aceeaşi zi. Dacă ţesuturile trebuie ţinute mai mult de câteva ore înainte de a fi livrate acestea se refrigerează şi se livrează în câteva zile cu pachete reci. Swab-urile pot fi livrate la temperatura camerei dacă se consideră că timpul necesar deplasării de la destinaţie la laborator este mai mic de ~3-4 zile.

Dacă se livrează probele de ţesut congelate acestea se transportă în zăpadă carbonică în container termoizolat astfel încât să rămână congelate până la momentul recepţionării în laborator.

Etichetarea probelor: Este preferată utilizarea tuburilor de transport deja etichetate, pe care se marchează suficiente date pentru a fi posibilă identificarea animalului şi proprietarului animalului.

Ambalarea: Se închid toate containerele primare de stocare ale probelor (tuburi, pungi, etc.) într-o altă pungă etanşă tip ziplock sau alt tip de container care se închide etanş. Se protejează fiecare tub de sticlă de contactul cu oricare altul şi se împachetează astfel încât să se evite spargerea lor în timpul transportului. Se introduce o cantitate suficientă de material absorbant în interiorul celei de a doua pungi sau container astfel încât să fie posibilă absorbţia întregului volum de probă din punga respectivă în cazul unor accidente foarte grave.

Se utilizează granule de polistiren expandat dacă se doreşte prevenirea deplasării conţinutului. Se etichetează cutia de carton exterioară cu date suficient de clare pentru a permite livrarea corectă a probelor.

Morfologie. Cuprinde germeni polimorfi de formă cocoidă sau cocobacilară cu dimensiuni mici (1-2/0,3-1 microni), dispuşi în frotiuri de regulă izolat, uneori diplo şi rar în lanţuri (fig. 6.1). Sunt necilogeni, nesporogeni, Gram negativi. Majoritatea tulpinilor posedă la exterior o microcapsulă (glicocalix), de natură poliglucidică cu specificitatea antigenică, prezenţa ei fiind corelată cu tipul cultural.Prezintă bipolaritate accentuată caracteristică, mai ales în frotiurile efectuate prin colorația Giemsa sau cu albastru de metilen din organele cadavrelor de păsări cu holeră.

Condiţii de cultivare şi caractere culturale. *Pas. multocida* se dezvoltă pe medii uzuale cu pH 7,8, în aerobioză, la 37 grade Celsius, dar sunt facultativ anaerobe.

Pentru izolarea tulpinilor de origine bovină se folosesc medii cu ser, sânge sau glucoză. Pe agarul Mac Conkey, pasteurelele, în general, nu se pot cultiva, ceea ce constituie un criteriu diferenţial faţă de genul Actinobacillus.

În bulion produce turbiditate moderată şi uniformă. În cazul culturilor vechi poate apărea o peliculă groasă, iar treptat se constituie un depozit aderent, care la agitare se ridică răsucindu-se spre suprafaţă în jurul axului, sub formă caracteristică de fuior (tirbuşon).

Pe suprafaţa agarului înclinat formează colonii mici (0,5-1 milimetri) sau mijlocii (1-3 milimetri), semitransparente, rotunde, convexe, netede, cenuşii-gălbui. După cinci zile de incubare la 37 de grade Celsius ajung la circa şase milimetri şi apar cu inele concentrice sau striaţii fine, centrul se brunifică, se opacifiază, devenind fin, granular în timp ce la periferie rămân cenuşii gălbui, strălucitoare, omogene. Coloniile de *Pas. multocida* se diferenţiază în trei tipuri culturale: *netede*, ale tulpinilor virulente pentru iepuri; *rugoase*, ale tulpinilor avirulente şi *mucoide* ale tulpinilor cu virulenţă intermediară.

Dacă sunt examinate în lumină oblică pot fi iridescente şi neiridescente. Atât tipul cultural cât şi iridescenţa constituie criterii de diferenţiere a biotipurilor.

Biotipuri de Pas. multocida

Biotipul	**Gazdele şi infecţiile cele mai frecvente**	**Decapsularea cu hialuronidază**	**Aglutinarea cu acriflavină**	**Colonii irizate**	**Manitol**	**Sorbitol**	**Glicerol**	**Patogenitatea experimentală pentru şoarece**	**Seroprotecţie cu ser B sau E**	**Aspectul coloniilor**
Mucoid	păsări (holeră aviară; infecţii diverse la taurine, ovine, suine)	+	-	+	+	V	V	patogen	+	mari, mucoide
Septicemie hemoragică	taurine şi bubaline (septicemie hemoragică)	-	-	+	+	V	V	patogen	speci-ficitate de tip	mijlocii
Porcin	suine, mai rar, taurine şi alte specii	-	+	+	+	V	V	patogen	-	mijlocii
Felin	pisică (cavitatea bucală şi faringiană)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	patogen	0	mici
Canin	câine (cavitatea bucală şi faringiană)	-	-	-	-	-	(-)	Nepatogen	0	mici

Legendă: *V = variabil; ( ) = comportamentul majorităţii tulpinilor; 0 = comportare neivenstigată.*

Proprietăţi biochimice. Majoritatea tulpinilor produc indol, hidrogen sulfurat, amoniac, catalază, oxidază şi ornitindecarboxilază, dar nu produc urează, lizindecarboxilază, glutamatdecarboxilază şi arginindihidrolază. Nu produc hemolizine şi nu se dezvoltă pe agarul Mac Conkey. Activitatea glucidolitică este corelată cu tipul antigenic şi originea tulpinii; majoritatea tulpinilor fermentează glucoza, zaharoza, manoza şi manitolul (fără producţie de gaz) şi nu fermentează lactoza, trehaloza, ramnoza, rafinoza, salicina, dextrina şi inozitolul.

Principalele caracteristici biochimice ale speciilor genului Pasteurella(după Bergey's Manual, 1994)

Specia	**Caracterul**							**Fermentează**		
	Cata-lază	**Oxidază**	**Red. nitratul**	**H_2S**	**Indol**	**Urează**	**Hemo-liză**	**Glucoza**	**Lactoza**	**Manitolul**
Pas. acrogenes	+	D	+	+	-	+	-	+	-	d
Pas. anatis	+	+	+	N	-	-	-	+	+	+
Pas. avium	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Pas. bettyae	d	-	+	N	-	-	-	+	-	-
Pas. caballi	-	+	+	N	-	-	-	+	+	+
Pas. canis	+	+	+	N	-	-	-	+	-	-
Pas. dagmatis	+	+	+	N	-	+	-	+	-	-
Pas. gallinarum	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Pas. granulomatis	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Pas. haemolytica	+	+	+	N	-	-	+	+	d	+
Pas. langaa	-	+	+	N	-	-	-	+	+	+
Pas. lymphangitis	+	+	-	N	-	+	-	+	-	+
Pas. mairii	+	+	+	N	-	+	d	+	-	+
Pas. multocida	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Pas. pneumotropica	+	+	+	+	+	+	-	+	d	-
Pas. stomatis	+	+	+	N	+	-	-	+	-	-
Pas. testudinis	+	+	+	-	+	-	+	+	-	d
Pas. trehalosi	-	+	+	N	-	-	+	+	-	+
Pas. volantium	+	+	+	N	-	-	-	+	d	+

Legendă: *N = netestat; d = reacţii diferite.*

Caracterele biochimice ale subspeciilor de P. multocida

Test	***Pas. multocida* subsp. *Gallicida***	***Pas. multocida* subsp. *multocida***	***Pas. multocida* subsp. *septica***
Catalaza	+	+	+
Oxidaza	+	+	+
Fosfataza	+	+	+
H_2S	+	+	+
Indol	+	+	(+)
Hemolizine	-	-	-
Fermentează: - glucoza - lactoza - maltoza	 + - -	 + - -	 + - (-)
Manitol	+	+	(+)
Salicină	-	-	-
Sorbitol	+	-	+
Xiloză	+	+	reacţii diferite

Diferenţierea speciilor din genul Pasteurella pe baza activităţii biochimice (adaptare după Quinn şi col., 1994)

Caracterul	**Pas. multocida**	**Pas. hae-molytica**	**Pas pneumo-tropica**	**Pas. gallina-rum**	**Pas. aerogenes**	**Pas. ureae**	**Pas. anati-pestifer**
Hemoliza	-	+	-	-	-	-	-
Mac Conkey	-	+	-	-	+	-	-
Urează	-	-	+	-	+	+	-
Indol	+	-	+	-	+	+	-
Manitol acid	+	+	-	-	-	+	-
Glucoză-gaz	-	-	-	-	+	-	-
Hidroliza gelatinei	-	-	-	-	-	-	+
Catalază	+	+	+	+	+	+	+
Peroxidază	+	+	+	+	+	+	+
Ornitin decarboxilază	+	-	+	+	+	+	+

Proprietăţi antigenice. *Pas. multocida* prezintă fenomenul de pluralitate antigenică. Pe baza studiului structurii antigenice capsulare (K) polizaharidice, Carter a împărţit pasteurelele în patru grupe serologice notate cu A, B, T, E, cărora li s-a adăugat, mai recent, grupul F.

Prin imunoelectroforeză, Prince şi Smith (1966), (citaţi de Carter, 1984), au identificat trei feluri de antigene: antigenul beta: o poliglucidă cu specificitate de tip, care este prezentă la variantele iridescente şi mucoide; complexul alfa: probabil poliglucid proteic, foarte aderent de peretele celular; antigenul gamma: lipopoliglucidic, prezent în celulele tuturor variantelor. Namioka şi Murata (1962) au identificat 11 tipuri antigenice, notate cu cifre arabe, de la 1 la 11. În prezent se acceptă o clasificare, ce ţine cont de ambele criterii, cuprinzând cel puţin 15 serotipuri, notate cu ambele simboluri. Serotipurile se notează cu formula: grup somatic O: tip capsular K, de exemplu: 1:A, 3:A, etc. Pisica este un mare purtător al acestei specii, pe care o elimină prin salivă (90-98% din pisici sunt purtătoare).

Serotipuri de Pas. multocida pe baza structurii antigenice

Antigenul	Grup somatic O	Serotipul
A	1	1:A
	3	3:A
	5	5:A
	7	7:A
	8	8:A
	9	9:A
B	6	6:B
	11	11:B
D	1	1:D
	2	2:D
	3	3:D
	4	4:D
	10	10:D
E	6	6:E

*Comportarea faţă de factorii de mediu***.** Pasteurelele au o rezistenţă scăzută la acţiunea factorilor fizici şi chimici. Sunt distruse în 15 minute la 60 de grade Celsius şi în 2-3 zile de acţiunea razelor solare. Rezistă în materii fecale 6-10 zile, în apele de suprafaţă, sol sau cadavre câteva săptămâni, iar pe coaja ouălor 6-34 de zile. Sunt distruse în câteva minute de soda caustică 1%, formol 1%, fenol şi lapte de var 5%.

Sunt sensibile faţă de sulfamide şi antibiotice (streptomicină, neomicină, tetraciclină, penicilină, cloramfenicol, eritromicină) dar în urma tratamentelor prelungite se selecţionează tulpini rezistente (factor episomal), faţă de antibioticele sau sulfamidele folosite.

*Patogenitate***.** Pasteurelele îşi exercită patogenitatea prin virulenţă şi toxicitate. Acţionează mai ales prin endotoxine de tip lipopoliglucidic sau nucleoproteic, care determină modificarea distribuţiei leucocitelor în arborele sangvin cu leucopenie periferică, corelată cu concentrarea acestora în capilarele pulmonare şi apariţia leziunilor de bronhopneumonie caracteristice.

Pasteurelele acţionează şi prin creşterea permeabilităţii vasculare, concretizată prin infiltraţii serofibrinoase cu caracter edematos, respectiv edeme şi exsudate în cavităţi.

La animalele mai rezistente produc infecţii localizate, sub formă de inflamaţii de tip fibrinos sau fibrinonecrotic.

REZULTATE SI DISCUTII:

Demonstrarea prezenţei leptospirelor în sângele câinilor care exprimă semne clinice caracteristice leptospirozei acute se consideră că are valoare diagnostică. Totuşi, izolarea din sânge nu are adesea succes deoarece bacteriemia este tranzitorie şi nu este constant asociată semnelor clinice. Câinii sunt adesea trataţi cu antibiotice înainte de prelevarea probelor şi aceasta reduce substanţial şansele identificării agentului în sânge.

Demonstrarea evoluţiei unei infecţii generalizate, prin prelevarea necropsică de porţiuni din organe relevante este de asemenea considerată cu valoare de diagnostic. Totuşi, dacă animalul supravieţuieşte suficient de mult sau dacă a fost tratat cu antibiotice, ar putea fi dificilă detectarea în organe a leptospirelor intacte; în acest caz de un real ajutor este tehnica imunohistochimiei care identifică reziduurile antigenice leptospirice.

Demonstrarea prezenţei antigenelor leptospirice în tractul genital, rinichi sau urină se interpretează în corelaţie cu tabloul clinico-lezional exprimat întrucât rezultatele serologice poate cel mult să indice că animalul a fost purtător.

Rezultate negative obţinute la analiza leptospirică a urinei nu exclude statutul de purtător cronic renal. Rezultatele negative indică cel mult că animalul nu excretă o cantitate decelabilă de leptospire la momentul testării. Colectarea urinei după tratamentul animalului cu un diuretic va creşte şansele detectării leptospirelor [Nervig RM şi Garrett LA, 1979]. În cazurile mai speciale ce implică animale individuale, teste negative obţinute la trei testări săptămânale consecutive pot fi considerate dovezi irefutabile că un animal nu elimină leptospire în urină.

Demonstrarea prezenţei leptospirelor în lichidele organismului sau organele interne (uzual în rinichi, ficat, pulmon, creier sau glandele suprarenale) la avortoni sau fetuşii născuţi morţi se consideră a fi cu valoare diagnostică pentru leptospiroza cronică la cățea şi este o dovadă a infecției active a fetusului.

Izolarea leptospirelor este cea mai sensibilă metodă de demonstrare a prezenţei lor, în situația în care sunt absente reziduurile de antibiotice, autoliza tisulară nu este avansată, iar țesuturile sunt procesate în vederea cultivării leptospirelor rapid după prelevare şi - în cazul urinei – la un pH corespunzător. Dacă țesuturile sau fluidele nu pot fi transportate prompt la laboratorul pentru cultivarea leptospirelor, probele se păstrează la 4°C pentru a preveni dezvoltarea altor bacterii şi autoliza probei de țesut.

Ca mediu de transport se utilizează mediul lichid sau soluția de 1% albumină serică bovină (BSA) ce conține 100-200µg/ml de 5-fluorouracil.

Mediile de cultură sunt semisolide (agar 0,1-0,2%) şi pot conține BSA şi orice Tween 80 (ex.: mediu Tween 80/BSA sau EMJH) [Hookey JV, 1992] sau BSA şi un amestec de Tween80 şi Tween 40 [Ellis WA, 1986]. Pentru a preveni contaminarea se adaugă anumiți agenți selectivi cum ar fi: 5-fluorouracil [Johnson RC şi Rogers P, 1964], acid nalidixic [Johnson RC şi Seiter CW, 1977], fosfomicin [Oie S şi col., 1986], şi un amestec de rifampicin, polimixină, neomicină, 5-fluorouracil, bacitracină, şi actidionă [Adler B şi col., 1986]. Totuşi, utilizarea agenților selectivi poate duce la reducerea şanselor de izolare a leptopsirelor, mai ales când în probă se găseşte un număr redus de leptospire viabile, iar multe tulpini de leptospire nu cresc în mediile selective ce conțin numeroase antibiotice. Adăugarea a 0,4-1% ser de iepure la mediul de cultură semisolid creşte şansele izolării unor serovaruri leptospirice pretențioase.

Culturile se incubează la 29 +/- 1°C pentru cel puțin 16 săptămâni şi preferabil pentru 26 săptămâni [Ellis WA, 1986]. Timpul necesar pentru detectarea culturilor pozitive variază cu serovarul leptospiric şi numărul organismelor prezente în probe. Serovarurile mai puțin pretențioase (ex. L. pomona şi L. grippotyphosa) pot furniza rezultate pozitive în mai puțin de 7-10 zile după inoculare; alte serovaruri (ex: L. hardjo şi L. bratislava) pot necesita un timp mult mai mare. Culturile se examinează prin microscopie cu câmp întunecat la fiecare 1-2 săptămâni. Este important să se folosească o sursă de lumină de 100 watt şi un microscop cu câmp întunecat de calitate foarte bună.

Prezența leptospirelor poate fi de asemenea demonstrată printr-o varietate de tehnici de colorare imunochimice, ex. imunofluorescență [Bolin CA şi col, 1989; Ellis WA şi col, 1982], şi variate tehnici imunohistochimie [Barnett JK şi col, 1999; Ellis TM şi col., 1983; Scanziani EM 1991; Zaki SR şi Shieh WJ,1986]. Acestea sunt utile în diagnosticarea infecțiilor din materialul patologic care nu mai este utilizabil în cultivare sau când se solicită un diagnostic rapid. Deoarece succesul acestor tehnici este dependent de numărul organismelor prezente, acestea nu sunt recomandate în identificarea purtătorilor cronici, la care numărul organismelor poate fi foarte redus sau acestea pot fi localizate într-un singur țesut. Leptospirele nu se colorează satisfăcător cu coloranți anilinici şi tehnica colorației argentice are sensibilitate şi specificitate redusă, deşi acestea sunt tehnici auxiliare de ajutor pentru diagnosticul histopatologic [Baskerville A, 1986].

Tehnicile PCR sunt la acest moment utilizate în unele laboratoare de diagnostic şi în majoritatea laboratoarelor de referință. Prin această tehnică este posibilă detectarea leptospirelor atât în țesuturi cât şi în lichide. Numeroase seturi de primeri PCR au fost deja descrişi [Alt DP şi col., 2001;Barocchi MA şi col, 2001;Gerritsen MJ şi col, 1991; Gravekamp C şi col, 1993; Hookey JV, 1992; Kawabata H şi col, 2001; Merien F şi col, 1992; Smythe LD şi col, 2002; Truccolo J şi col, 2002; van Eys GJ şi col, 1989; Woodward MJ şi col, 1991], o serie dintre ei oferă specificitatea de gen iar alții specificitatea de serovar. Tehnica PCR poate fi foarte sensibilă, dar lipsa specificității (rezultate fals pozitive) poate constitui o problemă. Controlul calității tehnicilor PCR utilizate la diagnosticul leptospirozei solicită atenție deosebită în design-ul laboratorului şi modului de lucru pentru a preveni contaminarea reagenților şi utilizarea probelor de control corespunzătoare [Dragon EA şi col, 1993;McCreedy BJ şi Callawayth H., 1993]. În plus, procesarea probelor în PCR este un alt punct critic şi trebuie corelată cu țesutul, lichidul şi speciile ce urmează a fi testate. O procedură pentru prepararea probelor de urină destinate PCR utilizând baghete magnetice căptuşite cu anticorpi anti-

leptospirici reprezintă o perspectivă în identificarea detecţiei leptospirelor patogene în urină [Taylor MJ şi col, 1997].

Identificarea izolatelor leptospirice este posibilă numai în laboratoarele specializate, iar identificarea completă presupune utilizarea combinată a mai multor proceduri cu scopul stabilirii speciei de *Leptospira* căreia îi aparţine izolatul, serogrupului, serovarului şi patogenităţii. O cultură leptospirică pură este identificată ca aparţinând unei specii patogene sau saprofite printr-o varietate de teste: abilitatea de a infecta animalele; rezistenţa relativă la 8-azaguanină; activitatea lipazei; toleranţa la sare şi temperatură [Johnson RC şi Faine S, 1984; Johnson RC şi Harris VG, 1967]; amplificarea PCR a secvenţei ADNr 23S [Woo TH şi col, 1997]; şi conţinutul în G+C al ADN-ului [Johnson RC şi Faine S, 1984].

Speciile aparţinând genului *Leptospira* pot fi diferenţiate la nivel de serogrup prin reacţia de aglutinare încrucişată [Dikken H şi Kmety E, 1978]. Diferenţierea ulterioară la nivel de serovar este efectuată clasic prin absorbţie aglutinare încrucişată (cross-agglutination absorption) deşi pentru multe izolate aceasta este la acest moment înlocuită cu metode care consumă mai puţin timp: factor analysis [23], anticorpi monoclonali (MAbs) [Terpstra WJ şi col, 1987, 1985], analiza endonucleazelor de restricţie [Herrmann JL şi bol, 1992; Marshall RB şi col, 1981; Thiermann AB şi col, 1986, 1985] şi diferite tehnici PCR [Brown PD şi Levett PN, 1997; De Caballero OL şi col, 1994; Gerritsen MA şi col, 1995; Perolat P şi col, 1994; Ralph D şi col, 1995; Ramadass P şi col, 1997; Savio ML şi col, 1994; Zuerner RL şi col, 1995, 1997].

Microorganismele aparţinând familiei *Pasteurellaceae* sunt germeni ubicvitar prezenţi la nivel respirator, digestiv şi genital la diferite specii de păsări, mamifere, reptile şi probabil la amfibieni [Shewen and Rice Conlon, 1993; Rycroft and Garside, 2000; Christensen *et al.*, 2003b; 2004b]. Membrii acestei familii sunt mici (0.2-2µm), imobili, gram-negativi şi bipolari, bacilii putând fi uşor identificaţi în numeroase leziuni produse prin muşcătura de câine sau pisică. Aceste microorganisme populează uzual regiunile nazală, gingivală, tonsilară, la mulţi câini şi pisici la fel ca la multe alte specii de animale.

Pasteurelele secretă o endotoxină care modifică proprietăţile surfactantului pulmonar, şi prin aceasta recuperarea poate fi lentă şi pot fi dezvoltate abcese şi pleurită.

Tradiţional, diagnosticul infecţiei cu Pasteurella s-a bazat pe semnele clinice, cultivare şi/sau testare serologică. Deşi metoda identificării prin cultivare asigură certitudinea prezenţei acestora, aceasta consumă timp şi bani. Frecvent sunt obţinute rezultate fals negative la examenul bacteriologic datorită faptului că ***P**. multocida* este distrusă relativ uşor în timpul transportului către laboratorul de microbiologie sau este eliminată din mediul de cultură de către germenii bacterieni de suprainfecţie (flora nazală sau contaminanţi). Testele serologice au fost utilizate când infecţia a fost suspectată în organe din care nu a fost posibilă investigaţia bacteriologică sau când culturile nu au oferit rezultate elocvente. Totuşi, un test serologic pozitiv la *P. multocida* poate indica atât infecţia curentă cât şi expunerea anterioară a organismului la microorganism. Deoarece multe animale au fost expuse la acest microorganism, un diagnostic curent pentru pasteureloză nu se poate baza doar pe rezultatele testelor serologice. Detecţia moleculară prin PCR reprezintă o metodă mult mai sensibilă, specifică şi rapidă de detecţie a ***Pasteurella*** şi confirmă infecţia (Miflin and Blackall, 2001).

CONCLUZII

1. Metodologia de identificare aleasă este dependentă de obiectivul testării Calitatea rezultatului de laborator este dependentă de calitatea protocolului de recoltare.
2. Biodiversitatea speciilor de Leptospira si Pasteurella diferă de la o clasificare la alta, important este să putem identifica în special tulpinile cu patogenitate crescuta pentru a putea aplica schemele terapeutice cele mai adecvate.
3. Pentru a creste şansele izolării leptospirelor este indicată colectarea lor în medii de transport speciale.
4. Tehnicile PCR sunt la acest moment utilizate în laboratoarele de diagnostic şi în majoritatea laboratoarelor de referinţă. Prin această tehnică este posibilă detectarea leptospirelor atât în ţesuturi cât şi în lichide. Numeroase seturi de primeri PCR au fost deja descrişi , o serie dintre ei

oferă specificitatea de gen iar alţii specificitatea de serovar. Tehnica PCR poate fi foarte sensibilă, dar lipsa specificităţii (rezultate fals pozitive) poate constitui o problemă.

5. În ţara noastră au fost izolate până în prezent de la animale serovarurile: pomona (suine, bovine, cabaline, ovine), tarassovi (suine, bovine), canicola (canide, suine), icterohaemorrhagiae (suine, canide), serjoë (cabaline). Prin reacţia de aglutinare-liză, au fost identificate şi infecţii cu serotipurile: bataviae, grippotyphosa, hebdomadis, ballum, autumnalis şi australis. Au fost izolate şi 33 de tulpini de *Lps. pomona* şi 3 tulpini de *Lps. tarassovi*, direct din ape de suprafaţă, iar serologic au fost puşi în evidenţă anticorpi, la mai multe specii de animale sălbatice, ca: mistreţul, ariciul, vulpea, diverse specii de şoareci de câmp, păsări sălbatice sau animale inferioare, cum sunt reptilele şi batracienii.
6. În prezent genul Pasteurella cuprinde 22 specii (Bergey's Manual, 2004) (tabelul 6.1): *Pas. multocida,* cu trei subspecii: *gallicida, multocida şi septica; Pas. trehalosi*, unul dintre agenţii etiologici ai febrei de transport, care include toate biotipurile T ale fostei Pas. haemolytica (T_3, T_4, T_{10}, T_{15}); *Pas. aerogenes*, *Pas. anatis, Pas. avium (vechea denumire: Haemophilus avium), Pas. bettyae, Pas. canis, Pas. dogmatis, Pas. gallinarum, Pas. langaaensis, Pas. mairii, Pas. pneumotropica, Pas. salmonicida, Pas. stomatis, Pas. estudinis, Pas. trehalosi* şi *Pas. volantium*, izolate din infecţii locale sau comensale ale căilor respiratorii.

BIBLIOGRAFIE:

1. American Academy of Pediatrics: Bite Wounds. In: Red Book 2000 - Report of the Committee on Infectious Diseases. 25th ed. Oak Grove, Ill: American Academy of Pediatrics; 2000: 156-9.
2. Champlin FR, Shryock TR, Patterson CE, et al: Prevalence of a novel capsule-associated lipoprotein among pasteurellaceae pathogenic in animals. Curr Microbiol 2002 Apr; 44(4): 297-301.
3. Goldstein EJ, Citron DM: Comparative activities of cefuroxime, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin, enoxacin, and ofloxacin against aerobic and anaerobic bacteria isolated from bite wounds. Antimicrob Agents Chemother 1988 Aug;
4. Goldstein EJ, Citron DM, Richwald GA: Lack of in vitro efficacy of oral forms of certain cephalosporins, erythromycin, and oxacillin against Pasteurella multocida. Antimicrob Agents Chemother 1988 Feb; 32(2): 213-5.
5. Green BT, Ramsey KM, Nolan PE: Pasteurella multocida meningitis: case report and review of the last 11 y. Scand J Infect Dis 2002; 34(3): 213-7.
6. Kravetz JD, Federman DG: Cat-associated zoonoses. Arch Intern Med 2002 Sep 23; 162(17): 1945-52.
7. Layton CT: Pasteurella multocida meningitis and septic arthritis secondary to a cat bite. J Emerg Med 1999 May-Jun; 17(3): 445-8.
8. Levett, P. N.. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev. 14*:*296*.[Abstract/Free Full Text]
9. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone; 2000 2404-7.
10. Petros, S., U. Leonhardt, L. Engelmann. 2000. Serum procalcitonin and proinflammatory cytokines in a patient with acute severe leptospirosis. *Scand. J. Infect. Dis. 32*:*104*.[Medline]
11. Wade T, Booy R, Teare EL, Kroll S: Pasteurella multocida meningitis in infancy - (a lick may be as bad as a bite). Eur J Pediatr 1999 Nov; 158(11).
12. Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, Hooper DC: Pasteurella multocida infections. Report of 34 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 1984 May; 63(3): 133-54.
13. World Health Organization. 2005. Leptospirosis worldwide, 2005. *Wkly. Epidemiol. Rec. 74*:*237*.[Medline]

BIODIVERSITATEA PRINCIPALELOR GENURI DE DROJDII ŞI MUCEGAIURI DIN ALIMENTE

THE BIODIVERSITY OF THE MAIN MOLDS AND YEASTS IN FOODS

IVANA Simona[1], CAPLAN Dana Magdalena[2], BOGDAN A.T.[3]., POPESCU A.N.[4], IONIŢĂ L.[1]., IPATE Iudith[5]
[1]FMV, Bucureşti
[2]INCDMI Cantacuzino,
[3]Academia Romană,
[4]IDSA, Bucureşti
[5]Centrul de Biodiversitate Agrosilvică „Acad. David Davidescu”

Drojdiile şi mucegaiurile sunt microorganisme foarte răspândite în natură. Prezenţa lor în număr mare în produsele alimentare indică nerespectarea regulilor de igienă în timpul procesului de obţinere şi de depozitare al acestora. De asemenea, aceste microorganisme pot provoca modificarea însuşirilor organoleptice ale produselor alimentare, afectându-le totodată şi capacitatea de conservare. Unele dintre ele elaborează micotoxine, care afectează grav sănătatea consumatorilor.

Mucegaiurile sunt fungi filamentoşi care cresc sub forma unei mase încolăcite şi se răspândesc rapid putând acoperi o suprafaţă de mai mulţi centimetri în 2-3 zile. Masa totală este denumită miceliu. Un miceliu este format din ramuri sau filamente denumite hife. Cele mai importante se înmulţesc prin ascospori, zigospori sau conidii. Ascosporii unor genuri sunt importanţi pentru gradele lor extreme de termorezistenţă. Un grup formează picnidii sau acervuli (celule mici în formă de flacon, iar corpii de fructificare sunt conidiofori). Artrosporii rezultă din fragmentarea hifelor din unele grupe.

În anii 1980 nu s-au produs modificări radicale in sistematica fungilor alimentari. Cele mai importante observaţii se refera la descoperirea înmulţirii sexuate sau perfecte a câtorva specii şi genuri binecunoscute.

În această privinţă starea de ascomicet este considerată de micologi ca fiind starea reproductivă cea mai importantă a unor fungi, starea denumită teleomorfă. Numele de specie dat unei ciuperci teleomorfe are prioritate faţă de aceea de anamorfă (denumirea dată stării imperfecte sau conidiale). Termenul de holomorfă arată că ambele stadii sunt cunoscute, dar se foloseşte denumirea de teleomorfă.

Poziţiile taxonomice ale genurilor descrise sunt rezumate mai jos:

Diviziunea: Zygomycota
Clasa: Zygomycetes (micelii aseptate, reproducere prin sporoangiospori, creştere rapidă).
Ordin: Mucorales
Familia: Mucoraceae
Gen: Mucor
Rhizopus
Thamnidium
Diviziunea: Ascomycota
Clasa: Plectomycetes (miceliu septat, ascospori producători de asce în număr de 8).
Ordin: Eurotiales
Familia: Trichocomaceae
Gen: Byssochlamys
Emericella
Eupenicillium
Eurotium
Diviziunea: Deuteromycota (fungi imperfecţi, anamorfi, stadiile perfecte nu sunt cunoscute).
Clasa: Coelomycetes
Genul: Colletotrichum
Clasa: Hypomycetes (hife producatoare de conidii).

Ordinul: Hyphomycetales
Familia: Moniliaceae
Genul: Alternaria
Aspergillus
Aureobasidium (Pullularia)
Botrytis
Clodosporium
Fusarium
Geotrichum
Helminthosporium
Monilia/Sclerotinium
Penicillium
Stachybotrys
Trichothecium

Mai jos sunt prezentate câteva genuri implicate în microbiologia alimentelor, în ordine alfabetică:

1. Alternaria. Produc micelii septate cu conidiofori şi conidii cafenii mari. Conidiile au atât septuri transversale cât şi longitudinale prezentând forme variate. Ele produc putregaiul fructelor cu sâmburi, al merelor şi smochinelor. Putregaiul negru al citricelor este provocat, de asemenea, de specii sau tulpini ale acestui gen.

Acesta este un fung de câmp care creşte pe grâu. Se poate găsi şi pe cărnurile roşii. Unele specii produc micotoxine.

2. Aspergillus. Produce lanţuri de conidii – în cazul în care se dezvoltă cleistoteci* cu ascospori stadiul perfect al celor găsiţi în alimente este Emericella, Eurotium sau Neosartorya.

Eurotium (grupul *A. glaucus*) produce cleistoteci de culoare gălbui-deschisă, toate speciile fiind xerofile.

E. herbariorum produce deteriorarea gelurilor şi a jeleurilor de struguri. Emericella produce cleistoteci albi, iar *E. nidulans* este teleomorfa speciei *Aspergillus nidulans*.

Neosartorya produce cleistoteci albi şi ascospori incolori.

N. fischeri este termorezistentă, iar rezistenţa sporilor săi este similară cu cea a celor de Byssochlamys. Aspergilii apar pe un număr mare de alimente, fiind pigmentaţi în galben-verde până la negru.

Putregaiul negru al piersicilor, citricelor şi smochinelor constituie una din condiţiile de alterare a fructelor. Unele specii se găsesc şi pe şunca afumată de ţară sau pe slanină, iar altele produc alterarea uleiurilor de palmier, alune şi porumb. *A. oryzae* şi *A. soyae* sunt implicate în fermentaţii ale shogu şi koji. *A. glaucus* produce un produs de peşte fermentat Katsuobushi. Grupul *A. glaucus* - *A. restrictus* conţine fungi de depozitare care invadează seminţele, boabele de soia şi fasolea. *A. niger* produce β-galactozidază, glucoamilază, invertază, lipază şi pectinază, iar *A. oryzae* produce α-amilază. Iniţial, se produc colonii pseudolevurice. Mai târziu, se răspândesc şi produc pete negre.

3. Aureobasidium (Pullularia). *A. pullulans (Pullularia pullulans)* reprezintă specia cel mai frecvent izolată din alimente.

Se pot găsi în crevete, sunt implicate în boala “petelor negre a cărnii de vită” conservată pe termen lung, fiind frecvente şi pe fructe şi legume.

4. Botrytis. Produc conidiofori lungi, subţiri u351 şi adesea pigmentaţi. Miceliul este septat, conidiile sunt prezente pe celulele apicale, de culoare cenuşie sau neagră, iar uneori se produc sclerotii neregulate. *B. cinerea* este cea mai frecventă specie găsită în alimente. Sunt importante pentru că produc mucegaiul gri al merelor, perelor, zmeurei, căpşunilor, strugurilor, merelor, citricelor şi a unor fructe cu sâmburi.

5. Byssochlamys. Acest gen este teleomorfa speciilor de Paecilomyces, dar acesta din urmă nu apare în alimente. Ascomicetul produce ciorchini de ascii deschise, fiecare cu 8 spori. Aceast gen este important pentru termorezistenţa sa, care are ca rezultat alterarea unor alimente consumate ce conţin mult acid. În timpul creşterii pot tolera valori potenţial reduse de oxidoreducere. Unele specii sunt producătoare de pectinaze, iar *B. fulva* si *B. nivea* alterează fructele conservate şi îmbuteliate.

6. Cladosporium. Produce hife septate cu conidii arborescente de culoare închisă, cu ramificaţii diverse. În cultură are o creştere catifelată, colorată în măsliniu, până la negru. Unele conidii au formă de lămâie. *C. herbarum* produce pete negre pe carnea de vită şi oaie congelată. Pot altera untul şi margarina, iar unele specii provoacă putregaiul restrâns al fructelor şi al strugurilor. Sunt fungi de câmp, care cresc pe grăunţele de orz şi grâu. *C. herbarum* şi *C. cladosporiodes* sunt speciile cel mai des întâlnite în fructe şi legume.

7. Colletotrichum. Fac parte din clasa Coelomycetes şi formează conidii în interiorul acervulilor.

Formează conidiofori simpli elongaţi şi conidii hialine unicelulare ovoide sau dolice. Au formă de disc sau de pernă, ceroase şi în general de culoare închisă. *C. gloeosporioides* este specia care se găseşte în alimente; ea produce antracoză, în special pe fructele tropicale, ca mango şi papaya.

8. Fusarium. Formează un miceliu închis, cu aspect de vată, cu nuanţe de roz, roşu, purpuriu sau cafeniu. Macroconidiile sunt septate, având formă fusiformă, până la falciformă (în formă de seceră). Produc putregaiul moale al smochinelor. Ca fungi de câmp, unele specii se dezvoltă pe grăunţele de orez sau grâu. Unele specii produc zearalenona, fumonizinele, trihotecenele.

9. Geotrichum (cunoscut în trecut ca *Oidium lactis* şi *Oospora lactis*). Aceşti fungi "yeast-like" sunt, de obicei, de culoare albă. Hifele sunt septate, iar reproducerea are loc prin formarea de artroconidii din hifele vegetative. Artroconidiile au extremităţile aplatizate. *G. candidum*, anamorfa speciei *Dipodascus geotrichum* este cea mai importantă specie din alimente. Este recunoscută şi sub denumirea de "ciuperca lactică", pentru că ea conferă o aromă specifică multor tipuri de brânză şi "ciuperca de aparate" pentru că se dezvoltă pe echipamentul ce vine în contact cu alimentele, în fabricile de procesare ale acestora, în special în cele de conservare a tomatelor. Cauzează putregaiul acru al citricelor şi piersicilor şi altereză smântâna. Sunt larg răspândite putând fi găsite pe carne şi legume. Unele specii participă la fermentarea lui gari.

10. Monilia/Sclerotinium. Produce conidii roz, gri sau cafenii. *M. sitophila* este stadiul conidial al speciei *Neurospora intermedia*. Monilia este stadiul conidial al speciei *Monilinia fructicola*. Ele produc putregaiul cafeniu al fructelor cu sâmburi, ca de exemplu, piersicile. *Monilina sp.* provoacă mumificarea afinelor.

11. Mucor. Hifele sunt neseptate şi produc sporangiofori purtători de columelă cu sporangii la vârf. Membrii acestui nou gen nu produc rizoizi sau stoloni. Produc colonii vătoase, iar unele specii produc "whiskers" (mustăţi de pisică) la carnea de vită şi "puncte negre" ale cărnii la carnea de oaie congelată. Cel puţin o specie, *M. miehei* produce lipază. Se găseşte în alimente fermentate, smântână, legume. Unele specii fermentează zerul de soia.

12. Penicillium. Conidioforii şi conidiile sunt singurele structuri de reproducţie prezente, genul fiind plasat în clasa Deuteromycota. Sunt plasate între ascomicete, atunci când se formează cleistoteci cu ascospori, ca de ex. Talaromyces sau Eupenicillium.

Eupenicillium. Dintre cele 2 genuri teleomorfe, genul Talaromyces este cel mai important în contaminarea alimentelor. *T. flavus* este teleomorfa lui *P. dangeardii,* fiind implicat în alterarea concentratului de suc de fructe. Produce spori termorezistenţi când se formează conidii, acestea cad din fialide. Culorile tipice pe care le au în alimente sunt albastru sau albastru verzui.

Unele specii produc putregaiul albastru şi verde al citricelor, strugurilor, perelor şi fructelor cu sâmburi.

13. Rhizopus. Hifele aseptate produc stoloni şi rizoizi. Sporangioforii se dezvoltă tipic sub formă de ciorchine din capul stolonilor la punctul de origine al rizoizilor. *R. stolonifer* reprezintă specia cea mai frecventă din alimente. Uneori, sunt denumite "mucegaiurile pâinii" şi produc putregaiuri moi, apoase ale merelor, perelor, fructelor cu sâmburi, strugurilor, smochinelor şi a altor fructe. Unele produc "petele negre" ale cărnii de vită şi de oaie congelate. Pot fi găsite pe slănină şi pe alte produse de carne procesate. Unele produc pectinaze, iar *R. oligosporus* este important în producerea de oncom, bongkrek şi tempeh.

14. Thamnidium. Aceste mucegaiuri produc sporangii mici, purtate de structuri extrem de ramificate. *T. elegans* este specia cea mai cunoscută datorită faptului că se dezvoltă pe membrele posterioare ale cărnii de vită refrigerate, creşterea fiind cunoscută sub denumirea "whiskers". Se dezvoltă şi în ouăle stricate.

15. Trichothecium. Hifele sunt septate purtând conidiofori lungi, subţiri şi simpli. *T. roseum* este singura specie de culoare roz şi produce mucegaiul roz al fructelor. De asemenea, provoacă mucegaiul moale al dovlecilor, găsindu-se frecvent pe orz, grâu şi porumb, uneori produc micotoxine.

16. Alte mucegaiuri. Aici sunt prezentate două categorii de microorganisme. Prima categorie este reprezentată de genuri diverse prezente în unele alimente, dar în general nu sunt considerate semnificative. Acestea sunt genurile Cephalosporium, Diplodia şi Neurospora. Cephalosporium este un deuteromicet ce se găseşte pe carnea congelată. Microsporii unor specii de Fusarium sunt asemănători celor din acest gen.

Diplodia este un alt deuteromicet, care provoacă mucegaiul cafeniu apos al piersicilor. Neurospora este un ascomicet, iar *N. intermedia* este cunoscut sub denumirea de "mucegaiul roşu al pâinii"

Monilia sitophila este anamorfa lui *N. intermedia*. Aceasta din urmă este importantă în fermentarea oncomului şi a fost găsită pe diferite cărnuri. Petele albe (white spot) ale cărnii de vită sunt provocate de *Sporotrichum spp*; mucegaiurile diverselor fructe sunt cauzate de *Gloeosporium spp.* Speciile de Helminthosporium sunt patogene pentru foarte multe plante.

Neosartorya fischeri: (anamorfa lui *Aspergillus fischerianus*) a fost pentru prima dată recunoscută în 1960, ca fiind cauza alterării unor produse din fructe. Ascosporii săi sunt extrem de termorezistenţi, fiind capabili să reziste la fierbere în apă distilată timp de o oră. Are un D87C de aproximativ 11 minute în tampon fosfat. Este interesant faptul că produce o serie de micotoxine – fumitremorgină A, B şi C; tereină, veruculogene şi fişerină.

Cea de-a doua categorie conţine mucegaiuri xerofile, cu rol foarte important în alterare. Pe lângă Aspergillus şi Eurotium, Pitt şi Hocking includ printre xerofile şi alte şase genuri: Basipetospora, Chrysosporium, Eremascus, Polypaecilum, Wallemia şi Xeromyces. Aceste mucegaiuri se caracterizează prin abilitatea lor de a creşte sub aw (water activity) = 0,85. Ele se găsesc în alimentele ce îşi datorează conservabilitatea unui aw redus. Dintre cele şase genuri numai două sunt discutate mai amănunţit: Wallemia şi Xeromyces.

Wallemia: produce pe mediile de cultură şi pe alimente, colonii de culoare cafenie. *W. sebi* este specia cea mai importantă şi poate creşte la aw de 0,69. Produce mucegaiul gri (dun) pe peştele uscat şi sărat.

17. Xeromyces. Are o singură specie: *X. bisporus*. Produce cleistoteci incolori

cu ascii evanescente ce conţin doi ascospori.

Acest microorganism are creşterea cea mai redusă în aw dintre toate celelalte microorganisme cunoscute. Creşterea sa maximă este de aproximativ 0,97, cu un optim de 0,88 şi un minim de 0,61. Are un D termic de 82,2°C şi 2-3 minute. Cauzează probleme la lichioruri, prune, ciocolată, sirop şi alte produse similare.

Prezentarea sinoptică a genurilor comune de levuri din alimente

Levurile pot fi considerate ca fungi unicelulari în contrast cu mucegaiurile care sunt multicelulare, totuşi aceasta nu reprezintă o definiţie precisă, pentru că multe din levurile obişnuite produc în realitate micelii cu grade variate.

Levurile pot fi diferenţiate de bacterii atât prin dimensiunile mai mari ale celulelor lor cât şi prin formele acestora care sunt ovale, alungite, elipsoidale sau sferice. Celulele levurice tipice au un diametru ce variază între 5-8 µm, unele fiind chiar mai mari.

Culturile mai vechi prezintă celule mai mici. Majoritatea levurilor importante din alimente se divid prin înmugurire sau fisiune.

Levurile pot creşte în limite mai largi ale pH-ului acid şi în etanol până la 18%. Multe cresc în prezenţa sucrozei 55-60%. Produc mulţi pigmenţi mergând de la crem până la roz şi roşu. Ascosporii şi artrosporii unor levuri sunt termorezistenţi.

În ceea ce priveşte taxonomia ciupercilor, în deceniul trecut s-au folosit metode mai noi, ce constau dintr-o compoziţie bazică de ARNr 5S, ADN şi din profiluri ale coenzimei Q.

Din cauza dimensiunilor mari ale genomului levurilor, analizele secvenţelor de ARNr 5S se folosesc mai mult pentru fracţiunile de ARN mai mari.

În sistematica levurilor s-au produs multe modificări, datorită folosirii unor metode mai noi, dar şi datorită unei filozofii ce pare a fi îndreptată mai mult spre gruparea taxonilor decât spre separarea lor. Una din lucrările de bază privind sistematica levurilor este aceea editată de Kreger-van Rij, publicată în 1984. În acest volum, genul Torulopsis din trecut a fost transferat în genul Candida, iar unele specii Saccharomyces au fost transferate în genul Torulaspora şi Zygosaccharomyces. Starea teleomorfă sau perfectă a mai multor levuri face ca referirile din literatura mai veche să fie dificile.

Taxonomia a circa 15 genuri este prezentată rezumativ mai jos.

Pentru o discuţie excelentă privind levurile din alimente trebuie consultate contribuţiile lui Deak şi Beuchat, Beneke şi Stevenson, Pitt şi Hocking.

Aceştia au prezentat pentru identificare, o cheie excelentă, simplificată, privind levurile din alimente.

Diviziunea: Ascomycotina

Familia: Saccharomycetaceae (formează ascospori şi artrospori; reproducere vegetativă prin fisiune sau înmugurire)

Subfamilia: Nadsonioideae

Genul: Hanseniaspora

Subfamilia: Saccharomycotoideae

Genul: Debaryomyces

Issatchenkia

Kluyveromyces

Pichia

Saccharomyces

Torulaspora

Zygosaccharomyces

Subfamilia: Schizosaccharoycetoideae

Genul: Schizosaccharomyces

Diviziunea: Deuteromycotina

Familia: Cryptococcaceae (fungi imperfecţi; reproducere prin înmugurire)

Genul: Brettanomyces

Candida

Cryptococcus

Rhodotorula

Trichosporon

Genurile de mai sus sunt enumerate în contiunare în ordine alfabetică:

1. Brettanomyces (stadiul perfect este Dekkera). Această levură este nesporogenă, cu celule ogivale şi înmugurire terminală, producând acid acetic din glucoză, numai în condiţii aerobe. *B. intermedius* reprezintă specia tip şi poate creşte la un pH scăzut de 1,8. Aceste levuri produc alterarea berii, vinului şi băuturilor nealcoolice, a murăturilor, iar unele sunt implicate în postfermentarea unor beri blonde. *B. bruxellensis* contribuie la formarea aminelor biogene din vinurile roşii.

2. Candida. Acest gen a fost creat în 1923 de către Berkhout şi a suferit o serie de modificări în ceea ce priveşte definiţia şi clasificarea. Este considerat ca fiind un taxon heterogen important ce poate fi divizat în 40 de segmente cu 3 grupe principale, bazat în principal pe compoziţia de acizi graşi şi cariotipizarea electroforetică. Numele generic înseamnă “alb strălucitor”, iar celulele nu conţin pigmenţi carotenoizi. Speciile imperfecte de ascomicete sunt plasate aici, incluzând şi fostul gen Torulopsis, după cum urmează:

Candida famata (*Torulopsis candida, T. famata*);

Candida kefyr (*Candida pseudotropicalis, T. kefyr, Torula cremoris*);

Candida stellata (*Torulopsis stellata*);

Candida holmii (*Torulopsis holmii*).

Multe din formele anamorfe de Candida sunt azi incluse în genul Kluyveromyces şi Pichia. *Candida lipolytica* este anamorfa lui *Saccharomycopsis lipolytica*.

Membrii acestui gen sunt levurile cele mai frecvente din carnea de vită şi pui tocate recent, iar *C. tropicalis* reprezintă genul predominant din alimente. Unii membrii sunt implicaţi în fermentarea boabelor de cacao, ca o componentă a granulelor de kefir şi în multe alte produse incluzând unele tipuri de bere şi sucuri de fructe.

3. Cryptococcus. Reprezintă anamorfa genului Filobasidiella şi a altor basidiomicete. Sunt nesporogene, se reproduc prin înmugurire multilaterală şi nu fermentează zaharurile. Sunt hialine, de culoare roşie sau portocalie şi pot forma artrospori. Au fost găsite pe plante, soluri, căpşuni şi alte fructe, peşte marin, creveţi şi carne de vită proaspătă, tocată.

4. Debariomyces. Levuri ascosporogene ce produc uneori un pseudomiceliu şi se reproduc prin înmugurire multilaterală. Ele sunt reprezentate de 2 genuri ce se găsesc în produsele lactate.

D. hansenii reprezintă ceea ce au fost în trecut *D. subglobosus* şi *Torulaspora hansenii*, fiind specia predominantă din alimente. Poate creşte în NaCl 24% şi la un aw scăzut de numai 0,65. Creşte în saramură şi pe brânzeturi provocând alterarea concentratului de suc de portocale şi a iaurtului.

5. Hanseniaspora. Sunt levuri apiculate ale căror anamorfe sunt speciile Kloeckera. Ele produc o înmugurire bipolară şi drept urmare se produc celule în formă de lămâie. Ascele conţin 2-4 spori în formă de pălărie. Fermentează zaharurile şi se găsesc pe tomate, smochine, căpşuni, citrice şi intervin în fermentarea boabelor de cacao.

6. Issatchenkia. Membrii acestui gen produc pseudomiceliu şi se multiplică prin înmugurire multilaterală. Aici au fost incluse unele specii ce făceau parte din genul Pichia. Teleomorfa speciei *Candida krusei* este *I. orientalis* şi se găseşte în medii lichide unde formează pelicule caracteristice. Conţine coenzima Q7, fiind frecvent întâlnită într-o mare diversitate în alimente.

7. Kluyveromyces (Fabospora). Sunt formatoare de ascospori, se reproduc prin înmugurire multilaterală, iar sporii sunt sferici. *K. marxianus* include fostele specii *K. fragilis, K. lactis, K. bulgaricus, Saccharomyces lactis* şi *S. fragilis*.

K. marxianus este una din cele 2 levuri predominante din produsele lactate. Aceasta conţine coenzima Q6, fiind implicată în fermentarea kumisului. Este de asemenea folosită pentru producerea lactozei din zer. Se găseşte într-o largă diversitate de fructe şi produce alterarea brânzeturilor.

8. Pichia. Genul cel mai larg de levuri adevărate. Se reproduc prin înmugurire multilaterală, iar ascele au de obicei 4 spori sferoidali în formă de pălărie sau saturniană. Pot forma pseudomicelii şi artrospori. Unii spori, în formă de pălărie aparţin speciilor Williopsis, iar unele din speciile mai vechi sunt acum clasificate în genul Debaryomyces.

P. guilliermondii este starea perfectă a speciei *Candida guilliermondii*. Anamorfa speciei *P. membranaefaciens* este *Candida valida*. Speciile lui Pichia formează în mod caracteristic pelicule pe mediile lichide şi sunt importante în producerea unor alimente indigene în diferite părţi ale lumii.

Unele au fost găsite pe peştele proaspăt şi pe creveţi şi cresc frecvent în saramura de măsline şi alterează murăturile şi varza murată.

9. Rhodotorula. Aceste levuri sunt anamorfe ale familiei Basidiomycetes. Cele care produc teleospori sunt incluse în genul Rhodosporidium. Se reproduc prin înmugurire multilaterală şi sunt nefermentativi.

R. glutinis şi *R. mucilaginosa* sunt speciile prevalente din alimente. Ele produc pigmenţi roz până la roşu, majoritatea fiind de culoare portocalie sau roz. Se găsesc pe carnea proaspătă de pui, crevete, peşte şi vită şi unele cresc pe suprafaţa untului.

10. Saccharomyces. Aceste levuri ascosporogene se multiplică prin înmugurire multilaterală şi produc spori sferici în asce. Sunt diploizi şi nu fermentează lactoza. Cele clasificate în trecut ca speciile *S. bisporus* şi *S. rouxii* sunt acum incluse în genul Zygosaccharomyces, iar specia *S. rosei* este clasificată în prezent în genul Torulaspora. Toate levurile din bere, pâine, vin, şampanie sunt incluse în specia *S. cerevisiae*. Ele se găsesc în granulele de kefir putând fi izolate dintr-o gamă largă de alimente: salam uscat şi fructe. *S. cerevisiae* produce rar alterări ale alimentelor.

11. Schizosaccharomyces. Se divid prin fisiune laterală sau prin formarea de pereţi transversali şi pot produce hife adevărate şi artrospori. Ascele conţin 4-8 spori în formă de boabe şi nu produc muguri. Sunt considerate ca fiind rudele îndepărtate ale levurilor adevărate. *S. pombe* este specia tip. Este osmofilă şi rezistentă la unii conservanţi chimici.

12. Torulaspora. Se reproduc prin înmugurire multilaterală, cu formare de spori sferici cu asce. Trei specii haploide incluse în trecut în genul Saccharomyces sunt azi incluse în acest gen. Ele sunt agenţi puternici de fermentare a zaharurilor şi conţin coenzima Q6. *T. delbrueckii* este specia cea mai prevalentă în alimente.

13. Trichosporon. Aceste levuri oxidative neformatoare de ascospori se multiplică prin înmugurire şi prin formarea de artroconidii. Produc micelii adevărate, iar fermentarea zaharurilor este absentă sau slabă. Sunt implicate în fermentaţiile boabelor de cacao şi idli şi au fost identificate în crevetele proaspăt, carnea de vită, pui, miel congelat şi alte alimente.

14. Yarrowia. În trecut aparţineau genului Saccharomycopsis. Fac parte din ordinul Endomycetales şi apar frecvent pe fructe, legume, carnea de vită şi pui. *Candida lipolytica* reprezintă stadiul amamorf, iar *Y. lipolytica* este stadiul teleomorf (perfect).

15. Zygosaccharomyces. Se reproduc prin înmugurire multilaterală, iar ascosporii în formă de boabe sunt în general liberi în asce. Majoritatea sunt haploide fiind agenţi de fermentare puternici ai zaharurilor.

Z. rouxii este specia tip şi poate creşte la un aw de 0,62, după *Xeromyces bisporus* cunoscut pentru abilitatea sa de a creşte la un aw scăzut.

Unele specii sunt implicate în fermentarea shoyu şi miso, iar altele sunt agenţi obişnuiţi de alterare a maionezei şi a garniturilor de salată, în special *Z. bailii*, care poate creşte la un pH de 1,8.

BIBLIOGRAFIE:

1. Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, and M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology (4th Ed.). John Wiley and Sons, New York, USA. 868p.
2. Barr, D. J. S. 1992. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. Mycologia 84:1-11.
3. Benny G. L. and K. O'Donnell. 2000. Amoebidium parasiticum is a protozoan, not a Trichomycete. Mycologia 92: 1133-1137.
4. Cafaro, M. J. 2005. Eccrinales (Trichomycetes) are not fungi, but a clade of protists at the early divergence of animals and fungi. Molecular Phylogenetics and Evolution. 35: 21-34.
5. Carroll, G.C., and D.T. Wicklow. 1992. The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem. Marcel Deker, Inc., New York.
6. Dix, N.J., and J.W. Webster. 1995. Fungal Ecology. Capman and Hall. London, U.K.
7. Griffin, D. 1993. Fungal Physiology (2nd Ed.). Wiley-Liss. New York.
8. Hasegawa, M., T. Hashimoto, J. Adachi, N. Iwabe, and T. Miyata. 1993. Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of Entamoeba that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. Journal of Molecular Evolution 36:380-388.
9. Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, and D. N. Pegler. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (8th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. 616p.
10. Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lücking, T. Lumbsch, F. Lutzoni, P. B. Matheny, D. J. Mclaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C. L. Schoch, J. W. Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, M. C. Aime, A. Aptroot, R. Bauer, D. Begerow, G. L. Benny, L. A. Castlebury, P. W. Crous, Y.-C. Dai, W. Gams, D. M. Geiser, G. W. Griffith, C. Gueidan, D. L. Hawksworth, G. Hestmark, K. Hosaka, R. A. Humber, K. Hyde, J. E. Ironside, U. Kõljalg, C. P. Kurtzman, K.-H. Larsson, R. Lichtwardt, J. Longcore, J. Miądlikowska, A. Miller, J.-M. Moncalvo, S. Mozley-Standridge, F. Oberwinkler, E. Parmasto, V. Reeb, J. D. Rogers, C. Roux, L. Ryvarden, J. P. Sampaio, A. Schüßler, J. Sugiyama, R. G. Thorn, L. Tibell, W. A. Untereiner, C. Walker, Z. Wang, A. Weir, M. Weiß, M. M. White, K. Winka, Y.-J. Yao, and N. Zhang. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 111: 509-547.
11. Isaac, S., J. C. Frankland, R. Watling, and A. J. S. Whalley. 1993. Aspects of Tropical Mycology. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
12. James, T. Y., F. Kauff, C. Schoch, P. B. Matheny, V. Hofstetter, C. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, H. T. Lumbsch, A. Rauhut, V. Reeb, A. E. Arnold, A. Amtoft, J. E. Stajich, K. Hosaka, G.-H. Sung, D. Johnson, B. O'Rourke, M. Crockett, M. Binder, J. M. Curtis, J. C. Slot, Z. Wang, A. W. Wilson, A. Schüßler, J. E. Longcore, K. O'Donnell, S. Mozley-Standridge, D. Porter, P. M. Letcher, M. J. Powell, J. W. Taylor, M. M. White, G. W. Griffith, D. R. Davies, R. A. Humber, J. B. Morton, J. Sugiyama, A. Y. Rossman, J. D. Rogers, D. H. Pfister, D. Hewitt, K. Hansen, S. Hambleton, R. A. Shoemaker, J. Kohlmeyer, B. Volkmann-Kohlmeyer, R. A. Spotts, M. Serdani, P. W. Crous, K. W. Hughes, K. Matsuura, E. Langer, G. Langer, W. A. Untereiner, R. Lücking, B. Büdel, D. M. Geiser, A. Aptroot, P. Diederich, I. Schmitt, M. Schultz, R. Yahr, D. Hibbett, F Lutzoni, D. McLaughlin, J. Spatafora, and R. Vilgalys. 2006a. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. Nature 443:818-822.
13. James, T. Y., P. M. Letcher, J. E. Longcore, S. E. Mozley-Standridge, D. Porter, M. J. Powell, G. W. Griffith, and R. Vilgalys. 2006b. A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota). Mycologia 98: 860-871.
14. Johnson, P. T. J., J. E. Longcore, D. E. Stanton, R. B. Carnegie, J. D. Shields, and E. R. Preu. 2006. Chytrid infections of Daphnia pulicaria: development, ecology, pathology and phylogeny of Polycaryum laeve. Freshwater Biology 51: 634-648.

15. Keeling, P. J. 2003. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. Fungal Genetics and Biology 38: 298-309.
16. Keeling, P. J., and N. M. Fast. 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annual Review of Microbiology 56: 93-116.
17. Lang, B. F., C. O'Kelly, T. Nerad, M. W. Gray, and G. Burger. 2002. Current Biology 12: 1773-1778.
18. rRNA sequences from Labyrinthula minuta and Cafeteria roenbergensis. Phycologia 33:369-377.
19. Liu, Y., M. C. Hodson, and B. D. Hall. 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. BMC Evolutionary Biology 6:74.
20. O'Donnell, K., and Redecker, D., and P. Raab. 2006. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. Mycologia 98: 885-895.
21. Schüßler, A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological Research. 105: 1413-1421.
22. Seif, E., J. Leigh, Y. Liu, I. Roewer, L. Forget, and B. F. Lang. 2005. Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in angiosperms. Nucleic Acids Research 33:734-744.
23. Steenkamp, E. T., J. Wright, and S. L. Baldauf. 2006. The protistan origins of animals and fungi. Mol. Biol. Evol. 23:93-106.
24. Ustinova, I., L. Krienitz and V. A. R. Huss. 2000. Hyaloraphidium curvatum is not a green alga, but a lower fungus; Amobedium parasiticum is not a fungus, but a member of the DRIPs. Protist 151: 253-262.
25. Wylezich, C., R. Radek, and M. Schlegel. 2004. Phylogenetic analysis of the 18S rRNA identifies the parasitic protist Nephridiophaga blattellae (Nephridiophagidae) as a representative of the Zygomycota (Fungi). Denisia 13: 435-442.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTOBACILLUS FROM MEAT FOR USE AS A BIOPRESERVATIVES IN MEAT AND MEAT PRODUCTS

LENGKEY Hendronoto A. W Y.[1], ŢOGOE I.[2], TAŞBAC B. A.[2], BALIA Rostita L. [1]
[1]Padjadjaran University, Bandung, Indonesia, Faculty of Animal Husbandry,
Jl. Dipati Ukur 35
[2]USAMV, Bucharest, Romania
hawlengkey@yahoo.com

Twenty five presumptive isolates of lactic acid bacteria, from raw meat and meat products, were isolated and identified. The results of the standard physiological and biochemical tests, 3 identified isolates of Lactococcus lactis ssp. lactis 1, 2 of Lactococcus lactis ssp. lactis 2, 7 ofLactobacillus fermentum 1, 8 isolates of Lactobacillus paracasei ssp. paracasei 1, 3 of Lactobacillus plantarum 1, and 2 of Lactobacillus rhamnosus. These strains results of this study, indicated that the presence of heterofermentative Lactobacillus in the meat and meat products.

Characterization of the microbial metabolic product for antimicrobial agents reveals that lactic acid may be responsible for the inhibition of the indicator organisms.

Key words: Lactic acid bacteria, biopreservatives.

Isolation and identification and of microorganisms from natural resources are an occurring process that have the most powerful means for obtaining cultures and also have commercial purposes. Especially for Lactic Acid Bacteria (LAB), which are used all over the world for manufactured a wide varieties fermented foods. This is used especially the lactic acids do not pose any health risks to mankind, and are Generally Recognized as Safe (GRAS) organisms.

The use of chemical preservatives and salt in foods is being frowned at, because of their probable adverse effects on the health of consumers. However, lowering of the salt content of food or omission of preservatives will encourage growth of microorganisms (Nykanen et al., 1998).

Lactic acid bacteria produce various compounds such as organic acids, diacetyl, hydrogen peroxide, and bacteriocins or bactericidal proteins during lactic acid fermentations (Oyetayo et al., 2003). Bacteriocins are antimicrobial proteinaceous compounds that are inhibitory towards sensitive strains and are produced by both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Tagg et al., 1976). The bacteriocins from the GRAS lactic acid bacteria have arisen a great deal of attention to control pathogens in foods. Lactic acid bacteria exert strong antagonistic activities against many microorganisms, including food spoilage organisms and pathogens. The inhibitory spectrum of some bacteriocins also includes food spoilage and/or food-borne pathogenic microorganisms (Schillinger, et al., 1996).

The aim of this work was to isolate and identify Lactobacillus for meat biopreservatives.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of lactobacillus. The lactobacillus were isolated from raw meats and raw Romanian sausages, by appropriate dilutions with NaCl fisiological. Decimal dilution of these samples were mixed with MRS medium (AEB, France) and incubated at 37ºC for 48-72 h. Pure cultures were maintained in MRS agar at 4ºC for short term use. Twenty five well-isolated colonies were picked up and transferred to MRS broth. They were propagated twice and streaked on MRS broth to check the purity of the isolates and then stored in MRS agar and overlaid with MRS agar for the anaerobic condition. Selection of strains was made in agreement with morphology, Gram stain, viability during storage at 4ºC and antimicrobial activity.

The identification of the cultures was based on the characteristics of the lactobacilli as described in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, fermentation of different carbon sources (API 50 CHL, bioMerieux SA, France), gas production from glucose, growth at different temperatures.

Sugar fermentation profiles of isolates. The abilities of these isolated strains to produce acids from different carbohydrates was determined by API 50 CHL test kit (bioMerieux SA, France). The API test strips were prepared as recommended by the kit supplier and scored after incubation for 24 and

48 hours at 37ºC. The results were communicated to the APIWEB, which used the phenotypic data to predict a species identity for each isolate. Interpretations of the fermentation profiles were facilitated by systematically comparing all results obtained for the isolates studied with information from the computer-aided database, in which the identification of a microorganism is accompanied by the following information: (i) The percentage of identification (%ID) is an estimate of how closely the profile corresponds to the taxon relative to all the other taxa in the database. (ii) The T-index represents an estimate of how closely the profile corresponds to the most typical set of reactions for each taxon. Its value varies between 0 and 1, and is inversely proportional to the number of atypical tests. (iii) Comments on the quality of identification derived from the %ID and the T-index of the selected taxon (excellent identification %ID > 99.9 and T> 0,75).

Antibiogram of LAB isolates. The isolates were inoculated into MRS broth individually and incubated for 24 h. About 20 ml MRS agar was seeded with the cultures of LAB isolates, mixed well, poured into sterile Petri plates and stored at 4ºC for 1 h to solidify the media. OCTA-discs (OXOID) were placed up side down, pressed on the top of the agar plates and kept again at 4º for 1 h. The plates were incubated at 37ºC over night. Resistance was defined as the absence of a growth inhibition zone around the discs.

RESULTS AND DISCUSSION

Lactic acid bacteria microflora. Twenty five isolates of LAB were isolated from the samples. After series of purification on MRS agar, twenty isolates were found to be Gram-positive, catalase negative, non-motile bacilli. The results of the isolation and identification of the standard physiological and biochemical tests were identified the isolates as 7 isolates of *Lactobacillus fermentum* 1, 8 of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1, 3 isolates of *Lactobacillus plantarum,* 2 isolates of *Lactobacillus rhamnosus,* and 3 isolates of *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* 1 and 2 isolates of *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* 2.

Table 1 presents the results of the best four final identifications for each type of isolates on API gallery.

Table 1 Results of the biochemical tests for the identification of the isolated strains by using API gallery

Isolated strains	Identification	% ID	T-index
Lactobacillus fermentum 1	Acceptable identification	84.7	0.41
Lactobacillus paracasei ssp. *paracasei* 1	Acceptable identification	84.4	0.43
Lactobacillus fermentum 1	Acceptable identification	80.5	0.46
Lactobacillus paracasei ssp. *paracasei* 1	Acceptable identification	73.5	0.81

In Table 2, presents the results of the antibiotics sensitivity of the four isolates. Isolated strains exhibited antibiotic sensitivity with the inhibition diameters obtained, are between 0 mm and 34 mm.

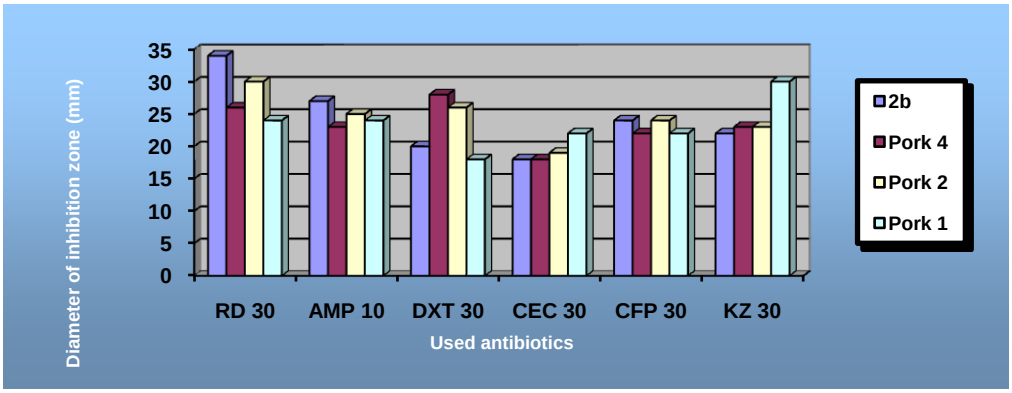
Table 2 Antibiotic sensitivity of the four isolates

Antibiotics	**Bacterial isolates**							
	2b		**Pork 4**		**Pork 2**		**Pork 1**	
SPC 100	17	I	16	I	20	S	10	R
RD 30	34	S	26	S	30	S	24	S
PB 100	6	R	6	R	6	R	0	R
TM 5	6	R	6	R	6	R	0	R
TE 30	23	S	22	S	25	S	13	R
AMP 10	27	S	23	S	25	S	24	S
OX 1	13	S	10	R	12	I	15	S
K 30	6	R	6	R	8	R	6	R
DXT 30	20	S	28	S	26	S	18	S
E 15	24	S	26	S	26	S	6	R
CN 10	7	R	6	R	7	R	8	R
CIP 5	16	S	11	R	11	R	15	R
CEC 30	18	S	18	S	19	S	22	S
CL 30	15	I	14	R	15	I	20	S
CFP 30	24	S	22	S	24	S	22	S
KZ 30	22	S	23	S	23	S	30	S

Notes: R = resistance, I = intermediate reaction, S = sensitivity

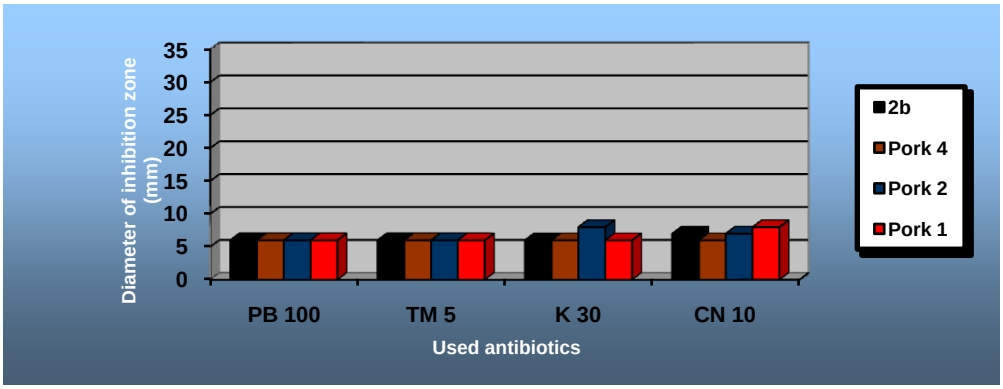
From Table 2, isolate 2b showed sensitivity reaction to RD 30, TE 30, Amp 10, Ox 1, DXT 30, E 15, CIP 5, CEC 30, CFP 30, and KZ 30. And isolate Pork 4, showed sensitivity to RD 30, TE 30, AMP 10, DXT 30 and E 15. Isolate Pork 2 showed sensitivity reaction to SPC 100, RD 30, TE 30, AMP 10, DXT 30 and E 15. And isolate Pork 1 showed sensitivity reaction to RD 30, AMP 10, OX 1 and DXT 30.

In the Graphics 1 to 3, there are the results about the four isolates to different antibiotics.



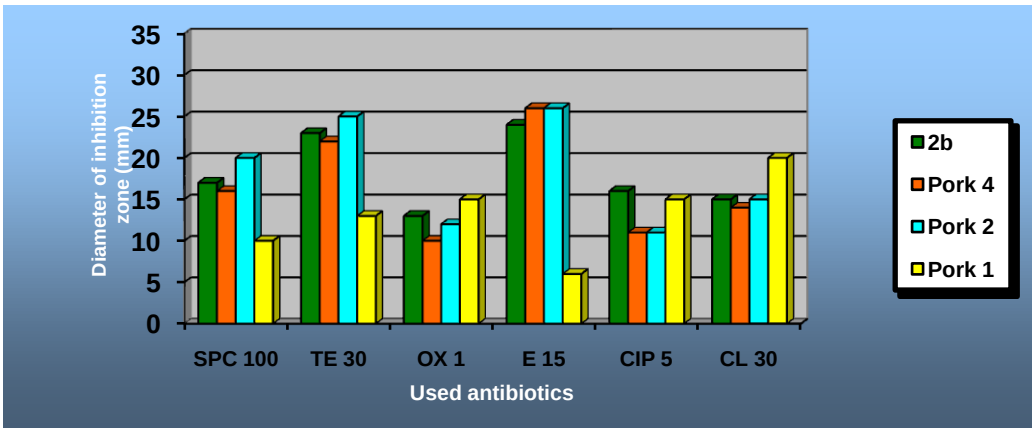
Graphic 1. Diameter of inhibition zone to the RD 30, AMP 10, DXT 30,CEC 30, CFP 30 and KZ 30

From the Graphic 1, the isolates 2b, Porc 4, Porc 2 and Porc 1 has sensitivity to RD 30, and also to the AMP 10, DXT 30, CEC 30, CFP 30 and KZ 30.



Graphic 2. Diameter of inhibition zone to the PB 100, TM 5, K 30, and CN 10

From the Graphic 2, the isolates 2b, Porc 4, Porc 2 and Porc 1, were resistance to the PB 100, TM 5, K 30 and CN 10.



Graphic 3. Diameter of inhibition zone to the SPC 100, TE 30, OX1, E 15, CIP 5, and CL 30

From the Graphic 3, the isolates 2b, and Porc 4, were have intermediate reaction, but Porc 2 has sensitivity reaction, and the Porc 1, has resistance to the SPC 100; but to the TE 30, the isolates were sensitivity and only the Porc 1 was resistance. To the OX 1, the isolates 2b and Porc 1 were sensitivity reaction, but Porc 2 was intermediate reaction, and only Porc 4 was resistance. To E 15, only Porc 1 has resistance; but the others (isolate 2b, Porc 4 and Porc 2) were sensitivity. The isolate 2b, was sensitivity to CIP 5, an Porc 4, Porc 2 and Porc 1 were resistance. And to the antibiotic CL 30, the isolates 2b and Porc 2 were intermediate reaction, but Porc 4 was resistance and Porc 1 was sensitivity.

CONCLUSIONS

The results obtained in this study revealed the presence of a wide variety of Lactic acid Bacteria (LAB) in the meat and meat products in Romania. Some of the isolated and identified LAB shows outstanding performances that were similar and in some cases was higher performances as biopreservatives, *Lactobacillus fermentum* 1; *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1; *Lactobacillus plantarum* 1; and *Lactobacillus rhamnosus*.

Antimicrobial compounds produced by LAB have provided these organisms with a competitive advantage over other microorganisms.

In conclusions, 25 LAB isolates from the meat and meat products, capable of producing good amount of bacteriocins have been anticipated to have enormous potential for applications as biopreservatives.

These researches are vital in the sense that functional properties in lactic acid bacteria improved the preservative effect to the meat and meat products. And also the LAB have an essential role in meat fermentation processes, as we known was food preservation of fermented foods, and the isolated strains can positively have impact on their use as starter cultures for fermented food especially for the traditional Romanian sausages, with a view to improving the hygiene and safety of fermented produce.

REFERENCES

1. De Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe, 1960. A mmedium for the Cultivation of Lactobacilli. J. appl. Bacteriol. 23: 130 – 135.
2. Encyclopaedia Britannica Online 2007. http://www.britannica.com/eb/article-9046772/Lactobacillus
3. Garrity, G. M., J. A. Bell, and T. G. Lilbum, 2004. Taxonomic Outline of The Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. DOI 10.1007/bergeysoutline200405.
4. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth ed. Williams and Williams. Baltimore. P. 566
5. Kandler, O. and N.weiss. 1986. Regular, nonsporing Gram-Positive Rods. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G.Holt (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Williams and Williams. Baltimore. P. 1208 – 1234.
6. Nykanen, A., Vesanen, S., and Kallio, H. 1998. Synergistic antimicrobial effect of nisin permeate and lactic acid on microbes isolated of Chicken. Lett. Appl. Microbiol. 27: 345 – 348.
7. Oyetayo, V. O., F. C. Adetuyi and F. A. Akinyosoye, 2003. Safety and Protective effect of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei used as probiotic agent in vivo. Afr. J. Biotech. 2: 448 – 452.
8. Schillinger, U., R. Geisen, W. H. Holzapfel, 1996. Trends Food Sci. Tech., 7, 158 – 164.
9. Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker, 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria, Bacteriol. Rev., 40: 722-756.

REZULTATE PRELIMINARE PRIVIND UTILIZAREA UNUI NOU VACCIN BAZAT PE VECTORI LENTIVIRALI PENTRU PREVENIREA INFECŢIILOR DETERMINATE DE VIRUSUL *WEST NILE* LA CABALINE

PRELIMINARY RESULTS REGARDING THE USE OF A NEW LENTIVIRAL VECTOR BASED VACCINE FOR THE PREVENTION OF WEST NILE DISEASE IN HORSES

LUDU Luanda[1], COURBEYRETTE Karine[2], SAVUŢA Gh.[1], CHARNEAU Pierre[2]
[1]FMV Iaşi
[2] Theravectys Institut Pasteur – BioTop 28 Paris
epirovet@yahoo.com

WNV is currently the most widely distributed arbovirus in the world, occurring on all continents and is responsable for life-threatening neurological disease in man and horses. The 1996-97 outbreak of West Nile fever in and near Bucharest, determined more than 500 clinical cases and a case-fatality rate approaching 10%. WNV is well established in the south east of Romania and its activity indicated by the IgM detection in horses will most likely continue at levels determined by virus, host and environmental factors in the next years. It is necessary therefore to design a new vaccine capable to protect horses from the disease and to induce a long term immune response.

Lentiviral vectors are good tools for vaccination due to their capacity to transduce nondividing cells.A lentiviral vector based vaccine coding for the sE West Nile virus protein was developed. An experimental lot of 4 horses serologically free for natural infection with West Nile virus, was innoculated (immunised)with a dose of the lentiviral vector. The immunogenicity was evaluated in the 7th, 14th, 21th and 29th day postimmunization using an ELISA assay: ,,Kit for detection of West Nile anti prM-E antibodies in horse sera" made by ID.VET Innovative Diagnostics. The antibody titre in the 21th day post immunisation was 2 time higher comparing to the nonimmunisated horses.

The results strongly encourage us to continue researches for the evaluation of the immunity duration, long term protection and safety of the vaccine candidate .

Key words: West Nile virus, vaccination, lentiviral vector, immunogenicity evaluation

Infecţiile cu virusul West Nile sunt unele dintre cele mai răspândite arboviroze cu o evoluţie semnalată atât în Europa cât şi pe celelate continente (3).

Virusul *West Nile* aparţine familiei *Faviviridae*, genul *Flavivirus*, încadrându-se în serocomplexul encefalitelor japoneze, boli infecţioase cu transmitere vectorială şi care determină afecţiuni cu simptomatologie neurologică la oameni şi la animale.

Virusul, transmis prin intermediul înţepăturilor de ţânţari, din genul *Culex,* este întreţinut în natură de către ţânţari şi păsări. Izolarea virală a fost realizată de la oameni cu simptomatologie neurologică şi de la diferite specii de mamifere: ecvine, ovine, caprine, bovine, cămile, carnasiere precum şi la amfibieni (5).

Din punct de vedere clinic boala se manifestă cu simptomatologie nervoasă la om şi la cabaline, la restul speciilor evoluând în general asimptomatic. La păsari au fost semnalate cazuri clinice cu simptomatologie nervoasă şi cu sfârşit letal dar în general evoluţia bolii este asimptomatică (1).

În anul 1996, în Bucureşti şi zona limitrofă a izbucnit o epidemie determinată de virusul *West Nile,* înregistrându-se sute de cazuri de meningoencefalită la oameni, dintre care 17 cu sfârşit letal. Virusul izolat din acest focar s-a dovedit a fi o tulpină strâns înrudită cu izolate virale din Senegal şi Kenya (6).

În intervalul 1996-2004, supravegherea evoluţiei virusului *West Nile* a semnalat prezenţa infecţiilor atât serologic (seroconversie) precum şi virusologic la oameni, animale şi ţânţari în zona de sud est a României (2).

Studiile ornitologice, entomologice şi serologice în populația de cabaline din sud estul României au indicat evoluția continuă a virusului în intervalul 2006-2008 prin detecția imunoglobulinei M (IgM), la cabaline şi izolarea virusului din organe de ciori şi de la tânțari din genul *Culex* (7).

Datorită gravității manifestărilor clinice ale infecției la cabaline, vaccinarea acestor animale reprezintă o necesitate, mai ales dacă ținem cont de faptul că în România şi chiar în mare parte din Europa vaccinurile contra infecției cu virusul *West Nile* nu sunt licențiate, iar în cazul izbucnirii unei epizootii în cadrul populației de cabaline prevenirea diseminării virusului ar fi trenată de imposibilitatea aplicării rapide a mijloacelor de prevenție.

Din aceste considerente, elaborarea unui vaccin capabil să protejeze cabalinele împotriva infecției şi să inducă un răspuns imun pe termen lung reprezintă o provocare.

Noile tehnologii de biologie moleculară şi în special recenta utilizare a vectorilor lentivirali în vaccinologie pot contribui la elaborarea unui vaccin capabil să ofere o mai bună protecție în timp a animalelor vaccinate.

MATERIAL ŞI METODE

A fost construit un vaccin vectorial lentiviral codând pentru proteina E a pericapsidei virusului *West Nile*. Particulele vectoriale au fost produse prin procedeul de co-transfecție tranzitorie a celulelor 293T (celule embrionare renale umane), metoda semiaderentă. Pentru realizarea mixului ADN s-au utilizat: plasmida ce codează proteinele structurale -8.7, transgena terapeutică TRIP ΔU3CMV sEWN, plasmida ce codează proteinele pericapsidei: VSV-G serotipul Indiana utilizând metoda descrisă de Charneau şi colab (4).

Pentru evaluarea *in vitro* a calității vectorului LEL2, a fost cuantificată cantitatea de proteină p24,(utilizandu-se testul ELISA comercial *ELISA HIV-1 p24 Core Profile ELISA – DUPONT*) şi a fost calculat numărului de unități de transducție prin PCR-Q.

Testarea imunogenităţii pe şoareci

Pentru a evalua puterea imunogenă a vectorului si a stabili doza răspuns au fost realizate teste preclinice *in vivo* prin imunizarea a 60 şoareci din linia C57Bl/6. Vectorul lentiviral a fost inoculat, la concentrații diferite, iar răspunsul imun în dinamică a fost cuantificat printr-un test ELISA indirect anti imunoglobulina G, ce a utilizat o proteină recombinantă sEWN.

Pentru realizarea testului ELISA, s-a prelevat sânge în zilele 6, 14, 21 post imunizare.

Construcția vectorului lentiviral precum şi testele de imunogenicitate pe şoareci au fost realizate în laboratorul de Virusologie, Biologie Moleculară şi Vectorologie, din cadrul Institutului Pasteur, Paris în colaborare cu echipa franceză.

Testarea imunogenităţii la cabaline-studiu pilot

Protocolul de lucru al studiului pilot a urmărit testarea la cabaline, a unei doze din vaccinul bazat pe vectori lentivirali.

Au fost selectate 4 femele de rasa Huțul, dintr-o zonă liberă de infecția cu virusul West Nile, ce au constituit lotul experimental.

Fig. nr.1. Lotul de cai utilizat pentru studiul pilot

O dată cu prima recoltare de sânge animalele au fost izolate şi întreţinute în aceleaşi condiţii pentru a evita diferenţele induse de influenţa mediului în interpretarea răspunsului imun.

În ziua administrării vaccinului (J0), a fost recoltată câte o probă de 9 ml de sânge de la fiecare animal pentru evaluarea statusului imunitar înainte de vaccinare.

Vectorul vaccinal a fost administrat intramuscular, în două puncte, pe laturile gâtului, în doză de 8ml/animal.

Pentru evaluarea răspunsului imun în dinamică, de la fiecare cal s-au prelevat câte 9 ml de sânge în zilele 7, 14, 21 şi 29 post-imunizare. Prelevarea s-a realizat în vacutainere sterile cu activator de ser. După exprimare, serul a fost alicotat în tuburi *Ependorf* sterile de 1,5 ml, individualizat şi conservat la -20 C°.

Evaluarea răspunsului imun a fost realizată cu un kit ELISA („*Kit for detection of West Nile anti prM-E antibodies in horse sera*" produs ID.VET Innovative Diagnostics). Serurile au fost analizate la o diluţie de 1/20, iar plăcile au fost citite la o lungime de undă de 450 nm.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma cuantificării vectorului neconcentrat construit denumit LEL2 am obţinut valori de **365ng/mL p24** şi un titru **6,36x10^6 UT/ml,** valori ce atestă calitatea construcţiei vectoriale şi au permis iniţierea testului preclinic pe şoareci.

Şoarecii imunizaţi au dezvoltat un răspuns imun calitativ, începând încă din ziua a 7-a post imunizare.

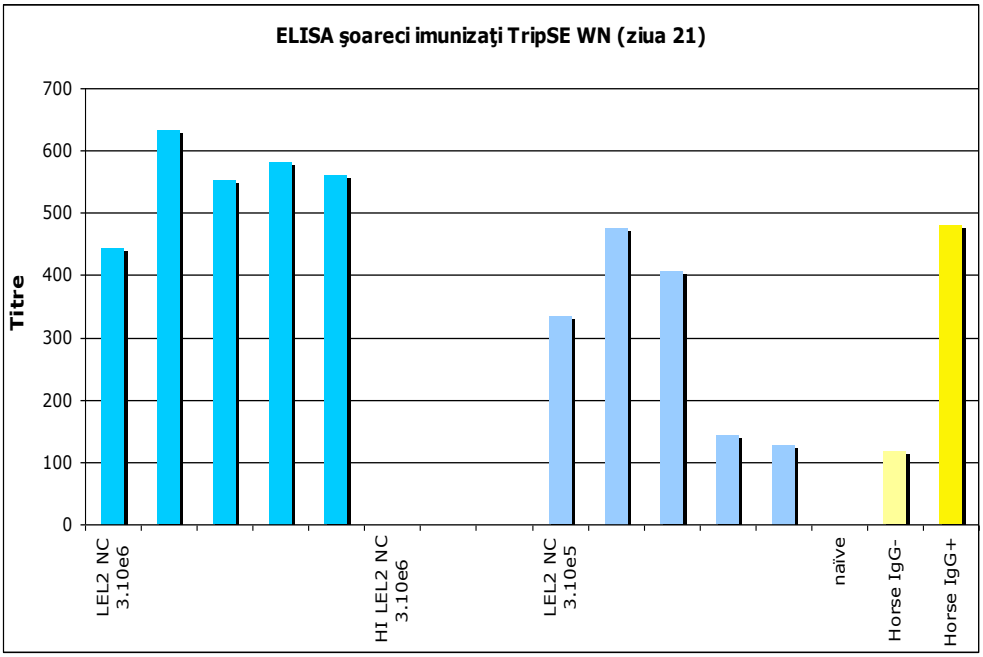


Figura nr.2. Rezultatele testului ELISA la la şoareci în ziua a 21-a post imunizare

Răspunsul obţinut în urma imunizării şoarecilor cu acest vaccin este puternic si asigura o protecţie stabilă în timp fără a periclita sănătatea şi statusul fiziologic normal al animalelor utilizate pentru testare.

În ceea ce priveşte rezultatul testului ELISA pentru detecţia anticorpilor anti prM-E ID.VET, în serul cabalinelor vaccinate cu vectorul lentiviral ce codează pentru proteina E a virusului West Nile, a fost evidenţiată o evoluţie crescătoare a titrului de anticorpi la trei dintre caii vaccinaţi începând cu zilele 14, 21 şi 29 post imunizare comparativ cu martorul pozitiv.

Răspunsul calitativ mai slab la unul dintre caii vaccinaţi poate fi pus pe seama afectării produsului vaccinal de către CO_2 utilizat pentru conservarea vectorului în timpul transportului.

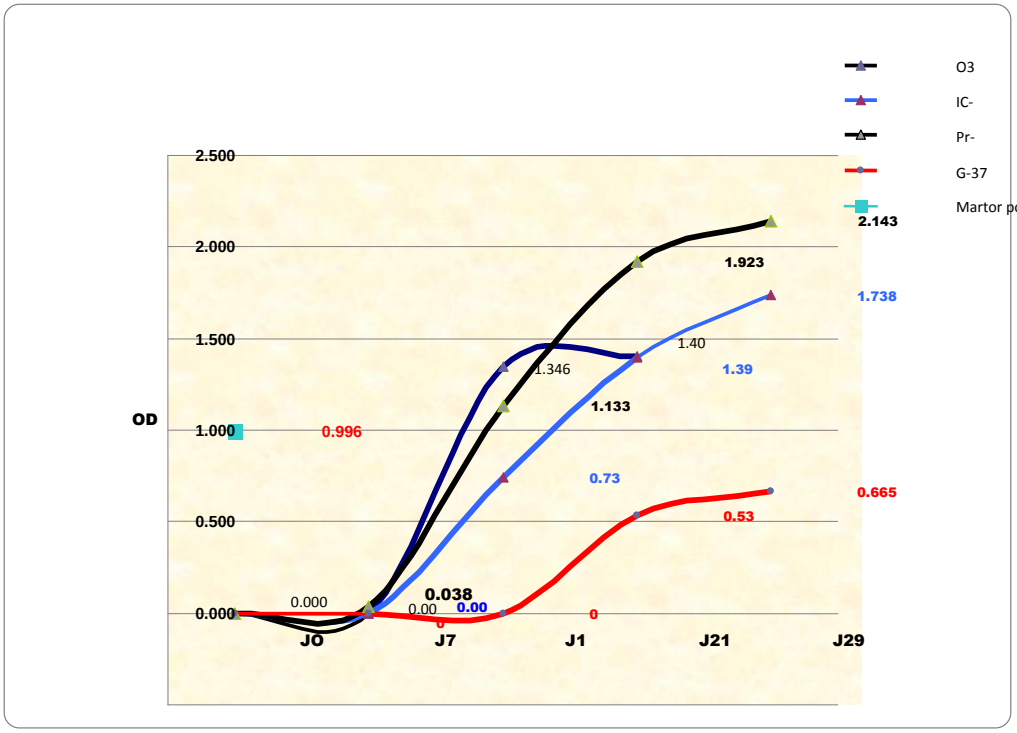


Figura nr.3. Rezultatele testului ELISA pentru detecţia anticorpilor anti prM-E

Evoluţia ascendentă a răspunsului imun în dinamică la caii vaccinaţi împotriva infecţiilor cu virusl West Nile, atestă calitatea vectorului construit şi încurajează continuarea cercetărilor în vederea validării vaccinului.

CONCLUZII

Virusul West Nile continuă să producă pe teritoriul României infecţii cu evoluţie clinică sau subclinică la oameni şi la animale, iar activitatea sa va continua în anii următori în funcţie de factorii implicaţi în ciclul de transmitere: ţânţari, specii de păsări receptive precum şi condiţii climatice.

Un vaccin bazat pe vectori lentivirali poate fi o alternativă la un control eficient în ceea ce priveşte răspândirea bolii.

Varianta de vaccin elaborată împotriva infecţiilor cu virusul West Nile a demonstrat până în prezent o bună capacitate imunogenă.

Rezultatele obţinute încurajează continuarea cercetărilor pentru validarea metodei.

BIBLIOGRAFIE

1. **Abroug** F, Ouanes-BesbesL, Letaief M, BenRF, Khairallah M, etal.2006. A cluster study of predictors of severe West Nile virus infection. Mayo Clin. Proc. 81:12–16
2. **Grant L**., Cambell A., Cornelia S., Ceianu B. and Harry M. Savage Epidemic West Nile encephalitis in Romania waiting for history to repeat it self
3. **Hubalek Z**, Halouzka J. 1999. West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. Emerg.Infect.Dis.5:643–50
4. **Iglesias MC**, Frenkiel MP, Mollier K, Souque P, Despres P, Charneau P. A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. J Gene Med 2005.
5. **Miller DL**, Mauel MJ, Baldwin C, Burtle G,IngramD, et al. 2003. West Nile virus in farmed alligators. Emerg. Infect. Dis.9:794–99)
6. **Savage HM**, Ceianu C, Nicolescu G, Karabatsos N, Lanciotti R, Vladimirescu A, et al. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania, 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. In press 1999.
7. **Savuţa Gh**., Luanda Ludu, Adriana Aniţă , D. Aniţă , Aurelia Ionescu. West Nile virus infections in Romania – past, present and perspective, Buletin USAMVB, aprilie 2008

CONTRIBUŢII LA STUDIUL SISTEMELOR POLIMORFE PROTEICE ÎN SÂNGE ŞI LAPTE LA O POLUAŢIE DE TAURINE B.N.R.

CONTRIBUTION ON STUDY REGARDING PROTEICAL SYSTEMS FROM BLOOD AND FROM MILK TO A BNR POPULATION

MACIUC V., CREANGĂ Şt., NACU G.
USAMV Iaşi
vmaciuc@yahoo.fr

The research was performed on a population of 142 milk cows from the B.N.R. breed were were studied some proteic polimorfic tipes in blood and milk, genetic balance, the dinamics of the genomes background and the posibility of application of the results in the cattle selection. It has been establish that the population it is characterized through the presence only of the alela Hb^A her frequency beeing 1. For the locus transferines, was set into evidence all of the 6 genotipes : AA,AD,DD,AE,DE, and EE. The highest frequency is on the alela Tf^D is 0.6166,Tf^A with 0,2688 and the smallest Tf^E with only 0,0812. For the locus kappa-cazeine were identifyed 109 cows with the genotype K- Cn AA, 23 with the genotype K-CnAB and 10 the genotip K-Cn AA, that has a frequency of 0,77. The frequency of the heterozygote is of 0,16; and the frequency of the homozygote K-Cn BB is of 0,07. The alelical frequency for the 7 lactation analised was 0,85 for K-Cn A and 0,15 for K Cn B.

The population it is balanced ,according Hardy-Weinberg law, for the sanquineous sistems and for the locus kappa-cazeine there is no stage of balance (p>5%), because of the small number heterozygotes individuals.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările au fost efectuate pe o populaţie de 142 capete vaci de lapte, din rasa Bălţată cu negru românească, exploatată în condiţiile S.C.D.C.B. Dancu –Iaşi. Pe această populaţie au fost analizate unele tipuri polimorfe proteice în sânge (hemoglobina, transferine) şi lapte (variantele genetice ale kappa-cazeinei), echilibrul genetic, dinamica genofondurilor şi posibilităţile de aplicare a rezultatelor în selecţia taurinelor. Pentru fenotipizarea variantelor genetice ale kappa-cazeinei s-a utilizat lapte degresat, adăugându-se în probe de analiză 0,30 ml soluţie saturată de uree şi 1-2 picături de mercaptoetanol pentru o mai bună disociere a fracţiunilor cazeinei.

Electroforeza este metoda de bază folosită în identificarea markerilor genetici şi constă în separarea particulelor sau ansamblurilor de particole încărcate electric, sub acţiunea unui câmp electric uniform aplicat din exterior. Metoda are la bază fenomenul fizico-chimic de deplasare sau migrare diferenţiată a diferitelor specii de particule într-un câmp electric . Deplasarea se face spre unul din electrozi, fără ca între aceştea şi componentele separate să aibă loc reacţii. În cercetările noastre am folosit electroforeza pe gel de amidon şi poliacrilamidă. Gelul de poliacrilamidă prezintă unele avantaje practice importante şi anume: reproductibilitatea, putere mare de rezoluţie, posibilitatea controlului mărimii porilor, inerţia şi stabilitatea chimică la variaţii mari de pH, temperatură şi forţă ionică, transparenţă perfectă şi flexibilitate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Hemoglobina îndeplineşte în organism un rol important, fiind purtătoare de O_2, CO şi a altor gaze. Se cunosc două tipuri de hemoglobină A şi B iar combinările posibile ale alelelor A (Hb^A) şi B (Hb^B) contribuie la apariţia a două forme homozigote (AA şi BB) şi o formă heterozigotă (AB). Rezultatele obţinute în urma cercetărilor efectuate pe populaţia B.N.R de la S.C.D.C.B. Dancu-Iaşi au scos în evidenţă numai tipul de hemoglobină AA. Astfel, s-a constatat numai prezenţa alelei Hb^A, frecvenţa ei fiind 1. Faptul că alela Hb^B lipseşte considerăm că este rezultatul creşterii animalelor în rasă pură de mai bine de 30 de ani.

Un alt tip de proteine studiate destul de detaliat la animale sunt transferinele serice, care îndeplinesc în organism un rol important, fiind purtătoare ale fierului. Transferinele fac parte din grupa β-globulinelor iar la efectuarea electroforezei se plasează între albumine şi $S\acute{a}_2$ - globuline. Rasele de taurine de origine europeană se caracterizează prin prezenţa a trei alele în acest locus – Tf^A,

Tf^D şi Tf^E. Combinările dintre ele contribuie la formarea a şase genotipuri: trei homozigote şi trei heterozigote, care pot fi identificate destul de uşor pe foregramă. În dependenţă de numărul de benzi deosebim genotipurile homozigote (AA, DD, EE,) care pe foregramă sunt puse în evidenţă prin trei benzi plasate la distanţe corespunzătoare de la linia de start, iar genotipurile heterozigote pot avea patru (AD şi DE) sau cinci benzi (AE). S-a mai constat că alela Tf^D reprezintă acţiunea a două alele Tf^{D1} şi Tf^{D2} , care controlează formarea unor proteine ce au aceeaşi viteză de migrare la electroforeză.

Investigând locusul transferinelor la populaţia B.N.R. de la S.C.D.C.B. Dancu-Iaşi s-au pus în evidenţă toate cele şase genotipuri: AA, AD, DD, AE, DE, şi EE (*tab.1).*

Tabelul 1

Distribuţia animalelor după tipurile de transferine şi frecvenţe alelice

Rasa	Ferma	N_0	Tipurile de transferine						λ^2	Frecvenţele alelelor		
			AA	AD	DD	EE	DE	EE		Tf^A	Tf^D	Tf^E
B.N.R.	S.C.D.C.B. Dancu-Iaşi	80	10 (5,7) *	19 (27,9) *	40 (33,8) *	4 (3,4) *	5 (8,4) *	2 (0,5) *	12,65	0,2688	0,6500	0,0812

- *în paranteze este indicat numărul de capete estimat teoretic*

Cea mai mare frecvenţă o are alela Tf^D fiind de 0,6166, după care urmează alela Tf^A cu frecvenţa 0,2688 iar Tf^E cu numai 0,0812 are cea mai mică frecvenţă. Comparând repartizarea de facto

Tabelul 2

Structura genetică pentru locusul kappa-cazeinei, la populaţiile din rasa B.N.R., pentru şapte lactaţii analizate

Lactaţiile analizate	n	Genotipurile K- Cn						X^2	Alele			
		AA		AB		BB			A		B	
		n	Frecvenţa	n	Frecvenţa	n	Frecvenţa		Frecvenţa	SE^+	Frecvenţa	SE
I	31	24 (21,9)+	0,77	4 (8,6)	0,13	3 (0,5)	0,10	15,12 *	0,84	0,04	0,16	0,04
II	43	35 (31,8)	0,82	4 (10,4)	0,09	4 (0,8)	0,09	17,05 *	0,86	0,037	0,14	0,037
III	33	25 (23,3)	0,76	5 (8,9)	0,15	3 (0,8)	0,09	7,8 *	0,84	0,045	0,16	0,045
IV	11	8 (8,1)	0,73	3 (2,6)	0,27	0 (0,3)	0	0,22 n.s	0,86	0,07	0,14	0,07
V	15	11 (11,4)	0,73	4 (3,3)	0,27	0 (0,3)	0	0,45 n.s	0,87	0,066	0,13	0,066
VI-VII	9	6 (6,3)	0,67	3 (2,5)	0,33	0 (0,2)	0	0,1 n.s	0,835	0,087	0,165	0,087
Cumulat Lactaţiile I-VII	**142**	**109 (102,6)***	**0,77**	**23 (36,2)**	**0,16**	**10 (3,2)**	**0,07**	**19,6 ***	**0,85**	**0,02**	**0,15**	**0,02**

-( ) + *- în paranteză este trecut numărul de indivizi, estimat teoretic, pe baza condiţiei de echilibru genetic al populaţiilor*

- SE++ - eroarea standard a frecvenţei de genă.

*- * - populaţia nu este în echilibru genetic (p>5%)*

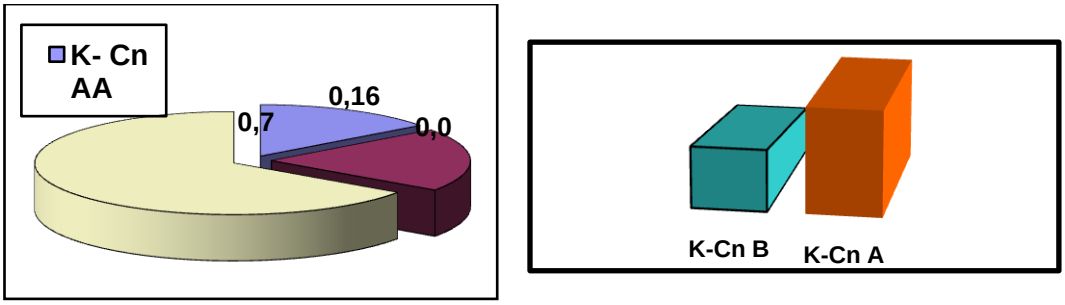


Fig. 1 Frecvenţele genotipice (a) şi alelice (b) pentru locusul kappa-cazeinei

şi cea estimată teoretic după tipurile de transferine, se observă că la ferma Dancu nu este o încălcare a echilibrului genetic, valoarea lui λ^2 fiind de 12,65.

În ce priveşte frecvenţa ridicată a alelei Tf^D, ar putea să fie rezultatul influenţei populaţiilor de vaci de lapte Bălţată cu negru din diferite zone şi ţări respectiv, la rasele Sură de stepă şi Bălţată românească această alelă are o frecvenţă ridicată – 0,8096 – 0,9000.

În *tabelul 2 şi fig.1* este prezentată structura genetică pentru locusul kappa-cazeinei, la populaţia BNR, separat pentru lactaţiile I-VII precum şi cumulat pentru toate cele şapte lactaţii analizate.

Astfel, au fost fenotipizate 142 de vaci din această populaţie, din care 109 au avut genotipul K-Cn AA, 23 genotipul K-Cn AB şi 10 genotipul K-Cn BB. Ponderea cea mai mare în populaţie o deţine genotipul K-Cn AA, care are o frecvenţă de 0,77; putând fi considerat un genotip " major ", atât pentru această populaţie, cât şi în cazul altor populaţii aparţinând tipului de rasă Friză. Frecvenţa heterozigoţilor este de 0,16; iar frecvenţa homozigoţilor K-Cn BB de 0,07 valoare destul de redusă, determinată de absenţa acestui genotip în cazul lactaţiilor a IV-a, a V-a şi a VI- VII-a, iar în primele 3 lactaţii fiind identificate câte 3 sau 4 vaci cu acest genotip.

Frecvenţa alelică pentru cele şapte lactaţii analizate, a fost de 0,85 pentru K-Cn A şi de 0,15 pentru K Cn B (*fig.1*). Frecvenţele celor două alele a variat între limite mici de la o lactaţie la alta. Valori mai reduse pentru alela B, s-au înregistrat în lactaţia a II a, a III a şi a IV a, valori ce sunt sub 0,15 şi reprezintă valoarea medie pe lactaţii.

Luându-se în considerare cele 7 lactaţii analizate, populaţia nu este în stare de echilibru (p>5%), conform legii Hardy-Weinberg, datorită numărului mic de indivizi heterozigoţi pentru locusul analizat. Existenţa acestui număr redus de indivizi heterozigoţi pentru locusul kappa-cazinei, poate fi cauzată de utilizarea la însămânţări artificiale a materialului seminal congelat din import, de la taurii Holstein- Friză, în special din SUA, care în general au o frecvenţă mai mare a genotipului homozigot K-Cn AA, imprimând şi acestei populaţii de vaci, frecvenţa ridicată a acestui genotip.

Frecvenţa celor două alele A şi B ale K- Cn, determinate pentru populaţiile din rasa Bălţată cu negru românească (0,15 pentru K- Cn B şi 0,85 pentru K- Cn A), este destul de diferită de frecvenţele obţinute de diverşi autori la populaţii de vaci aparţinând tipului de rasă Bălţată cu negru, din Europa de vest şi America de nord.

Astfel în SUA, în 1987, GONION şi COLAB, determină la o populaţie Holstein – Friză o frecvenţă a alelei K- Cn B de 0.2 şi a K- Cn A de 0,8, în Canada NG- KWAI-HANG şi colab., (1984), la aceeaşi rasă obţine o frecvenţă pentru K- Cn B de 0,25 şi pentru K- Cn A de 0,75; în Italia MATASINO (1992), citează valori ale frecvenţei K- Cn A de 0,82 – 0,75 la aceeaşi rasă. În Danemarca, Olanda şi Franţa sunt citate valori ale frecvenţei K – Cn B cuprinse între 0,26 – 0,34 iar a K – Cn A de 0,74 – 0,66 la populaţii din aceeaşi rasă, valori determinate de diferiţi autori.

Aceste diferenţe între frecvenţele alelelor kappa-cazeinei la populaţia din rasa B.N.R., comparativ cu valorile obţinute la populaţii aparţinând aceluiaşi tip de rasă, ar putea avea următoarele cauze: provenienţa populaţiilor de vaci de lapte Bălţată cu negru românească, din zone (sau din ţări), unde frecvenţa alelei B a K- Cn era de asemenea redusă şi existenţa unei relative izolări reproductive, care a menţinut această frecvenţă redusă.

Populaţia de vaci cu performanţele productive deosebite din S.C.D.C.B. Dancu, de-a lungul anilor au fost însămânţată cu material seminal congelat din import, provenit de la tauri cu potenţial productiv foarte mare, în special de provenienţă SUA. Din cercetările efectuate în SUA, Canada s-a demonstrat că taurii care au un potenţial productiv ridicat, au o frecvenţă redusă a alelei B a kappa-cazeinei, dat fiind că această alelă este asociată cu un nivel al proteinei din lapte mai ridicat, dar oarecum şi cu o producţie de lapte mai mică, iar selecţia taurilor s-a făcut de-a lungul anilor şi încă se face, în primul rând după producţia de lapte. Iar acest fapt este posibil să fi contribuit la menţinerea unei frecvenţe reduse a K-Cn B, în populaţia din rasa B.N.R din S.C.D.C.B Dancu.

CONCLUZII

1. Populaţia este caracterizată prin prezenţa numai a alelei Hb^A, frecvenţa ei fiind 1. La locusul transferine, s-au pus în evidenţă toate cele şase genotipuri: AA, AD, DD, AE, DE, şi EE. Frecvenţă cea mai mare o are alela Tf^D fiind de 0,6166, Tf^A cu 0,2688 iar cea mai mică Tf^E cu numai 0,0812 .
2. Pentru locusul kappa-cazeinei au fost fenotipizate 109 vaci cu genotipul K-Cn AA, 23 cu genotipul K-Cn AB şi 10 cu genotipul K-Cn BB. Ponderea cea mai mare în populaţie o deţine genotipul K-Cn AA, care are o frecvenţă de 0,77. Frecvenţa heterozigoţilor este de 0,16; iar frecvenţa homozigoţilor K-Cn BB de 0,07 . Frecvenţa alelică pentru cele şapte lactaţii analizate, a fost de 0,85 pentru K-Cn A şi de 0,15 pentru K Cn B.
3. Populaţia este în stare de echilibru, conform legii Hardy-Weinberg, pentru sistemele sangvine iar pentru locusul kappa-cazeinei nu este în stare de echilibru (p>5%), datorită numărului mic de indivizi heterozigoţi.
4. Frecvenţa ridicată a alelei Tf^D, ar putea să fie rezultatul influenţei populaţiilor de vaci de lapte de tip Friză din diferite zone şi ţări. De asemenea, frecvenţele alelelor kappa-cazeinei la populaţia din rasa B.N.R. sunt influenţate de provenienţa populaţiilor de vaci de lapte de tip Friză, din zone (sau din ţări) diferite, unde frecvenţa alelei B a K-Cn era de asemenea redusă şi existenţa unei relative izolări reproductive, care a menţinut această frecvenţă redusă.
5. Rezultatele obţinute, evidenţiază necesitatea determinării periodice a frecvenţei unor markeri genetici în populaţiile de vaci de lapte. Nu în ultimul rând, reproducătorii să fie fenotipizaţi după lactoproteina studiată, realizându-se astfel „protejarea” alelei B a K-Cn, care are tendinţa în mod natural de a-şi diminua frecvenţa.

BIBLIOGRAFIE

1. **BARANYI M., şi colab. 1993 –** Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian spotted and Hungarian grey Ca HB; A possible new genetic variant of B-lactoglobulin. Technische Universitat Munchen
2. **BUCĂTARU N., 1993** – Tipurile de kappa-cazeină din lapte la vacile de diferite origini. Simpozionul Naţional „Zilele Zootehniei Româneşti”, Iaşi
3. **CREANGĂ ŞT.,MACIUC V., GÎLCĂ I., PÂNTEA M. 2002 –** Dinamica structurii genetice pentru locusul kappa-cazeinei bovine, la o populaţie de vaci din rasa B.N.R. Lucrări ştiinţifice seria zootehnie CD, vol 45 U.Ş.A.M.V. Iaşi, ISSN 1454-7368
4. **MACIUC V., UJICĂ V., BUCĂTARU N 1999**. - Analiza polimorfismului genetic al locusului Tf serice la populaţii de taurine de rasă Bălţată cu negru românească. Simpozion ştiinţific. Lucrări ştiinţifice seria zootehnie vol. 41,42, U.Ş.A.M.V. Iaşi, ISSN 1454-7368

STUDIUL PRINCIPALELOR CARACTERE MORFOPRODUCTIVE LA O POPULAŢIE DE TAURINE DE TIP FRIZĂ DIN NORDUL ROMÂNIEI

STUDY REGARDING THE PRINCIPAL MORPHO-PRODUCTIVE CHARACTERS TO A FRIESEN POPULATION FROM ROMANIAN NORTH AREA

MACIUC V., NACU G., IACOB C.
USAMV Iaşi
vmaciuc@yahoo.fr

On a american Holstein- Frisian breed population ,expoated in a semiintensive sistem, they have been analised the morphoproductive characteristics, from the fenotipical and genotipical point of view the veterinarian medical orderly status, the technology applyed in the farm along with the capitalization of milk production. Is has been found out that a medium production of 8407,46 kg of milk in the first normal lactation and in the third the value was 10373,71 Kg of milk. The fat percentage had a value of 3.76% and the protein percentage was 3.24%. The bodily development is good, take into account the first lactation on a waist of 139,18 cm and a bodily weight of 613,8 kg. Regarding the milk production characteristics ,we have a genetical quantification from medium to powerful(h^2= 0.41-0.78) The same aspects are evidently on a bodily development(h^2= 0.45-0.50). The fenotipical,genetical and surroundings correlations are positive and intense between the quantitative milk production and the fat quantitaty(r_{pge} = 0,99), protein(r_{pge} = 0,94- 0,99) and not the last the hight at withers (r_{pge}= 0.55-0,62). The correlation between the quantitative milk production and the fat content, the protein from milk is negative (-0,10,- 0,20).

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul biologic studiat este reprezentat de aproximativ 70 capete vaci din rasa Holstein-Friză americană, exploatate în sistem semiintensiv, la ferma Natanael judeţul Suceava.

Pe aceste populaţii au fost analizate mai multe aspecte: structura genetică, performanţele productive pe perioada de exploatare (1-3 lactaţii) principalii indici de reproducţie, dezvoltarea corporală, starea sanitar-veterinară, tehnologia practicată în fermă, modul de procesare şi valorificare a laptelui. Datele primare au fost extrase din evidenţele Unităţilor de Ameliorare şi Reproducţie în Zootehnie (UARZ), ele au fost sistematizate, prelucrate şi interpretate prin metode specifice unor astfel de cercetări. În estimarea parametrilor genetici s-a folosit metoda REML (Restricted Maximum Likelihood). Aceasta se bazează pe un proces iterativ de maximizare a unei funcţii. Tehnicile de calcul variază în funcţie de algoritmul de optimizare ales, dar toate solicită la fiecare ciclu de iteraţii soluţii BLUP, pentru diferite efecte ale modelului. De asemenea, se practică un număr mare de iteraţii până se ajunge la convergenţă. Analiza datelor a fost făcută prin prisma îmbinării şi corelării cu numeroasele observaţii făcute direct în ferme şi cu datele statistice oficiale, cu raportarea rezultatelor obţinute la cerinţele perioadei de tranziţie la economia de piaţă şi de aderare la Uniunea Europeană (UE).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analizând structura intrapopulaţională a nucleului din zona de Nord a ţării, se remarcă câteva grupe de semisurori paterne cu o valoare genetică foarte bună. De menţionat că au fost luate în considerare grupele genetice cu minimum cinci indivizi, la lactaţia I-a normală. Dintre grupele genetice identificate au existat două grupe care au realizat performanţe peste 8000 kg lapte şi anume: 8H2178 cu 9585,6 kg lapte şi grupa genetică Stardust cu 8086 kg lapte. Alte grupe genetice cu un număr mai redus de fiice (până în 5 capete) au avut producţii medii de lapte de peste 10.000 Kg. Populaţia de taurine Holstein-Friză importată din SUA (50 capete, în prezent 100 capete) s-a adaptat foarte bine şi se evidenţiază prin performanţe productive ridicate.

În *tabelele 1, 2 şi 3* sunt prezentate valorile medii şi variabilitatea principalelor însuşiri morfoproductive la primele trei lactaţii.

Pe lactaţia I-a normală producţia medie este de 8407,46 kg lapte ca în lactaţia a III-a valoarea acesteia să ajungă la 10373,71 kg lapte. În ce priveşte variabilitatea producţiei de lapte, populaţia este heterogenă (>25%) şi sunt posibilităţi reale de ameliorare genetică prin selecţie. Calitativ, laptele prezintă o medie a procentului de grăsime şi proteină de 3,76% respectiv 3,24% în lactaţia I-a şi 3,68% respectiv 3,23% în lactaţia a III-a. Cantitatea de grăsime totală este mult mai mare decât cantitatea de proteină fiind corelată cu procentul respectiv şi cantitatea de lapte.

Indicii de reproducţie prezentaţi în *tabelul 4* evidenţiază valori foarte mari pentru intervalul între fătări (447-478 zile) şi valori optime la vârsta primei fătări şi repausul mamar (820 de zile şi 47 de zile).

Dezvoltarea corporală a efectivului din această unitate (Tab. 5) este cât se poate de bună având în vedere valorile pentru lactaţia I-a la talie de 139,18 cm, greutatea corporală 613,8 kg şi un exterior apreciat cu 83,8 puncte şi calificativul bun cu plus.

Tabelul 1

Valorile medii şi variabilitatea principalelor caractere de producţie la rasa Holstein-Friză, (lactaţia I), Ferma Natanael

Specificare	n	$X \pm s_x$	s^2	s	V%	Limitele variabilelor	
						Min.	Max.
Lact.totală durată (zile)	70	419,2 ± 20,16	11768,4	108,48	25,8	303	786
Kg. Lapte	70	10769,41 ± 792,34	7016330,1	2648,8	24,92	8131	20315
% grăsime	70	3,76 ± 0,057	0,1	0,31	8,24	3,32	4,84
Kg. Grăsime	70	401,7 ± 19,44	10959	104,6	25,6	241,43	781,59
% proteină	70	3,24 ± 0,028	0,024	0,15	4,62	2,9	3,54
Kg. Proteină	70	330,34 ± 17,7	8822,2	93,92	28,43	231,24	531,54
Lact.normală durată (zile)	70	304,95 ± 0,04	0,09	0,3	4,098	303	305
Kg.lapte	70	8407,46 ± 175,9	1327984,8	1152,38	13,7	5176	10582
%grăsime	70	3,72 ± 0,045	0,09	0,3	8,06	3,2	4,53
Kg.grăsime	70	314,12 ± 6,33	1721,4	41,48	13,20	235	384,91
% proteină	70	3,24 ± 0,026	0,032	0,17	5,24	2,87	3,97
Kg.proteină	70	274,26 ± 1,13	51,81	17,19	12,62	184	387

Tabelul 2

Valorile medii şi variabilitatea principalelor caractere de producţie la taurinele din rasa Holstein-Friză, (lactaţia a II-a), Ferma Natanael

Specificare	n	$X \pm s_x$	s^2	s	V%	Limitele variabilelor	
						Min.	Max.
Lact. totală durată (zile)	70	424,11 ± 24,87	10524,36	102,58	24,18	307	618
Kg.lapte	70	12854,4 ± 196,4	13948282	3734,73	29,05	7528	18278
%grăsime	70	3,58 ± 0,07	0,088	0,29	8,10	3,07	4,0
Kg.grăsime	70	435,24 ± 31,64	17003,34	130,39	29,95	281,57	694
% proteină	70	3,27 ± 0,095	0,15	0,38	11,62	2,87	4,24
Kg.proteină	70	402,81 ± 29,95	14361,06	119,83	29,74	264	659
Lact.normală durată (zile)	70	303,65 ± 1,24	31,18	5,58	1,83	280	305
Kg.lapte	70	10115,7 ± 341,1	2326116,36	1525,16	15,07	6954	12893
%grăsime	70	3,57 ± 0,08	0,13	0,36	10,08	3,06	4,5
Kg.grăsime	70	362,84 ± 12,49	3119,3	55,85	15,39	276,79	456,35
%proteină	70	3,26 ± 0,071	0,10	0,31	9,5	2,87	4,4
Kg.proteină	70	320,82 ± 10,66	2153,39	46,40	14,46	243	389

Tabelul 3

Valorile medii şi variabilitatea principalelor caractere de producţie la taurinele din rasa Holstein-Friză, (lactaţia a III-a), Ferma Natanael

Specificare	n	$x \pm s_x$	s^2	s	V%	Limitele variabilelor	
						Min.	Max.
Lact.totală durată (zile)	70	423,57 ± 29,01	21806,65	147,67	34,86	293	995
Kg lapte	70	12969,57 ± 77,79	15650576,9	3956,08	30,50	6472	23662
% grăsime	70	3,72 ± 0,05	0,078	0,27	7,25	3,0	4,3
Kg grăsime	70	478,76 ± 95,65	237034,03	486,86	11,69	241,77	898
%proteină	70	3,36 ± 0,082	0,10	0,31	9,22	2,95	4,13
Kg.proteină	70	408,88 ± 29,44	12128,6	110,12	26,93	273	625,34
Lact.normală durată (zile)	70	302,15 ± 2,48	197,62	14,05	4,65	226	305
Kg.lapte	70	10373,71 ± 322,2	3315349,67	1820,81	17,55	6472	12681
%grăsime	70	3,68 ± 0,04	0,067	0,25	6,79	2,96	4,27
Kg grăsime	70	379,71 ± 11,16	3984,44	63,09	16,61	241,77	475,72
% proteine	70	3,23 ± 0,048	0,05	0,22	6,81	2,91	3,63
Kg proteine	70	340,02 ± 11,10	2586,15	50,85	14,95	266	423,77

Tabelul 4

Valorile medii ale principalilor indicatori de reproductie la efectivul studiat, Ferma Natanael

Statisticii	V.P. (zile)	C.I. I-II (zile)	R.M.anter.făt.II (zile)	C.I. II-III (zile)	R.M. anter. făt.III (zile)
n	70	70	70	70	70
$x \pm s_x$	820,13 ± 15,77	447,95 ± 25,5	49,35 ± 2,8	478,4 ± 25,85	46,22 ± 2,4
s^2	1166,8	13,05	16,86	14,02	21,94
s	105,67	34,01	12,18	47,55	7,20
V%	12,88	25,45	26,12	16,21	15,57
Min.	686	330	30	396	30,0
Max.	1205	781	79	594	57

Tabelul 5

Valorile medii şi variabilitatea principalelor caractere morfologice la rasa Holstein-Friză, ferma Natanael

Specificare	n	$x \pm s_x$	s^2	s	V%	Limitele variabilelor	
						Min.	Max.
Înălţime la greabăn (cm)	70	139,18 ± 0,36	6,44	2,53	1,81	136	145
Înălţime la crupă (cm)	70	140,34 ± 0,38	7,31	2,70	1,92	136	150
Perimetru toracic (cm)	70	193,28 ± 1,24	76,20	8,72	4,51	179	214
Greutate corporală (kg)	70	613,8 ± 3,17	495,06	22,24	3.62	570	650
Puncte exterior	70	83,8 ± 30,72	25,55	5,05	6,02	75	96
Tip format	70	25,67 ± 0,21	2,36	1,52	5,92	20,4	28,9
Puncte fundament	70	16,16 ± 0,17	1,50	1,22	7,54	14	19
Puncte uger	70	25,68 ± 0,23	3,66	1,64	6,38	23,9	29,2
Puncte mameloane	70	19,31 ± 2,85	428,65	20,7	107,19	14,6	19

Tabelul 6

Valorile coeficientului de heritabilitate (h^2)

Caracterul	Coeficientul de heritabilitate (h^2)
Durata lactaţiei normale	0,32
Cantitatea de lapte	0,41
Conţinutul de grăsime din lapte	0,78
Cantitatea de grăsime din lapte	0,43
Conţinutul de proteină din lapte	0,69
Cantitatea de proteină din lapte	0,44
Talia	0,50
Greutatea corporal	0,45
Vârsta primei fătări	0,29

Tabelul 7

Valorile coeficientului de repetabilitate (R)

Caracterul	Coeficientul de repetabilitate (R)
Durata lactaţiei normale	0,30
Cantitatea de lapte	0,38
Conţinutul de grăsime din lapte	0,72
Cantitatea de grăsime din lapte	0,34
Conţinutul de proteină din lapte	0,64
Cantitatea de proteină din lapte	0,45
Talia	0,44
Greutatea corporal	0,46

Tabelul 8

Valorile coeficintului de corelaţie fenotipică (r_P), genotipică (r_G) şi de mediu (r_E)

Cupluri de caractere		r_P	r_G	r_E
Cantitatea de lapte şi:				
X	Durata lactaţiei normale	0,20	0,15	0,22
	Conţinutul de grăsime din lapte	-0,15	-0,10	-0,14
	Cantitatea de grăsime din lapte	0,99	0,99	0,99
	Conţinutul de proteină din lapte	-0,20	-0,16	-0,19
	Cantitatea de proteină din lapte	0,94	0,96	0,99
	Talia	0,47	0,40	0,43
	Greutatea corporal	0,45	0,51	0,46
	Vârsta primei fătări	-0,20	-0,22	-0,14
	Talia × Greutatea corporal	*0,62*	*0,60*	*0,55*

Parametrii genetici sunt prezentaţi în tabelele 6, 7 şi 8, evidenţiind valori foarte bune şi net superioare altor populaţii de tip Friză. Se constată un determinism genetic intermediar spre puternic pentru însuşirile producţiei de lapte (h^2 = 0,41 – 0,78) şi dezvoltare corporală (h^2 = 0,45 – 0,50). Caracterele de reproducţie sunt slab determinate genetic (h^2 = 0,29– 32).

Determinarea repetată a performanţelor unui individ prelungeşte timpul de cunoaştere mai exactă şi, în consecinţă, timpul pentru luarea deciziei cu privire la reţinerea sau respingerea lui în procesul de selecţie. De aceea, pentru a beneficia de această certitudine sporită, fără a mai apela la măsurători repetate în timp în vederea stabilirii difinitive a valorii animalului, se poate folosi un parametru genetic care dă indicaţii asupra gradului de asemănare a valorii caracterelor între o măsurătoare şi alta, parametru genetic denumit repetabilitate. În înţeles larg, repetabilitatea se referă la manifestarea fenotipică a aceluiaşi caracter în diferite perioade ale vieţii individuale.

Repetabilitatea producţiei de lapte şi a dezvoltării corporale (*tab.7)* evidenţiază aceleaşi aspecte ca şi în cazul determinismului genetic. La caracterele studiate, estimatele obţinute sunt intermediare spre puternice (0,30-0,72).

Referitor la corelaţiile fenotipice, genetice şi de mediu între diferitele însuşiri analizate, relevă valori şi semnificaţii diferite în funcţie de caracterele analizate (*tab. 8*). Dintre numeroasele perechi de caractere considerate, reţine atenţia corelaţiile fenotipice, genetice şi de mediu pozitive şi intense între producţia cantitativă de lapte şi cantitatea de grăsime (r_{pge} = 0,99), proteină (r_{pge} = 0,94-0,99) şi nu în ultimul rând greutatea corporală cu înălţimea la greabăn (r_{pge} = 0,55-0,62). Aceleaşi corelaţii pozitive şi de intensitate medie se constată între producţia cantitativă de lapte şi însuşirile de dezvoltare corporală (r_{pge} = 0,40 – 0,51). O corelaţie slabă cu producţia de lapte întâlnim la durata lactaţiei (0,15-0,22). Corelaţia clasică între producţia cantitativă de lapte şi conţinutul de grăsime, proteină din lapte este negativă (-0,10, -0,20).

CONCLUZII

În urma studiului efectuat asupra populaţiei de Holstein Friză din Nordul ţării se pot desprinde următoarele concluzii:

1. Dintre grupele genetice identificate au existat două grupe care au realizat performanţe peste 8000 kg lapte şi anume: 8H2178 cu 9585,6 kg lapte şi grupa genetică Stardust cu 8086 kg lapte. Alte grupe genetice cu un număr mai redus de fiice (până în 5 capete) au avut producţii medii de lapte de peste 10.000 Kg.
2. În lactaţia I-a normală, producţia medie a fost de 8407,46 kg lapte iar în lactaţia a III-a valoarea acesteia ajunge la 10373,71 kg lapte. Calitatea laptelui pentru grăsime şi proteină este de 3,76 – 3,24 %. În ce priveşte variabilitatea producţiei de lapte, populaţia este heterogenă (>25%) şi sunt posibilităţi reale de ameliorare genetică prin selecţie.
3. Dezvoltarea corporală a efectivului din această unitate este cât se poate de bună având în vedere valorile pentru lactaţia I-a la talie de 139,18 cm, greutatea corporală 613,8 kg.
4. Parametrii genetici, evidenţiază valori foarte bune şi net superioare altor populaţii de tip Friză. Determinism genetic intermediar spre puternic pentru însuşirile producţiei de lapte (h^2 = 0,41 – 0,78) şi dezvoltare corporală (h^2 = 0,45 – 0,50). Corelaţiile fenotipice, genetice şi de mediu pozitive şi intense între producţia cantitativă de lapte şi cantitatea de grăsime (r_{pge} = 0,99), proteină (r_{pge} = 0,94-0,99) şi nu în ultimul rând greutatea corporală cu înălţimea la greabăn (r_{pge} = 0,55-0,62). Corelaţia între producţia cantitativă de lapte şi conţinutul de grăsime, proteină din lapte este negativă (-0,10, -0,20).

BIBLIOGRAFIE

1. **CUCU GR. I., MACIUC V., MACIUC DOMNICA 2004** - Cercetarea ştiinţifică şi elemente de tehnică experimentală în zootehnie. Edit. Alfa, Iaşi
2. **GROSU, H. – 2003** – Programe de ameliorare. Edit. Tehnică Agricolă, Bucureşti
3. **MACIUC, V., UJICĂ, V., NISTOR, I.** - 2003 – Ghid practic de ameliorare genetică a bovinelor pentru producţia de lapte. Edit. Alfa, Iaşi.
4. **MACIUC VASILE 2006** – Managementul creşterii bovinelor. Edit Alfa, Iaşi
5. **SCHAEFFER L. R. 1993** – Linear models in animal breeding. Course notes, University of Guelph, Canada.
6. **TOSH J. J. AND WILTON J. W. 1994** – Effects of data structure on variance of prediction error and accuracy of genetic evaluation. J. Anim. Sci. 72:2568
7. **WOODS P. D. P. 1967** - Algebraic model of the lactation curve in cattle. Nature.

STUDIEREA SINERGISMULUI ÎN CAZUL ASOCIERII CEFTIOFUR-GENTAMICINĂ ASUPRA UNOR GERMENI DIN GENUL *ENTEROBACTER*

MĂRCULESCU Anca[1], RĂPUNTEAN Gh., OROS N. A.[1], CERNEA M.[1], CHEREJ R.I.[2]
[1] Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca
[2] Biovet Serv. S.R.L.

The bacterial sensitivity of 7 strains from Enterobacter genus was tested with antibiotics from quinolones (enrofloxacin) and aminoglycosides (gentamicin) groups, alone and in combination and the addition and synergism phenomenons were registered.

The interaction between enrofloxacin and gentamicin was appreciated by fractional inhibitory concentration index, using minimum inhibitory concentration for each antibiotic and the association of antibiotics.

Using the enrofloxacin and gentamicin combination in the tested strains, there were observed synergism in 57,14 % percentage and addition in 42,86 % of cases. No indifference or antagonism phenomenons were noted for this combination of antibiotics.

Combinarea agenţilor antimicrobieni este, în general, folosită pentru a creşte activitatea bactericidă, a lărgi spectrul antibacterian sau a preveni apariţia rezistenţei la antibiotice, la pacienţii cu infecţii polimicrobiene sau la pacienţii aflaţi în stare critică, în timp ce se aşteaptă diagnosticul bacteriologic de la laboratoarele de specialitate (FANTIN B. şi CARBON C., 1992).

În acest studiu s-a testat, asupra unor germeni din genul *Enterobacter*, activitatea antibacteriană a enrofloxacinei şi gentamicinei, atât singure, cât şi asociate, în scopul evidenţierii fenomenului de sinergism dintre antibiotice.

MATERIAL ŞI METODĂ

Una dintre metodele cel mai des folosite, la ora actuală, pentru aprecierea interacţiunii dintre două antibiotice este reprezentată de calcularea concentraţiei inhibitorii fracţionate. Deşi contestată de RAND K.H. şi col. (1993), această metodă este susţinută şi aplicată de majoritatea cercetătorilor din lumea întreagă (RENNEBERG J., 1988; LI R.C. şi col., 1993; CAPPELLETTY M. DIANE şi col., 1996; BAMBA H. şi col. 1997; HOLLANDER DEN J.G. şi col., 1998; MANDEL S. şi col., 2004; etc).

Relaţia dintre un medicament antimicrobian şi un agent patogen este descrisă în laborator prin concentraţia minimă inhibitorie (CMI). CMI defineşte concentraţia minimă de antibiotic care, în condiţii standardizate de lucru, inhibă creşterea unei anumite bacterii *in vitro* (DIGHE A. şi col., 2001; BOLDIZSAR E. şi col., 2002).

În prezentul studiu s-a utilizat metoda diluţiilor pentru determinarea concentraţiei minime inhibitorii (CMI), atât pentru enrofloxacină, gentamicină, cât şi pentru combinarea acestor două antibiotice.

Metoda concentraţiei inhibitorii fracţionate compară activitatea unui agent antimicrobian în combinaţie cu activitatea unui antibiotic singur, conform CF Referral Center for Susceptibility & Synergy Studies (SAIMAN LISA şi col., 2003) (tabel 1):

Tabel 1 Interpretarea valorilor concentraţiei inhibitorii fracţionate (CIF)

Valoarea CIF	Interpretare
≤ 0,5	Sinergism
> 0,5 – 1,0	Adiţie
> 1,0 - ≤ 4,0	Indiferenţă
> 4,0	Antagonism

În privinţa interpretării valorilor concentraţiei inhibitorii fracţionate, se denumeşte sinergism dintre antibiotice ca fiind acţiunea acestora prin completare reciprocă, în ceea ce priveşte efectul lor farmacodinamic. Se distinge un sinergism de "însumare", numit şi de adiţie şi unul de "potenţare", numit în acest studiu sinergism.

REZULTATE SI DISCUTII

Calcularea valorilor concentraţiei inhibitorii fracţionate (CIF) cu ajutorul formulei de calcul ce foloseşte concentraţia minimă inhibitorie (CMI) a fiecărui antibiotic utilizat în combinaţie, a determinat aprecierea efectului asocierii pentru combinaţia de antibiotice enrofloxacină-gentamicină (ENR-G).

Au fost testate în privinţa sensibilităţii bacteriene 7 tulpini ale genului *Enterobacter* izolate de la animale diagnosticate cu infecţii urinare, meningite şi septicemii, folosind enrofloxacina, gentamicina şi combinaţia enrofloxacină-gentamicină.

Valoarea CIF (1), în cazul tulpinii nr. 1, a evidenţiat fenomenul de adiţie între enrofloxacină şi gentamicină. Inhibarea germenilor de către combinaţia ENR-G s-a produs la nivelul tubului 7, CMI fiind de 0,0390625 µg pentru ENR şi 0,078125 µg pentru G. CMI pentru ENR a fost de 0,078125 µg, evidenţiată în tubul 7, iar pentru G, CMI a fost observată tot la nivelul tubului 7, unde antibioticul a fost prezent în cantitate de 0,15625 µg.

Tulpina nr. 2 a avut CMI la cantitatea de 0,15625 µg pentru ENR, la nivelul tubului 6 şi tot 0,15625 µg pentru G, obţinută la nivelul tubului 7. Prin combinarea ENR-G, CMI a fost evidenţiată în tubul 8, la cantitatea de 0,0195312 µg pentru ENR şi 0,0390625 µg pentru G. CIF în valoare de 0,3749996 a arătat asocierea ca fiind sinergică.

Tot sinergism între cele două antibiotice a fost evidenţiat şi pentru tulpina nr. 3, la o valoare puţin mai mică a CIF – 0,2499992. Această concentraţie a fost calculată după constatarea CMI atât pentru antibioticele singure, cât şi asociate: pentru ENR – 0,078125 µg (tubul 7), pentru G – 0,15625 µg (tubul 7), şi pentru combinaţia de antibiotice – ENR, la cantitatea de 0,0097656 µg, iar G, la cantitatea de 0,0195312 µg (tubul 9).

CMI a ENR pentru tulpina nr. 4 a fost 0,078125 µg, evidenţiată la nivelul tubului 7. În tubul 6 s-a produs inhibarea germenilor în cazul G, la cantitatea de 0,3125 µg. Pentru combinaţia ENR-G, CMI a fost observată în tubul 7, la cantitatea de 0,0390625 µg pentru ENR şi 0,078125 µg pentru G. CIF a fost de 0,75, interpretându-se valoarea acesteia ca adiţie.

Pentru tulpina nr. 5 s-a constatat fenomenul de sinergism, apreciat prin valoarea CIF (0,4999993). În acest caz, CMI pentru ENR a fost observată în tubul 7, fiind de 0,078125 µg; tot la nivelul tubului 7, la o cantitate de 0,15625 µg, a fost notată CMI pentru G. Tubul 8 a evidenţiat CMI pentru combinaţia de antibiotice: ENR (0,195312 µg) şi G (0,0390625 µg).

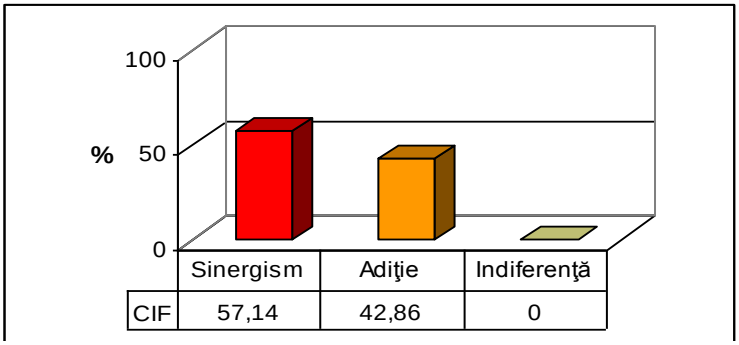
În cazul tulpinii nr. 6, pentru ENR, CMI a fost 0,0390625 µg evidenţiată în tubul 8, în timp ce inhibarea germenilor de către gentamicină (G) a fost realizată la cantitatea de 0,15625 µg, la nivelul tubului 7. Pentru combinaţia ENR-G, CMI a fost de 0,0195312 µg pentru ENR şi 0,0390625 µg pentru G, în tubul 8. Având în vedere valoarea CIF (0,7499987) s-a apreciat asocierea antibioticelor ca fiind aditivă (tabel 2).

Tabel 2. Valorile CIF pentru asocierea enrofloxacină-gentamicină – tulpini genul Enterobacter

Tulpina nr.	CIF	Interpretare
1	1	Adiţie
2	0,3749996	Sinergism
3	0,2499992	Sinergism
4	0,75	Adiţie
5	0,4999993	Sinergism
6	0,7499987	Adiţie
7	0,2499996	Sinergism

CMI a ENR pentru tulpina nr. 7 a fost de 0,15625 µg, la nivelul tubului 6, în timp ce pentru G a fost de 0,3125 µg, observată tot la nivelul tubului 6. Tubul 8 a evidenţiat CMI, la cantitatea de 0,0195312 µg pentru ENR şi 0,0390625 µg pentru G, iar valoarea CIF de 0,2499996 a indicat sinergism între antibioticele utilizate.

Astfel, în cazul asocierii enrofloxacinei cu gentamicinei, au fost observate fenomenele de sinergism (57,14 %) şi adiţie (42,86 %). Nu s-a constatat indiferenţă sau antagonism între aceste antibiotice (grafic 1) (MĂRCULESCU ANCA, 2007).



Grafic 1. Aprecierea asocierii enrofloxacină-gentamicină în cazul tulpinilor din genul Enterobacter

Rezultatele prezentului studiu, referitoare la acţiunea sinergică sau aditivă dintre enrofloxacină şi gentamicină, determină formularea unor recomandări favorabile privind utilizarea acestei combinaţii în practica medical veterinară.

BIBLIOGRAFIE

1. BAMBA H., Y. KONDO, WONG RELMING, S. SEKINE, M. MATSUZAKI (1997) – Minimum inhibitory concentration of various single agents of their combinations against *Helicobacter pylori* as estimated by a fast and simple *in vitro* assay method, The American Journal of Gastroenterology Vol. 92, No.4: 659-662;
2. BOLDIZSAR E., RĂPUNTEAN S., FIŢ N. – Microbiologie Generală. Practicum, Editura Genesis Tipo, Cluj-Napoca, 2002;
3. CAPPELLETTY M. DIANE, M.J. RYBAK (1996) – Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 677-683;
4. DIGHE ANAND, JEAN B.S. SPARGO, MARY JANE FERRARO (2001) – Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical Laboratory Reviews, Vol. 9, No. 1;
5. FANTIN B., C. CARBON (1992) – *In vivo* antibiotic synergism: contribution of animal models, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 907-912;
6. HOLLANDER DEN J.G, J.W. MOUNTON, H.A. VERBRUGH (1998) – Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 744-748;
7. LI R.C., J.J. SCHENTAG, D.E. NIX (1993) – The fractional maximal effect method: a new way to characterize the effect of antibiotic combinations and other nonlinear pharmacodynamic interactions, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.37., No.3: 523-531;
8. MANDEL S., MANDEL MANISHA DEB , K.N. PAL (2004) – Evaluation of combination effect of ciprofloxacin and cefazolin against *Salmonella enterica* serovar *typhi* isolates by *in vitro* methods, Calicut Medical Journal, 2(2):e2;
9. MĂRCULESCU ANCA – Teză de doctorat: Studiu privind evoluţia fenomenului de antibiorezistenţă şi posibilitatea diminuării acestuia prin asocierea de antibiotice, pe baza relaţiilor de sinergism, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, 2007
10. RAND K.H., H.J. HOUCK, P.BROWN, DIANE BENNETT (1993) – Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 613-615;
11. RENNEBERG J. (1988) – Definitions of antibacterial interactions in animal infection models, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 30, Suppl D: 176-75;
12. SAIMAN LISA, Y. CHEN, ELISABETH GARBER, M. TRAUZZI, J. ZHOU, P. SAN GABRIEL – CF Referral Center for Susceptibility & Synergy Studies, College of Physicians & Surgeons of Columbia University, New York, 1991;

ANALIZA FENOMENULUI DE ANTIBIOREZISTENŢĂ A UNOR GERMENI GRAM-POZITIVI FAŢĂ DE PENICILINĂ

MĂRCULESCU Anca[1], RĂPUNTEAN Gh.[1], OROS N. A.[1], CERNEA M.[1], NUELEANU Veturia[1], CHEREJ R.I.[2]
[1]USAMV Cluj-Napoca
[2]Biovet Serv. S.R.L.

This study presents the sensibility of bacterial pathogens from Streptococcus, Staphylococcus, Micrococcus, Corynebacterium and Clostridium genus to penicillin. The strains were isolated from animals and tested through antimicrobial agar disk diffusion method.

The highest percentage of resistance was registered for staphylococci (84,62 %) and streptococci (81,25 %), followed by corynebacteria (75 %), clostridia (66,66 %) and micrococci (50 %). There were also intermediary values of the antibacterial inhibition zones for all strains, except staphylococci. The only genus that was sensitive to penicillin was Staphylococcus, but in a pretty low percentage – 15,38 %.

The frequency of resistance phenomenon to penicillin was 78,95 %, intermediary values for the inhibition zones – 15,79 % and only 5,26 % of the strains showed sensibility to this antibiotic.

Penicilinele au fost foarte mult folosite în medicina veterinară, timp de mai bine de 30 de ani, fiind şi la ora actuală cel mai important grup de antibiotice.

Au la bază un sistem heterociclic numit penam; penamii cuprind 6 generaţii de peniciline. Prima generaţie este reprezentată de penicilinele naturale, obţinute prin biosinteză, iar următoarele 5 generaţii sunt semisintetice. Prin urmare, grupa penamilor cuprinde penicilina G (benzilpenicilina) obţinută natural, prezentă sub diferite forme farmaceutice şi penicilinele de semisinteză care au fost concepute cu scopul obţinerii de peniciline superioare celor naturale în privinţa spectrului de activitate, rezistenţei la sucul gastric şi la acţiunea penicilinazelor (ONIGA O. şi col., 2003).

Antibioticele existente permit un control al majorităţii infecţiilor microbiene, dar rezistenţa bacteriană faţă de antibiotice este întâlnită la toate speciile bacteriene şi este cunoscută pentru toate familiile de antibiotice, inclusiv peniciline. Numărul mare şi descoperirea continuă de noi agenţi antimicrobieni, precum şi marea varietate a celor disponibili, permite medicului, uman sau veterinar să opteze, pe baza datelor clinice şi de laborator, pentru o terapie adecvată şi eficientă (MĂRCULESCU ANCA, 2007).

Prin urmare, este necesar a investiga sensibilitatea faţă de antibiotice înaintea recomandării în terapie, lucrarea de faţă realizând aceste determinări pentru penicilină.

MATERIALE ŞI METODE

Încă de la descoperirea penicilinei de către Fleming, multe laboratoare au cercetat şi cercetează metode *in vitro* pentru a determina efectul antibioticelor asupra bacteriilor şi, prin urmare, multe teste de susceptibilitate faţă de antibiotice au fost propuse. Antibiograma reprezintă o metodă relativ simplă cu ajutorul căreia se poate aprecia sensibilitatea unui germen faţă de mai multe antibiotice (RILEY V.T., 1981).

Materialele utilizate în studiu au fost reprezentate de tulpini bacteriene gram-pozitive, medii de cultură şi microcomprimate cu cantităţi cunoscute de antibiotice.

Au fost investigate, în privinţa sensibilităţii faţă de penicilină, 38 tulpini din genurile bacteriene: *Streptococcus, Staphylococcus, Micrococcus, Corynebacterium* şi *Clostridium.*

Tulpinile bacteriene au fost izolate din abcese, flegmoane, secreţii mamare, lapte mastitic, exsudate purulente, secreţii vaginale, organe cu leziuni, conţinut din intestine, cadavre de animale.

Însămânţările au fost efectuate pe mediile de cultură uzuale (bulion şi agar), îmbogăţite cu ser, glucoză, sânge pentru majoritatea tulpinilor bacteriene izolate (RĂPUNTEAN GH. şi col., 2001).

Metoda difuzimetrică în gel de agar cunoscută în mod curent sub numele de antibiogramă trebuie efectuată în condiţii standard, respectând cu stricteţe atât modalitatea de recoltare a probelor, cât şi metodologia de efectuare, pentru ca rezultatul să fie cât mai concludent (NCCLS M31-A, M31-T, 1999).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Penicilina G şi produşii similari orali sunt active împotriva bacteriilor aerobe şi anaerobe gram-pozitive şi cu câteva excepţii (*Haemophilus* şi *Neisseria* spp. şi tulpini de *Bacteroides,* altele decât *B. fragilis*) sunt inactive împotriva organismelor gram-negative, în concentraţii normale (MERCK, 2005). După alţi autori, spectrul antibacterian al penicilinei cuprinde şi 75-90 % din tulpinile *Pasteurella multocida* (AUCOIN D., 1993).

Organismele, de obicei, sensibile *in vitro* la penicilina G sunt streptococcii, stafilococi penicilino-sensibili, *Arcanobacterium pyogenes, Clostridium, Erysipelothrix rhusiopathiae, Actinomyces ovis, Leptospira canicola, Bacillus anthracis, Fusiformis nodosus şi Nocardia* spp. Conform Manualului MERCK (2005), multe bacterii gram-pozitive sunt sensibile, însă, la penicilinele semisintetice cu spectru larg: *Staphylococcus, Streptococcus, Corynebacterium, Clostridium* etc.

Acest studiu a vizat testarea sensibilităţii a 38 tulpini de streptococi, stafilococi, micrococi, dar şi corinebacterii şi clostridii, interpretând antibiogramele după zona de inhibiţie antibacteriană din jurul fiecărui microcomprimat impregnat cu un anumit antibiotic.

Criteriile de interpretare au ţinut cont de standardele existente pe plan mondial, apreciind germenii bacterieni ca rezistenţi, intermediari sau sensibili la acţiunea antibioticelor (tabel 1):

Tabel 1.Interpretarea antibiogramelor conform standardelor internaţionale

Nr crt	**Antibiotic**	**Conc. atb/disc**	**Diametrul zonei de inhibiţie antibacteriană (mm)**			
			R	*I*	*S*	*Interpretare conform valorilor standard:*
1	Penicilină Penicilină G -stafilococi -enterococi -streptococi (nu *S.pneumoniae*)	5 µg 10 U.I.	≤ 22 ≤ 28 ≤ 14 ≤ 19	23 – 25 – – 20 – 27	≥ 26 ≥ 29 ≥ 15 ≥ 28	Neo-Sensitab Veterinary Pathogens –NCCLS Oxoid Manual Veterinary Pathogens – NCCLS

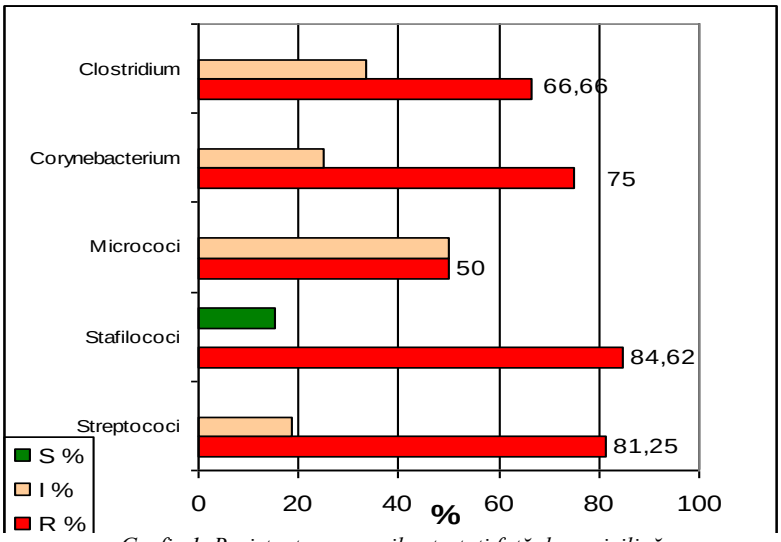
Rezultatele antibiogramelor pentru penicilină sunt prezentate în tabelul 2:

Tabel 2. Sensibilitatea/rezistenţa la penicilină a unor tulpini bacteriene

Nr. crt.	**Tulpini**	**Nr.**	**Sensibilitate/rezistenţă**					
			R	**%**	**I**	**%**	**S**	**%**
	Streptococi	16	13	81,25	3	18,75	-	-
	Stafilococi	13	11	84,62	-	-	2	15,38
	Micrococi	2	1	50	1	50	-	-
	Corynebacterium	4	3	75	1	25	-	-
	Clostridium	3	2	66,66	1	33,33	-	-
Nr. germeni		38	30	78,95	6	15,79	2	5,26

Tulpinile de streptococi au fost în procent de 81,25 % rezistente faţă de penicilină şi 18,75 % cu zone de inhibiţie încadrate în categoria „intermediare”. Prin urmare, nici una din tulpinile cercetate nu a prezentat sensibilitate. Din cele 13 tulpini testate ale genului *Staphylococcus,* 11 (84,62 %) au fost rezistente şi 2 (15,38 %) au fost sensibile.

Micrococii au prezentat rezistenţă şi valori intermediare ale zonelor de inhibiţie în procent egal – 50 %, pe când germenii genului *Corynebacterium* au avut 75 % tulpini rezistente şi 25 % tulpini intermediare, iar cei ai genului *Clostridium* – 66,66 % tulpini rezistente şi 33,33 % intermediare (grafic 1).



Grafic 1. Rezistenţa germenilor testaţi faţă de penicilină

THACKER H. LEON, în 2003, a observat diferenţe sezoniere, în ceea ce priveşte rezistenţa faţă de penicilină. Astfel, la testarea unor tulpini de *Staphylococcus aureus* izolate de la cabaline, în perioada ianuarie-iunie rezistenţa a fost de 71 %, în schimb în perioada iulie-decembrie a existat un număr mai redus de tulpini rezistente – 50 %. Situaţia a fost puţin diferită pentru tulpini ale speciei *Staphylococcus epidermidis*: 25 % rezistente faţă de penicilină în perioada ianuarie-iunie şi 50 %, în perioada iulie-decembrie. În schimb, tulpinile de *Staphylococcus aureus* izolate de la pisici în perioada ianuarie-iunie, au fost în totalitate rezistente faţă de penicilină.

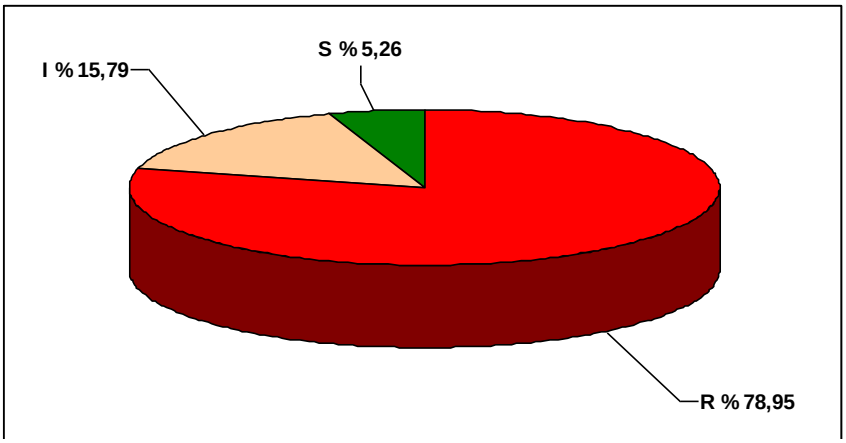
Sensibilitate la acţiunea penicilinei şi a altor antibiotice betalactamice o au doar microorganismele care posedă pereţi celulari. Rezistenţa bacteriilor la aceste antibiotice ia diferite forme. La microorganismele gram-pozitive, structurile capsulare împiedică accesul la membrana citoplasmatică, dar acestea limitează foarte rar difuziunea inhibitorilor peretelui celular.

Rezistenţa faţă de agenţii antimicrobieni betalactamici poate rezulta şi din alterări ale ţintelor reprezentate de proteinele care leagă penicilinele (PBP = penicillin binding proteins). Pierderea sau scăderea afinităţii acestor proteine pentru peniciline poate duce la o creştere a rezistenţei faţă de peniciline (MERCK, 2005).

Dar, totuşi, cel mai important mecanism de rezistenţă la antibioticele betalactamice este inactivarea enzimatică. Betalactamazele care acţionează asupra penicilinelor poartă denumirea de penicilinaze. Există cel puţin 6 tipuri principale de betalactamază care pot scinda inelul betalactamic, ceea ce duce la inactivarea agentului antimicrobian (MATINCA DOINA, 2002).

Studiul comportamenului celor 38 de tulpini bacteriene arată o rezistenţă mare a germenilor la penicilină – 78,95 %, doar 5,26 % fiind sensibile, existând şi tulpini intermediare – 15,79 % (grafic 2).

Având în vedere rezultatele acestui studiu, recomandăm realizarea antibiogramei, deoarece această metodă constituie la ora actuală una dintre probele de laborator pe care o considerăm absolut indispensabilă a fi efectuată, ori de câte ori se doreşte aplicare unor tratamente ţintite etiologic. Numai astfel tratamentele aplicate vor fi eficiente, economice şi se va preveni fenomenul de antibiorezistenţă.



Grafic 2. Frecvenţa fenomenului de rezistenţă la penicilină

CONCLUZII

- Tulpini din genurile bacteriene *Streptococcus, Staphylococcus, Micrococcus, Corynebacterium* şi *Clostridium* au fost investigate în privinţa sensibilităţii faţă de penicilină.
- Metoda difuzimetrică în gel de agar a fost folosită pentru testarea agenţilor patogeni.
- Tulpinile de streptococi au fost în procent de 81,25 % rezistente faţă de penicilină şi 18,75 % cu zone de inhibiţie încadrate în categoria intermediare.
- Dintre tulpini testate ale genului *Staphylococcus,* 84,62 % au fost rezistente şi 15,38 % au fost sensibile.
- Micrococii au prezentat rezistenţă şi valori intermediare ale zonelor de inhibiţie în procent egal – 50 %.
- Germenii genului *Corynebacterium* au avut 75 % tulpini rezistente şi 25 % tulpini intermediare.
- Tulpinile testate din genul *Clostridium* au fost rezistente în procent de 66,66 % şi intermediare 33,33 %.
- Studiul celor 38 de tulpini bacteriene arată o rezistenţă mare a germenilor la penicilină – 78,95 %, existând şi tulpini intermediare – 15,79 %; doar un procent de 5,26 % din tulpinile testate au fost sensibile la acest antibiotic.

BIBLIOGRAFIE

1. AUCOIN DAVID – The Antimicrobial Reference Guide to Effective Treatment. First Edition, North American Compendiums Inc., Port Huron, 1993
2. MATINCA DOINA – Antibiotice, Editura Medicală Universitară „Iuliu Haţieganu”, Cluj-Napoca, 2002
3. MĂRCULESCU ANCA – Teză de doctorat: Studiu privind evoluţia fenomenului de antibiorezistenţă şi posibilitatea diminuării acestuia prin asocierea de antibiotice, pe baza relaţiilor de sinergism, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, 2007
4. NCCLS (1999) – Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, M31-A, vol.19, No. 11;
5. NCCLS (1999) – Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, M31-T, vol.17, No. 11;
6. ONIGA O., BRÎNDUŞA TIPERCIUC – Antibiotice Antibacteriene, Editura Medicală Universitară „Iuliu Haţieganu”, Cluj-Napoca, 2003;
7. RĂPUNTEAN GH., BOLDIZSAR E. – Practicum de Bacteriologie Specială, Ed. AcademicPres, Cluj-Napoca, 2001;
8. RILEY V. THOMAS (1981) – Agar dilution susceptibility of Bacteroides spp. to sulfamethoxazole and trimethoprim: correlation with disk diffusion technique, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 731-735;
9. THACKER H. LEON (2003) – Antibiotic resistance for 2002, Animal Disease Diagnostic Laboratory, 12-13;
10. xxx – The Merck Veterinary Manual. Ninth Edition, Merck&Co., Inc. Whitehouse Station, N.J., USA, 2005;

PROGRAM CADRU PRIVIND UN STUDIU PRELIMINAR PENTRU DETERMINAREA PREVALENŢEI *SALMONELLA* LA GĂINILE OUĂTOARE

FRAMEWORK ON BASELINE STUDY ESTABLISHING SALMONELLA PREVALENCE IN LAYING HENS

MATEI Gabriela Florina[1], VASILESCU Clara [1], POPESCU Cristina Tudorița [2], SEVASTRU Andreea[2], ONȚANU Gh.[1]
[1]IDSA Bucureşti
[2]ANSVSA. Bucureşti
gabriela.matei@idah.ro

Salmoneloses constitute a major risk both for animal health and public health, as zoonoses. With the aim to diminish and remove this risk, taking into account the good results obtained by some Member States (Finland, Sweden and Denmark), the Commission has elaborated the legal base and asked the Member States to draw up and implement baseline studies to establish the prevalence of several Salmonella serovars on mammals and poultry. Based on these studies, the Member States have to lay down and apply specific programmes aiming to reduce the incidence of zoonotic serovars of Salmonella to the acceptable risk level or their removal. This paper defines the framework for a baseline study on the assessment of Salmonella spp incidence in laying hens reared in commercial holdings.

Aspects regarding detection and identification the Salmonella spp, collection of data, their evaluation and reporting, and technical specifications of the study. The monitoring and control programme consists in specific objectives, sampling frame, frequency and status of sampling, sampling protocol, transport and preparation of the samples, detection method, alternative methods and storage of isolated strains, as well as their antimicrobial resistance.

Key words: Salmonella, baseline study, incidence, laying hens

MATERIALE ŞI METODE

Programul cadrul are ca obiectiv determinarea prevalenţei unor salmoneloze zoonotice şi îndeosebi a *Salmonella enteritidis* şi *Salmonella typhimurium*, în efectivele de găini ouătoare din specia *Gallus gallus* crescute pentru producția de ouă de consum, la sfârşitul perioadei de producție, rezultatele urmând a fi utilizate pentru atingerea obiectivelor de la art. 4 al Regulamentului Parlamentului European şi al Consiliului nr. 2160/2003/CE, vizând reducerea prevalenței serovariantelor de salmonele zoonotice.

Durata studiului preliminar pentru determinarea prevalenței serovariantelor de *Salmonella* menționate a fost de 6 luni (octombrie 2007 – martie 2008).

Într-un studiu anterior privind incidența şi distribuția serovariantelor speciei *Salmonella enterica* implicată în patoglogia animalelor s-a arătat că dintr-un total de 3520 tulpini de *Salmonella* spp. izolate în perioada 1996 – 2000, din 39 de județe ale țării, 2817 au provenit de la păsări fiind încadrate în 33 de serovariante.

Prin Programul Național de supraveghere şi control al bolilor la animale şi al zoonozelor, cunoscut sub denumirea generică de „Program Strategic”, procedurile de monitorizare pentru toate efectivele de păsări domestice au condus la obținerea următoarelor date:

a. în anul 2001 au fost examinate bacteriologic 58.735 probe, din care 926 au fost pozitive;
b. în anul 2002 din 52.088 probe examinate bacteriologice 1967 probe au fost pozitive;
c. în anul 2003 au fost examinate bacteriologic 111.424 probe şi din acestea 436 au fost pozitive pentru *Salmonella*;
d. în anul 2004 au fost examinate bacteriologic 75.877 probe, din care 15.216 au fost pozitive pentru *Salmonella*;
e. în anul 2005 din 75.816 probe examinate bacteriologice un număr de 5664 au fost pozitive pentru *Salmonella.*

Incidența diferitelor serovariante de *Salmonella* la păsări în anul 2005 a fost următoarea :

- *Salmonella* Enteritidis - 50,8%
- *Salmonella* Typhimurium - 30,4%

- *Salmonella* Gallinarum - 5,8%
- *Salmonella* Heidelberg – 2,4%
- *Salmonella* Agona – 2,1%
- *Salmonella* Derby – 2,9%
- *Salmonella* Haifa – 2,4%
- *Salmonella* Newport – 2,4%
- *Salmonella* – altele – 0,8%

Episoade de salmoneloze în România în 2005 în efectivele de găini ouătoare

ROMÂNIA	**Tip de efectiv**	**Număr de efective**	**Număr de efective pozitive pentru *Salmonella***
Toate regiunile	Efective în creştere	658	7
Toate regiunile	Efective adulte	988	9
Total		**1646**	**16**

f. în anul 2006 au fost examinate bacteriologic pentru *Salmonella* 95 de unităţi epidemiologice, şi 69 dintre acestea au fost găsite pozitive. Au fost izolate şi identificate 276 tulpini de *Salmonella*:
   - *Salmonella* Enteritidis - 131
   - *Salmonella* Typhimurium – 30
   - *Salmonella* Tennessee – 32
   - *Salmonella* Senftenberg - 23
   - *Salmonella* Gallinarum - 21
   - *Salmonella* Djugu – 12
   - *Salmonella* Concord – 7
   - *Salmonella* Virchow – 6
   - *Salmonella* Saintpaul – 6
   - *Salmonella* Hadar – 4
   - *Salmonella* Kottbus – 1
   - Salmonella Montevideo – 1
   - *Salmonella* Ifantis – 1
   - *Salmonella* Reading – 1

Zona geografică şi unităţile epidemiologice

Programul cadru acoperă întregul teritoriu naţional, şi anume cele 39 de judeţe în care sunt localizate unităţile comerciale de găini ouătoare.

Autoritatea Naţională Sanitară Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor are sarcina de a supraveghea şi coordona departamentele responsabile pentru implementarea programului: cele 42 de direcţii sanitare veterinare şi pentru siguranţa alimentelor judeţene împreună cu laboratoarele sanitare veterinare şi pentru siguranţa alimentelor judeţene, a Laboratorulu Naţional de Referinţă pentru *Salmonelozele* Animalelor, din cadrul Institutului de Diagnostic şi Sănătate Animală şi a Laboratorului Naţional de Referinţă pentru *Salmonella* din Furaje şi Alimente de Origine Animală, din cadrul Institutului de Igienă şi Sănătate Publică Veterinară.

În ceea ce priveşte **cadrul de prelevare** pentru schema de testare necesară pentru determinarea prevalenţei unor serotipuri zoonotice de *Salmonella* în efectivele de găini ouătoare, la sfârşitul perioadei de producţie, este următorul (7, 8):

a. prelevarea de probe în scopul realizării studiului începând cu 1 octombrie 2007, în exploataţii cuprinzând cel puţin 1.000 de găini ouătoare, dar atunci când se consideră necesar, cu prelevare de probe şi din exploataţii mai mici, preferabil cele având mai mult de 350 de găini ouătoare adulte;
b. în fiecare exploataţie selectată, prelevarea probelor vizează efectivul de găini ouătoare adulte cu vârsta corespunzătoare;
c. prelevarea probelor de către personal competent sau sub supravegherea autorităţii din structurile veterinare cărora le este delegată această responsabilitate;

d. pentru România s-a stabilit că trebuie prelevate probe din cel puţin 172 de exploataţii cu precizarea că dacă există mai puţin de 172 de exploataţii, vor fi prelevate probe din toate exploataţiile existente. În toate cazurile, prioritate pentru prelevarea de probe vor avea exploataţiile cu mai mult de 1.000 de găini ouătoare adulte.
e. prelevarea de probe se adresează găinilor ouătoare aflate la sfârşitul perioadei de ouat, într-o perioadă de maximum 9 săptămâni înainte de depopulare.
f. acest principiu nu se aplică în cazul efectivelor mici de păsări ouătoare de vârste diferite.
g. pentru derularea acestui studiu s-a elaborat un sistem de prelevare implicând deplasări în exploataţii la momentele corespunzătoare.
h. din cadrul fiecărei exploataţii se supune prelevării de probe numai un lot de găini ouătoare.
i. în cazul prezenţei unor loturi de vârste diferite în perioada de 9 săptămâni înainte de depopulare, prelevarea de probe s-a realizat de la găinile cu vârsta ce mai mare.
j. în cazul mai multor grupe de păsări de vârste diferite, cazate într-un singur adăpost, prelevarea de probe s-a realizat de la păsările cu vârsta cea mai mare.
k. selectarea exploataţiilor trebuie să ţină cont de riscul ca unele loturi selecţionate iniţial să nu poată face obiectul prelevării de probe datorită expedierii mai devreme a acestora pentru tăiere şi de aceea numărul loturilor supuse investigaţiei trebuie să fie uşor mai mare decât cel stabilit ca ţintă.
l. pe cât posibl, prelevările de probe trebuie să realizeze în baza unei distribuţii uniforme de-a lungul celor patru sezoane ale unui an.

Specificaţiile tehnice vizând studiul preliminar asupra incidenţei salmonelelor zoonotice (în deosebi *Salmonella* Enteritidis şi *Salmonella* Typhimurium) (7, 8).

Numărul probelor corespunzătoare loturilor selectate

Prelevarea probelor se realizează conform prevederilor legislaţiei comunitare pe stuidul Salmonelozelor la găini ouătoare.

Numărul de probe care se recoltează dintr-o exploataţie de găini ouătoare trebuie să fie astfel calculat încât să asigure următoarele (7, 8, 9):

- un nivel de prevalenţă de 20%
- un nivel de confidenţă asteptat de 95%
- o acuratete de 3%

În acest sens populaţia de găini ouătoare din ţara noastră se evaluează în baza principiului stratificării, ţinând seama de mărimea exploataţiei (numărul de păsări ouătoare):

1.000 – 2.999	3.000 – 4.999	5.000 – 9.999	10.000 – 29.999	> 30.000

Astfel de la o exploataţie cu 1000 de găini ouătoare a fost examinat un eşantion reprezentativ format din 15 probe pentru o prevalenţă de 20% şi o confidenţă de 95%.

Sistemul de prelevare de probe

În vederea realizării unei sensibilităţi maxime a sistemului de prelevare, probele se constituite atât din fecale, cât şi din mediul ambient al păsărilor (7, 8).

În funcţie de tipul de producţie, tipul facilităţilor, trebuie să fie respectate următoarele prevederi.

Se prelevează 7 probe comasate din fiecare exploataţie, după cum urmează:

- de la efectivele găini ouătoare crescute în baterii:
  - 5 probe de amestec natural de fecale, prelevate din benzile ductoare sau din fosele pentru fecale, în funcţie de sistemul de boxe;
  - fiecare din aceste 5 probe prelevate din exploataţie trebuie să totalizeze o greutate de aproximativ 200 – 300g;
  - 2 probe de praf de pe boxe prelevat prin suspendare în apă (2 x 250 ml);
- din adăposturi cu creştere liberă la pardoseală
  - 5 perechi de tampoane de pe încălţăminte a de protecţie (cizme, galoşi); o pereche = o probă comasată;

- o probă de praf de pe conveerul de transport al ouălor, prelevată într-un recipient cu apă (250 ml);

Prevederi privind transportul şi procesarea primară a probelor pentru studiul preliminar

Eşantioanele se trimit prin poşta rapidă sau prin curier la laboratoarele menţionate la articolul 11 din Regulamentul (CE) nr. 2160/2003, în ziua prelevării. La laborator, eşantioanele trebuie păstrate refrigerate până la analiza lor care trbuie efectuată în următoarele 48 de ore de la primirea acestora (7, 8).

Identificarea serotipurilor zoonotice de Salmonella la găini ouătoare adulte şi stocarea acestora pentru studiul preliminar:

Detecţia se realizează la LSV teritoriale desemnate iar tipizarea tulpinilor izolate la Laboratorul Naţional de Referinţă pentru Salmonelozele Animalelor. Lucrările se execută conform cerinţelor ISO 6579/2000 – Microbiology of food and feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Samonella* spp şi în conformitate cu metoda recomandată de către Laboratorul Comunitar de Referinţă pentru *Salmonella* (8, 11).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În cadrul programului, Laboratorul Naţional de Referinţă pentru Salmonelozele Animalelor are următoarele atribuţii (8, 9, 10):

a. colaborarea cu Laboratorul Comunitar de Referinţă pentru Salmoneloze - Bitlhoven, Olanda;
b. coordonarea tehnică a activităţii laboratoarelor responsabile pentru examenul bacteriologic al probelor, în conformitate cu articolele 4, 5, şi 7 din Directiva Parlamentului European şi a Consiliului 2003/99/CE pentru monitorizarea zoonozelor şi agenţilor zoonotici;
c. coordonare activităţii laboratoarelor responsabile pentru analiza probelor, în conformitate cu articolul 12 (1) al, Regulamentul Parlamentului European şi al Consiliului (CE) 2.160/2003 privind combaterea salmonelei şi a altor agenţi zoonotici specifici;
d. organizarea de teste comparative între laboratoarele la care fac referire punctele b) şi c) şi gestionează corespunzător a rezultatelor acestora;
e. transmiterea către autoritatea competentă şi către laboratoarele la care s-a făcut referire la punctele b) şi c), informaţiile care sunt furnizate de către Laboratorul Comunitar de Referinţă;
f. furnizarea de asistenţă ştiinţifică şi tehnică Autorităţii Naţionale Sanitare Veterinare şi pentru Siguranţa Alimentelor în domeniul de competenţă al acestuia;
g. monitorizarea evoluţiei epidemiologice a salmonelozelor.

În anul 2007, corespunzător perioadei 1.01.2007 – 31.12.2007, rezultatele furnizate de Laboratorul Naţional de Referinţă pentru Salmoneloze, sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Nr. Crt.	Judeţul	Felul probei	Nr. tulpini	Serovarianta
1.	**Vâlcea**	Pui carne	2	*S.* Glostrup
		Pui carne	8	*S.* Hadar
		Pui carne	3	*S.* Hadar
2.	**Alba**	Fecale păsări	5	*S.* Virchow
3.	**Constanţa**	Fecale găini	1	*S.* Nigeria
		Fecale găini	1	*S.* Derby
4.	**Prahova**	Ou embrionat	1	*S.* Typhimurium liz 99
		Ou embrionat	1	*S.* Typhimurium liz 99
		Ou embrionat	1	*S.* Typhimurium liz 99
5.	**Buzău**	Embrion mort	6	*S.* Gallinarum liz 57
		Embrion mort	6	*S.* Enteritidis
		Pui carne	1	*S.* Typhimurium liz 85
		Dejecţii pui	1	*S.* Enteritidis
		Boboc gâscă	1	*S.* Typhimurium nteip.

Nr. Crt.	Judeţul	Felul probei	Nr. tulpini	Serovarianta
		Gâscă	2	*S.* Enteritidis
		Gâscă	1	*S.* Kottbus
		Raţă	1	*S.* Enteritidis
		Raţă	1	*S.* Typhimurium liz 85
		Boboc raţă	5	*S.* Enteritidis
		Boboc raţă	1	*S.* Kottbus
		Boboc raţă	1	*S.* Kottbus
		Embrion mort	1	*S.* Enteritidis
		Embrion mort	1	*S.* Enteritidis
		Boboc raţă	4	*S.* Kottbus
		Boboc raţă	7	*S.* Enteritidis
		Boboc raţă	1	*S.* Kottbus
		Boboc raţă	1	*S.* Typhimurium liz 85
		Embrion raţă	1	*S.* Typhimurium nteip.
		Embrion raţă	1	*S.* Typhimurium liz 85
		Embrion raţă	1	*S.* Saintpaul
		Embrion raţă	1	*S.* Enteritidis
		Embrion găină	2	*S.* Enteritidis
		Embrion găină	2	*S.* Typhimurium liz 85
		Dejecţii pui import	1	*S.* Isangi
		Meconiu	2	*S.* Livingstone
		Raţă	4	*S.* Typhimurium atipic
		Pui carne	2	*S.* Enteritidis
		Pui găină	1	*S.* Enteritidis
6.	**Brăila**	Fecale păsări	5	*S.* Djugu
		Coji ouă	1	*S.* Virchow
		Embrion găină	1	*S.* Djugu
		Puicuţe 1 zi	5	*S.* Djugu
		Fecale păsări	15	*S.* Typhimurium 92
		Fecale păsări	1	*S.* Montevideo
		Fecale păsări	4	*S.* Heidelberg
		Fecale păsări	1	*S.* Namibia
		Fecale păsări	1	*S.* Mapo
		Pui – 2 săptămâni	1	*S.* Djugu
		Pui – 2 săptămâni	1	*S.* Senftenberg
		Puicuţe înlocuire	1	*S.* Djugu
7.	**Dâmboviţa**	Pui neviabil	2	*S.* Senftenberg
		Pui neviabil	1	*S.* Tennessee
		Pui carne	3	*S.* Tennessee
		Pui carne	3	*S.* Virchow
		Puf	1	*S.* Enteritidis
		Meconiu	1	*S.* Enteritidis
		Embrion	1	*S.* Tennessee
		Găină	1	*S.* Tennessee
		Fecale găină	1	*S.* Virchow
		Fecale găină	1	*S.* Tennessee
		Găină	2	*S.* Enteritidis
		Păun	1	*S.* Typhimurium
		Găină	1	*S.* Typhimurium atipic
		Găină	1	*S.* Typhimurium atipic
		Embrion	1	*S.* Give
		Embrion	1	*S.* Give
		Embrion	1	*S.* Give
		Pui neviabil	1	*S.* Tennessee
		Pui neviabil	1	*S.* Tennessee
		Pui carne	2	*S.* Tennessee
		Pui carne	4	*S.* Virchow
		Pui carne	4	*S.* Enteritidis
		Pui carne	1	*S.* Virchow

Nr. Crt.	Judeţul	Felul probei	Nr. tulpini	Serovarianta
		Tineret 84 zile	1	*S.* Give
		Fecale	1	*S.* Westhampton
		Fecale găină	3	S. Senftenberg
		Fecale găină	1	S. Give
		Fecale găină	1	S. Tennessee
		Pui carne	1	S. Tennessee
		Pui carne	2	S. Virchow
		Pui carne	1	S. Enteritidis
		struţ	1	S. Enteritidis
		Pui carne	1	S. Montevideo
8.	**Timiş**	porumbel	1	S. Typhimurium lizotip 193
	TOTAL	**Tulpini**	**169**	

Pentru perioada 1 ianuarie – 25 martie 2008 rezultatele examinelor furnizate de Laboratorul Naţional de Referinţă pentru Salmoneloze, sunt prezentate în tabelul ce urmează:

Nr. Crt.	Judeţul	Felul probei	Nr. tulpini	Serovarianta
1.	**Vâlcea**	pui carne	3	S. Mapo
2.	**Buzău**	embrion mort	8	S. Enteritidis
		pui	3	S. Enteritidis
3.	**Brăila**	vitelus	3	S. Inganda
		vitelus	1	S. Djugu
		vitelus	18	Citrobacter youngae
		coji	1	S. Heidelberg
		fazan	1	S. Heidelberg
4.	**Dâmboviţa**	Pui carne	1	S. Enteritidis
		Pui carne	2	S. Senftenberg
		Pui carne	1	S. Virchow
		Pui carne	3	S. Virchow
		fecale	1	S. Give
		fecale	1	S. Tennessee
		găină	1	S. Heidelberg
		găină	2	S. Enteritidis
5.	**Timiş**	porumbel	1	S. Typhimurium
6.	**Prahova**	fazan	2	S. Heidelberg
7.	**Giurgiu**	pui	6	S. Virchow
		pui	1	S. Virchow
		pui	8	S. Virchow
		fecale	3	S. Virchow
8.	**Dolj**	porumbel	1	S. Fyris
	TOTAL	**TULPINI**	**72**	

Pe lângă rezultatele obţinute este necesar să se ţină cont şi de instrucţiunile relevante pentru bunele practici de creştere a animalelor şi alte instrucţiuni definind cel puţin:

- managementul igienei în ferme;
- măsuri pentru prevenirea introducerii de infecţii prin animale, furaje, apă potabilă, lucrători în ferme;
- igiena transportului animalelor la şi de la ferme.

Conform Ordinului preşedintelui Autorităţii Naţionale Sanitare Veterinare şi pentru Siguranţa Alimentelor nr. 147/2006 şi Ordinului preşedintelui Autorităţii Naţionale Sanitare Veterinare şi pentru Siguranţa Alimentelor nr. 26/2005, exploataţiile comerciale de păsări trebuie să fie aprobate numai dacă sunt îndeplinite următoarele *condiţii de biosecuritate*:

- efectivele trebuie să fie ţinute în condiţii adecvate de cazare, în clădiri separate;
- separare totală prin garduri pentru a evita accesul animalelor şi oamenilor;
- interzicerea accesului persoanelor neautorizate;

- măsuri de protecţie împotriva accesului păsărilor sălbatice;
- barierele igienice incluzând dezinfectoare trebuie să fie instalate la toate intrările/ieşirile exploataţiei şi a diferitelor unităţi.
- fiecare unitate trebuie sa fie echipată cu spălător de mâini şi facilitaţi de igiena personală, facilitaţi pentru dezinfecţia echipamentului de protecţie;
- personalul şi persoanele autorizate care intră în exploataţie trebuie să poarte echipament de protecţie inclusiv încălţăminte de protecţie;
- trebuie urmată o politică "totul plin, totul gol" în fiecare exploataţie comercială;
- gunoiul, deşeurile şi păsările moarte trebuie să fie colectate regulat, depozitate în containere corespunzătoare urmând a fi tratate astfel încât să se evite diseminare agenţilor patogeni;
- este obligatorie angajarea numai de personal calificat;
- instituirea unei perioade de carantină pentru cel puţin 30 zile şi chiar pentru o perioadă mai lungă în cazurile suspecte;
- facilităţile necesare pentru carantină trebuie să fie reprezentate de o clădire separată operaţional şi de alte clădiri ale exploataţiei;
- trebuie să fie disponibile echipamentele pentru spălare, dezinfecţie, dezinsecţie;
- substanţele dezinfectante folosite trebuie să fie aprobate pentru acest scop de către autoritatea competentă;
- controlul rozătoarelor este una din cele mai importante măsuri privind controlul;
- direcţiile sanitare veterinare şi pentru siguranţa alimentelor judeţene şi a municipiului Bucureşti verifică eficacitatea curăţeniei, dezinfecţiei şi deratizării;
- trebuie executată curăţarea şi decontaminarea echipamentului pentru transport, cuşti sau lăzi folosite la pentru transport;
- echipamentul pentru transportul în interiorul exploataţiei nu trebuie să fie acelaşi cu echipamentul folosit la transportul pasărilor la abator sau pentru alte scopuri;
- personalului nu trebuie să lucreze în altă exploataţie comercială şi nu trebuie să crească pasări în gospodăriile proprii;
- alte măsurile trebuie să fie în conformitate cu „Programul acţiunilor de supraveghere, prevenire şi control a bolilor la animale şi a zoonozelor.

CONCLUZII

1. În acord cu obiectivul comunitar, un efectiv de găini ouătoare este considerat pozitiv atunci când s-a detectat prezenţa salmonelelor zoonotice (îndeosebi *Salmonella* Enteritidis şi *Salmonella* Typhimurium) - altele decât tulpinile vaccinale, în una sau mai multe probe prelevate din efectivul de găini ouătoare. Efectivele de găini ouătoare pozitive se contabilizează o singură dată, indiferent de numărul de probe prelevate şi de operaţiunile de testare efectuate şi sunt raportate numai în primul an al depistării.
2. Autoritatea Naţională Sanitară Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor este responsabilă pentru pregătirea raportului naţional anual privind monitorizarea salmonelozelor la animale, în aplicarea articolului 9 al Directivei Parlamentului European şi a Consiliului nr. 2003/99/CE, trebuie să colecteze şi să evalueze rezultatele de detectare a Salmonella obţinute în Laboratorul Naţional de Referinţă pentru Salmonelozele Animalelor, în aplicarea articolului 3 al Deciziei Comisiei 2004/665/CE pe baza cadrului de prelevare prezentat la care s-a referit articolul 2 al deciziei menţionate, şi trebuie să raporteze evaluarea proprie către Comisia Europeană.
3. Punerea în practică a acestui „Program cadru privind studiu preliminar pentru determinarea prevalenţei *Salmonella* la găini ouătoare" poate conduce la o supraveghere adecvată a efectivelor investigate şi reducerea incidenţei serovariantelor zoonotice de *Salmonella,* până la un nivel de risc acceptabil sau excluderii acestora.

BIBLIOGRAFIE

1. Le Minor L. şi col. – *Enterobacteries*, in Bacteriologie Medicale Ed. Le Minor L., Veron M., Flammarion – Med. Sci., Paris, 1990, Ch. 17p. 389 – 472,
2. Neguţ M. – *Genul Salmonella,* în *Bacteriologie Medicală* vol. II, sub. Red. Bâlbâe V., Pozsgi N., Ed. Med., Bucureşti, 1984, P. 285 – 315,
3. Verdeş N., - *Boli produse de germeni din genul Salmonella,* Cap. 2, 2001, în Mânzat R.M. – *Boli infecţioase ale animalelor – bacterioze* – Boli produse de germenii din genul Salmonella, Ed. Brumar, 2001, p. 26 -64,
4. W.H.O. (1995), *Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe*, sixth report 1990-1992 FAO/WHO, Centre for Research and Trening in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin,
5. W.H.O. – *Food Safety and Foodborne Disease* – World Health Statistics Quaterly, 1997, 50.1/2,
6. W.H.O – *Salmonellosis Control: The role of Animal and Product Hygiene*, Technical Report, Series 774, WHO – Geneva, 1988,
7. Decizia Comisiei 2004/665/CE din 22 septembrie 2004 privind un studiu preliminar pentru prevalenţa Salmonella la găinile ouătoare, JO, L 303, 30.09.2004, p.30
8. Regulamentul Comisiei (CE) 1168/2006 din 31 iulie 2006 de punere în aplicare a Regulamentului Parlamentului European şi al Consiliului (CE) 2160/2003 cu privire la stabilirea unui obiectiv comunitar de reducerea prevalenţei anumitor serotipuri de Salmonella la găinile ouătoare şi de modificare a Regulamentului (CE) 1003/2005, JO, L 211, 1.08.2006, p. 4
9. Directiva Consiliului şi Parlamentului European nr. 2003/99/CE privind monitorizarea zoonozelor şi agenţilor zoonotici, de modificare a Deciziei 90/424/CEE a Consiliului şi de abrogare a Directivei 92/117/CEE a Consiliului, JO, L 325, 12.12.2003, p. 31
10. Regulamentul Parlamentului European şi al Consiliului nr. 2160/2003/CE privind controlul Salmonella şi al altor agenţi specifici zoonotici ce produc toxiinfecţii alimentare, JO L 325, 12.12.2003, p.1
11. ISO 6579/2000 – Microbiology of food and feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Sal*. spp International Organization for Standardization, 1 rue de Varembe, Case postale 56CH-1211 Geneva 20, Swithzerland

THE RAPID DIAGNOSIS OF CANINE DISTEMPER USING THE RAPIGEN DISTEMPER AG TEST

MIHALACHI Simona, MUSTEAŢĂ M., ACATRINEI D., TĂNASE Irina-Oana, PERIANU T.
FMV Iaşi
diplush@yahoo.com

In an attempt to establish a quick and correct diagnosis for Canine Distemper(CD), associating the clinical and respiratory syndromes to the results of the immunochromatographic test (RapiGen® Distemper Ag Test), 16 spontaneous cases with respiratory and neurological involvment were examined and tested.Only four dogs were vaccinated against CD. Five dogs showed extraneural signs only, five presented neural signs only, and the rest showed both neural and extraneural symptoms. Neural symptoms consisted in cervical and bilateral thoracic limb myoclonus, truncal and pelvic limb myoclonus, disorientation, ataxia, intention tremor, psychomotor seizures. Extraneural symptoms included mucopurulent conjunctivitis, mucopurulent rhinitis, digital hyperkeratosis and fever. The diagnosis of CD was confirmed by the immunochromatographic test (detection of CD viral antigen) in 9 dogs.

Key words: Canine Distemper, rapid diagnostis, CDV

Boala Carré este o boală infecto-contagioasă, produsă de un *Morbillivirus* (familia *Paramyxoviridae*), foarte asemănător din punct de vedere antigenic cu virusul pojarului, virusul pestei bovine şi virusul pestei rumegătoarelor mici. Boala afectează membrii familiei *Canidae*, *Procyonidae* şi *Mustelidae*, caracterizându-se prin sindrom febril, tulburări digestive, pulmonare, cutanate şi nervoase de intensităţi variabile şi un procent crescut de morbiditate şi mortalitate.

Deoarece diagnosticul clinic este tardiv instituirii tratamentului medicamentos, ne-am propus utilizarea testului Rapigen pentru detecţia antigenului într-un stadiu precoce al infecţiei.

MATERIAL ŞI METODE

Investigaţiile au fost efectuate pe un număr de 16 de câini (11 masculi şi 6 femele), 6 (37,5%) de rasă pură, 5 (31,25%) metişi şi 5 (31,25%) de rasă comună, cu vârste cuprinse între 2 luni şi 9 ani (< 1 an: 4, 1-5 ani: 9, 5-9 ani: 3), cu manifestări respiratorii şi/sau nervoase. Din cei 16 câini, 4 (25%) au fost imunizaţi contra bolii Carré, iar restul 12 (75%) n-au fost vaccinaţi.

De la animalele examinate clinic s-au recoltat probe (sânge, jetaj, secreţii conjunctivale, lichid cefalo-rahidian) pentru examene paraclinice (examen hematologic, examen virusologic), în funcţie de forma şi faza evolutivă a bolii. Sângele s-a recoltat din vena jugulară, safenă sau cefalică. Lichidul cefalo-rahidian a fost recoltat, sub anestezie generală, din cisterna cerebro-medulară şi examinat din punct de vedere citologic şi al proteinei totale.

Pentru evidenţierea precoce a antigenului s-a utilizat testul **Rapigen Canine Distemper Ag.** Acesta se bazează pe un examen imunocromatografic al antigenului CDV în fluidele fiziologice canine (plasmă, ser, secreţii conjunctivale, sânge integral, LCR) şi permite o evidenţiere rapidă (5-10 minute) a antigenului CDV şi, implicit, diagnosticul infecţiei.

Principiul testului se bazează pe faptul că un anticorp specific pentru CDV este conjugat cu particule de aur şi un alt anticorp specific este imobilizat sub formă de bandă pe o membrană de nitroceluloză. Dacă CDV este prezent, anticorpul conjugat se fixează şi formează un complex antigen-anticorp. În timp ce parcurge întreaga membrană, complexul (Ag-Ac) este capturat de anticorpul imobilizat pe linia testului (T), producând o bandă de culoare roşie-purpurie. Un alt conjugat cu aur este captat de anticorpul imobilizat pe linia de control (C) a membranei.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma examenului clinic, la 5 (31,25%) câini s-au observat numai simptome nervoase, la alţi 5 (31,25%) numai sindrom respirator, iar la restul 6 (37,5%), ambele forme de evoluţie. La 1 (6,25%) caz s-a constatat hipercheratoză digitală (Tabel nr.1).

Tabel nr.1

Rezultatele utilizării testului Rapigen

Nr.crt.	Rasă	Sex	Vârstă	Vaccinare anti-CDV	Semne clinice	Proba de testat	Test Rapigen
1	Metis de Ciobănesc German	M	4 ani	Nu	hipertermie, catar purulent, jetaj muco-purulent, mioclonii ale gâtului şi membrelor, ataxie, astazie,dezorientare, crize de furie	sânge	+
2	Ciobănesc Carpatin	M	1,5 ani	Nu	hipertermie (40°C), jetaj muco-purulent, catar purulent, mioclonii la toate membrele, ataxie, astazie	sânge	+
3	Rottweiler	M	6 ani	Nu	catar seros	sânge	-
4	Metis de Pekinez	M	1,5 ani	Nu	crize epileptiforme	sânge	-
5	Rasă comună	M	6 luni	Da	hipertermie (39,2°C), catar seros, jetaj sero-mucos	secreţie lacrimală	-
6	Metis de Pekinez	M	2 ani	Nu	catar seros, dispnee	sânge	+
7	Metis de Caniche	M	2 ani	Nu	mioclonii ale capului şi membrelor	LCR	+
8	Rasă comună	M	2 luni	Nu	catar purulent, mioclonii la membrele posterioare	LCR	+
9	Rasă comună	F	2 ani	Nu	jetaj seros	sânge	-
10	Rasă comună	F	2 ani	Nu	hipertermie (40,2°C), tuse seacă	sânge	-
11	Bichon Maltez	F	1 an	Da	hipertermie (39,7°C), tremurături ale capului, ataxie	LCR	-
12	Ciobănesc German	M	8 ani	Nu	hipertermie (40,2°C), jetaj muco-purulent, crize epileptiforme frecvente, astazie, ataxie	LCR	+
13	Shar Pei	M	8 luni	Da	hipertermie (40,2°C), catar muco-purulent, jetaj muco-purulent, mioclonii de slabă intensitate la musculatura abdominală şi membrul drept anterior, hipercheratoză digitală	jetaj	+
14	Amstaff	F	9 ani	Da	paralizia nervului facial	sânge	-
15	Rasă comună	M	9 luni	Nu	hipertermie (39,6°C), jetaj muco-purulent, astazie, ataxie, mioclonii la membrele posterioare	jetaj	+
16	Metis de Ciobănesc German	F	3 ani	Nu	hipertermie (40°C), mioclonii la membrele anterioare şi la nivelul trunchiului, astazie	LCR	+

M, mascul; F, femelă; LCR, lichid cefalo-rahidian

Sindromul respirator a constat în febră, jetaj mucopurulent, tuse, strănut, dispnee, raluri umede. La cazurile cu semne respiratorii s-a constatat conjuctivită muco-purulentă.

Sindromul nervos grupează simptome ca: mioclonii localizate la nivelul capului, musculaturii abdominale, membrelor anterioare sau posterioare, ataxie, astazie, crize epileptiforme, dezorientare, dezechilibru, crize de furie, tremur intenţional, reflexivitate scăzută sau abolită.

Din cei 16 câini testaţi, 9 (56,25%) au fost pozitivi (Fig. 1), din care 6 (37,5%) cu ambele forme de evoluţie, 1 (6,25%) cu forma respiratorie şi 2 (12,5%) cu forma nervoasă, iar 7 (43,75%) au fost negativi (Fig. 2).

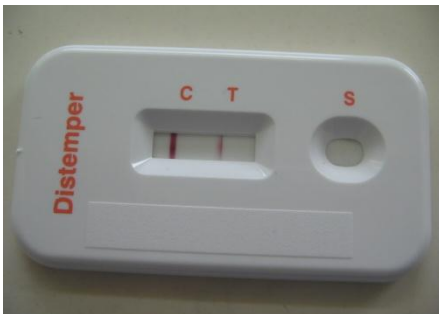


Fig. nr.1. Reacţie pozitivă la testul Rapigen

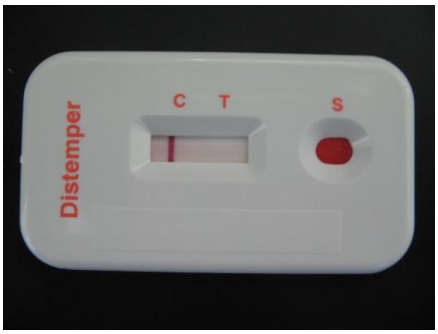


Fig. nr.2. Reacţie negativă la testul Rapigen

Examenul hematologic a evidenţiat leucocitoză cu neutrofilie şi deviere stânga neutrofilică, eozinopenie, limfopenie, monocitoză. La examenul LCR s-a constatat proteinorahie (>30mg/dl) crescută şi pleiocitoză (26,1/µl) la cazurile cu manifestări nervoase.

CONCLUZII

Din utilizarea testului Rapigen în evidenţierea precoce a antigenului CDV pe un număr de 16 câini cu diferite manifestări clinice de boală Carré, s-au desprins următoarele concluzii:

1. Din cei 16 câini testaţi, 9 (56,25%) au fost pozitivi, iar 7 (43,75%) au fost negativi.
2. Din cele 9 animale cu reacţie pozitivă, 6 (37,5%) prezentau ambele forme de evoluţie, 1 (6,25%) forma respiratorie şi 2 (12,5%) forma nervoasă.
3. Examenul hematologic a evidenţiat leucocitoză cu neutrofilie şi deviere stânga neutrofilică, eozinopenie, limfopenie, monocitoză.
4. La examenul LCR s-a constatat proteinorahie (>30mg/dl) crescută şi pleiocitoză (26,1/µl) la cazurile cu manifestări nervoase.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **AMUDE A.M., ALFIERI A.A., ALFIERI A.F.,** (2007), Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease, Research in Veterinary Science 82 (2007) 416-422
2. **AN D.J., KIM T.Y., SONG D.S., KANG B.K., PARK B.K.,** (2007), An immunochromatograpy assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper, Journal of Virological Methods xxx (2007), xxx-xxx
3. **BRAUND K.G.** (2001), Clinical Neurology in Small Animals – Localization, Diagnosis and Treatment,Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca, New Zork, USA
4. **KOUTINAS A.F., POLIZOPOULU Z.S., BAUMGAERTNER W., LEKKAS S., KONTOS V.** (2002), Relation of Clinical Signs to Pathological Changes in 19 Cases of Canine Distemper Encephalomyelitis, J. Comp. Path., Vol.126, 47-56
5. **PERIANU T.**, (2005), Boli Infecţioase ale animalelor. Viroze, Vol II, Editura Universitas XXI, Iaşi
6. **THOMAS WILLIAM B.** (1998), Inflamatory Diseases of the Central Nervous System in Dogs, Clinical Techniques in Small Animal Practice, Vol 13, No 3 (August), pp 167-178

ASSESSMENT OF MICROBIAL DECONTAMINATION EFFICIENCY BY FINK-ANTISEPT A PRODUCTS

MITRĂNESCU Elena [1], TAPALOAGA Dana [1], FURNARIS F. [1], TUDOR L. [1], ROTARU Elena [1], SIMION Violeta [2]
[1] FMV Bucureşti
[2]FMV "Spiru Haret" Bucureşti
mitranescuelena@gmail.com

The decontamination by Fink –Antisept A product was carried out in three checkpoints: Surgery Clinics of Veterinary Medicine Faculty Bucharest, a meat processing unit (S.C. Valcom 50 SRL) and a fish unit (RFD Jurilovca). In each checkpoint, this product was applied on different clean surfaces (plastic, stainless steel and glass tables, faience walls, floors, plastic recipients, stainless steel plates) in an amount of 50 ml/m^2, during 10 minutes.

Before and after product's applying there were collected sanitation samples and there were carried out the following tests: total number of germs (TNG), total number of fungi (TNF), Staphylococcus test (ST) and the modified coliform bacilli test (MCBT).

The mediums for culture, incubation times and temperatures are the ones specific for every test.

Following the researches we can conclude:

Fink - Anitisept A product has a very good microbicid action by applying 50 ml product/m^2 after a contact time of 10 minutes;

After using this product it is not necessary to rinse the surfaces;

Fink – Antisept A product is efficient on all kind of surfaces (plastic, stainless steel, faiance) in hospitals, food industry, trading and processing spaces for fish, meat and milk;

The sanitation tests (TNG, TNF, ST, CMBT) carried out after the product's applying were negative in all the objectives and samples;

Fink – Antisept A product has a high killing activity, but low toxicity for human being and environment.

Microbial decontamination is represented by all the methods and ways used for total or partial destroy (depending its aim) of the microorganisms, having in view the maintaining of the animal health and production status and the obtaining of salubrious animal origin food products.

To be efficient, the microbiologic decontamination activity has to be developed upon a programme which must have a series of principles regarding the strict upkeeping of all the decontamination stages (mechanic, hydro-mechanic and chemical), the adequate choosing of the microbicid substances, the monitoring of microbial decontamination stages (organoleptic, fast tests and laboratory ones), the temperature of applying, the correct calculation of the used substances concentration.

The present paper assessed the microbial decontamination efficiency by Fink- Antisept A product, a non-coloured liquid, with a smell of alcohol and with neutral pH, containing organic solvents 70% and 30% water.

This product, by its composition, acts by albumine coagulation on different surfaces. It is used by spraying, rinsing is not necessary and it is biodegradable.

MATERIALS AND METHODS

Fink – Antisept A product was applied by simple by spraying on different dry and clean surfaces in Surgery Clinics of Faculty of Veterinary Medicine Bucharest: plastic tables for surgical interventions, stainless steel trays for surgical tools, glass surgical tools tables and floor.

Also, this product was used on faience walls and tables, plastic boxes and floor in a food processing unit (SC Valcom 50 SRL) and on stainless steel tables used for fish selling, floor and fish basin in a fish market unit.

Before and after the product applying there were collected sanitation tests. The samples were neutralized for 5 minutes in 80, 3 % Tween solution. They were sampled immediately after collecting, applying the standard for the following tests: total number of germs (TNG), total number of fungi (TNF), Staphylococcus test (ST), modified coliform bacilli test (MCBT). The culture mediums, temperature and the incubation times are specific to each test: for TNG - agar with 24 hours

incubation at 37°C; for TNF - Sabouraud medium with 3-5 days incubation at room temperature, ST – Chapman with 48 hours incubation at 37°C and for MCBT - Kessler medium with 47 hours incubation at 37°C.

The results' interpretation was made in accordance with the stipulated hygienic norms.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The results of microbial decontamination efficiency following the Fink- Antisept A product using in the Surgery Clinics of the Veterinary Medicine Faculty Bucharest are shown in table number 1.

This product was applied by spraying on dry and clean surfaces (plastic table for surgery, stainless steel tray for surgery tools, glass table and gritstone floor) in the Surgery Clinics.

Before its applying there were collected sanitation samples. After 10 minutes from the contact of decontamination agent with the surface there were collected double samples. The sanitation samples were neutralized for 5 minutes in 80, 3 % Tween solution. There were immediately carried out the tests: TNG, TNF, ST, MCBT.

Analyzing the data in the table it is noticed that from the glass table and floor samples harvested before Fink Antisept A product applying there were developed colonies. After its applying all the samples were negative, except the TNG for the floor – in that case there were developed 2 colonies, bordering within the admitted limits (under 50 colonies).

Table no. 1 Sanitation tests' results before and after Fink-Antisept A product applying in Surgery Clinics of Faculty of Veterinary Medicine Bucharest

No.	Sampling points	Carried out tests							
		TNG		TNF		ST		MCBT	
		BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
	Plastic table for surgical intervention	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stainless steel trays for tools	0	0	0	0	0	0	0	0
	Glass tools table	5	0	0	0	1	0	0	0
	Floor	125	2	7	0	2	0	4	0

TNG = total number of germs
TNF = total number of fungi
ST = Staphylococcus test
MCBT = modified coliform bacilli test
BF = before decontamination
AF = after decontamination

In table number 2 there are shown the results of sanitation tests sampled before and after Fink-Antisept A product applying in SC Valcom 50 SRL (meat processing unit).

Table no. 2 Sanitation tests' results before and after Fink-Antisept A product applying in SC Valcom 50 SRL

No.	Sampling points	Carried out tests							
		TNG		TNF		ST		MCBT	
		BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
	Faience table	2	0	0	0	0	0	2	0
	Gritstone floor	52	0	0	0	0	0	1	0
	Faience wall	30	0	0	0	0	0	2	0
	Plastic boxes	6	0	0	0	2	0	4	0

Analyzing the data in the table it may notice that regarding TNG test and MCBT before decontamination substance applying, all the samples were positive, but after its applying they were negative.

The sanitation samples collected regarding TNF were negative also before and after the product applying. The Staphylococcus test sample collected from the plastic boxes before Fink -

Antisept A product applying was positive. After its applying all the tests were negative, no matter the sampling point.

The results regarding the decontamination action carried out in RFD Jurilovca (fish trading unit) are drawn in table 3.

Regarding the TNG, all the samples collected before Fink-Antisept A product applying were positive, for TNF the samples from the floor were positive and for MCBT were positive the ones from the stainless steel and floor. After decontamination all the tests were negative.

Overall, the decontamination action with Fink-Antisept A product in the three locations was correct providing that the surfaces be mechanically and hydromechanically well cleaned and dried.

Table no. 3 Sanitation tests' results before and after Fink-Antisept A product applying in RFD Jurilovca SA

No.	Sampling points	Carried out tests							
		TNG		TNF		ST		MCBT	
		BD	AD	BD	AD	BD	AD	BD	AD
	Stainless table	5	0	0	0	0	0	2	0
	Gritstone floor	28	0	2	0	0	0	2	0
	Basin wall	2	0	0	0	0	0	0	0

CONCLUSIONS

1. Fink - Anitisept A product has a very good microbicide action by applying 50 ml product/m^2 after a contact time of 10 minutes;
2. After using this product it is not necessary to rinse the surfaces;
3. Fink – Antisept A product is efficient on all kind of surfaces (plastic, stainless steel, faiance) in hospitals, food industry, trading and processing spaces for fish, meat and milk;
4. The sanitation tests (TNG, TNF, ST, CMBT) carried out after the product's applying were negative in all the objectives and samples;
5. Fink – Antisept A product has a high killing activity, but low toxicity for human being and environment.

REFERENCES

1. Asanica V. – Aspecte ecologice in tehnicile de dezinfectie avansata, Buletin Informativ al Societatii Medicilor Veterinari in Patologia Aviara si a Animalelor Mici din Romania 12, 3, 55, 57 – 2001
2. Decun M. – Sanitatie veterinara, Ed. Helicon, Timisoara, 1995
3. Fotheringham J.V.C. – Disinfection of live, Revue Science Technique, OIE, 14,2, 393-401, Imprimerie Douladoudre – Toulouse, 1995
4. Holah J. T. – Disinfection of food production areas, Revue Science Tehnique, OIE, 14, 2, 343-359, Imprimerie Douladoure – Toulouse, 1995
5. Mitranescu Elena – Igiena si tehnica de sanitatie, Ed. MAST, Bucuresti, 2000
6. Teusdea Valer – Igiena veterinara vol II, Ed. Omega Print, Bucuresti, 2005
7. Teusdea Valer – Decontaminarea in industria agroalimentara, Buletin Informativ al Societatii Medicilor Veterinari in Patologia Aviara si a Animalelor Mici din Romania, 13, 1, 7 – 21, 2003
8. *** - Guide pour l'elaboration d'un plan neltoyage et disinfection, Centre Regional d'Innovation et Transfert de Technologies Nauzilly, 1995

LEVURILE GENULUI *MALASSEZIA*: ASPECTE PRIVIND IZOLAREA ŞI PATOGENITATEA LA CÂINE

GENUS MALASSEZIA YEAST: ASPECTS REGARDING ISOLATION AND PATHOGENITY IN DOGS

NADĂŞ G., RĂPUNTEAN Gh., FIŢ N., RĂPUNTEAN S., CHIRILĂ F.
CUC Cosmina, CĂLINA Daniela
FMV Cluj-Napoca
gnadas@usamvcluj.ro

Sterile swabs were collected from 91 dogs, and a total of 367 microscopic and cultural exams were performed. Two sterile swabs were collected from each body area (external ear channel, perilabial, interdigital and perianal areas), one for the microscopical exam and one for the solid medium sowing. The positive samples for the microscopical exam were 88 (23,97%) of 367, while the negative samples number was 279, representing 76,03%. Regarding the positive samples percentage for each body area, external ear channel was mostly colonized with 34% positive samples, followed by the interdigital (26%), perilabial (19%) and perianal area with 7%. The positive samples for the cultural exam were 95 with a percentage of 25,88%, while the negative samples represented 74,22%, with a number of 272 plates. On body areas, external ear channel was mostly colonized with 36%, followed by the interdigital (31), perilabial (22) and perianal 8% positive samples.

From 109 strains isolated, a number of 106 were represented by M. pachydermatis, while the rest of the species were M. furfur with 2 strains and M. globosa with 1 strain. The pathogenity of the strains isolated from the dogs with otitis and dermatitis was tested using the phospholipase production test. From the total of 47 strains of M. pachydermatis isolated from dogs with otitis and dermatitits tested, 39 (82,97%) were positive and 8 (17,03%) were negative.

Genul *Malassezia* include actualmente 11 specii de levuri, multe dintre ele asociate cu îmbolnaviri ale vertebratelor cu sânge cald. *Malassezia pachydermatis* este o levură lipofilică ce colonizează pielea şi mucoasele câinilor sănătoşi (1,2). In ciuda faptului că aparţine microflorei cutanate normale, este cunoscut că poate să devină patogenă în anumite condiţii (1,3,4,7). Dermatita produsă de *Malassezia*, o dermatoză inflamatorie asociată cu nivele ridicate ale populaţiilor de *M. pachydermatis* pe pielea câinilor, a fost foarte frecvent întâlnită (2,5). Câinele este specia cel mai frecvent afectată, manifestarile clinice constau în otite care pot avea ca agent etiologic fie doar *Malassezia pachydermatis*, fie asocieri ale acesteia cu diverse genuri bacteriene, toate acestea în condiţiile existenţei unor factori favorizanţi si determinanţi (5,6). O altă manifestare clinică este dermatita, cu localizări din cele mai diverse: perilabial, periocular, dorsal, inghinal, axilar, interdigital, abdominal, perianal, fiind semnalată prezenţa levurii şi la nivelul secreţiei glandelor perianale (1,6,7).

Malassezia pachydermatis este singura specie non-lipodependentă dintre cele zece specii cunoscute până în prezent. Se dezvoltă pe mediul Dixon după o incubaţie de 5-7 zile. Creşterea se poate realiza şi pe agar glucozat, şi pe mediul Sabouraud cu adaus de cicloheximidă 0,2% (2,5,7). Coloniile au culoare albă – gălbuie, sunt cremoase, convexe şi uneori prezintă o proeminenţă centrală, diametrul coloniilor este de 5 mm, au suprafaţa lucioasă, consistenţa slabă, greu emulsionabile (2,5,6).

MATERIAL ŞI METODĂ

In cadrul acestei lucrări s-a urmărit efectuarea examenului microscopic pe un număr semnificativ de probe recoltate din patru zone corporale în cazul fiecărui animal. Un alt scop a constat în izolarea şi cultivarea speciilor genului, iar prin efectuarea de însămânţări pe medii de cultură speciale s-a urmărit izolarea primară de tulpini. De asemenea s-au practicat repicări pentru obţinerea tulpinilor în cultură pură, după care s-a procedat la efectuarea de examene pentru diferenţierea speciilor de *Malassezia*. Un aspect de actualitate a fost reprezentat de capacitatea diverselor tulpini izolate de a produce fosfolipaze (enzime cu rol în manifestarea patogenităţii).

Cercetările efectuate s-au desfăşurat în perioada mai 2006 – martie 2008, pe populaţia canină din arealul judeţului Cluj, iar probele au fost constituite din cazuistica Spitalului de Urgenţă Veterinar,

a clinicilor din cadrul Facultăţii de Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, precum şi cea a cabinetelor veterinare de pe raza aceluiaşi municipiu. În intervalul de timp menţionat au fost recoltate probe de la un număr de 91 de câini.

Având în vedere datele din cadrul lucrărilor de specialitate consultate, în cadrul investigaţiilor efectuate, am optat pentru recoltarea probelor din patru zone corporale şi anume: conductul auditiv extern, zona perilabială, interdigitală şi cea perianală. Astfel, pentru investigarea totalului de 91 de câini, au fost efectuate 367 de examene microscopice şi acelaşi număr de însămânţări primare pe medii solide în plăci Petri. Recoltarea probelor s-a făcut cu ajutorul tampoanelor sterile, câte două pentru fiecare zonă corporală, unul pentru examenul microscopic şi celălalt pentru examenul cultural. Pentru o bună investigare a cazurilor, s-a recurs la întocmirea unei fişe de observaţie care să permită înregistrarea tuturor datelor referitoare la pacientul luat în studiu. Examenul microscopic s-a efectuat prin rotirea tamponului pe lamă, uscare, fixare şi coloraţie Gram. Examinarea s-a făcut cu obiectiv de imersie (x1000), raportarea făcându-se la obiectivul de 40 (x4000). Examenul cultural s-a efectuat prin însămânţarea probelor pe mediul Dixon, pe care se dezvoltă toate speciile de *Malassezia*. Probele au fost însămânţate cu ajutorul tamponului de recoltare, urmărind laturile unui patrulater, iar incubarea s-a facut la temperatura de 32ºC timp de 5 zile.

Pentru identificarea speciilor de *Malassezia* s-au efectuat teste biochimice cum ar fi însămânţarea pe mediu Sabouraud, testul asimilării de Tween 20-40-80 şi asimilarea de cremophor-EL. Un element important ce trebuie clarificat în urma izolării tulpinilor de *M. pachydermatis* se referă la precizarea capacităţii patogene a tulpinilor, datorită faptului că tulpinile de *M. pachydermatis* au un caracter comensal.

Patogenitatea tulpinilor este evidenţiată, pe de o parte prin producere de leziuni la nivel cutanat si auricular, iar pe de altă parte prin efectuarea de teste *in vitro* în ceea ce priveşte producţia de fosfolipaze. Doar tulpinile izolate de la indivizi cu leziuni au fost supuse testatării urmărind producţia de fosfolipaze. Tulpinile provenite de la animale sănătoase nu au fost luate în studiu datorită caracterului lor comensal, scopul testării producerii de fosfolipaze fiind acela de a corela prezenţa acestei enzime cu izolarea levurilor şi prezenţa leziunilor la nivel cutanat şi auricular. Un număr total de 47 de tulpini au fost testate prin însămânţarea lor pe plăci cu lecitină (mediu cu ou), utilizând metoda în spot, iar plăcile au fost apoi incubate la 32ºC timp de 14 zile, examinarea fiind făcută zilnic între zilele 7 şi 14 de incubaţie.

REZULTATE

În privinţa examenului microscopic, după efectuarea frotiurilor şi examinare cu obiectiv de imersie, în probele pozitive s-a evidenţiat prezenţa levurilor cu aspect tipic de urmă de pantof, alună americană sau sticlă de Perrier. Trebuie menţionat faptul că numărul de celule levurice identificate la examinarea celor 367 de tampoane a variat de la câteva celule pe întreaga suprafaţă a frotiului, la peste 50 de celule pe câmp microscopic examinat cu obiectivul de imersie (x 1000), raportarea făcându-se, conform datelor din literatură, la examinarea cu obiectivul de 40 (x 400), respectiv înmulţind cu 2,5 numărul de celule identificate pe fiecare câmp microscopic.

Privind rezultatele examenului microscopic şi evidenţierea de celule levurice aparţinând genului *Malassezia*, probele pozitive au fost în număr de 88 cu un procentaj de 23,97% din totalul de 367, numărul probelor negative fiind de 279, adica 76,03%.

Tabel 1. Rezultatele examenului microscopic

Numărul total de probe	Zonele anatomice din care s-au recoltat probele				
	Conductul auditiv extern	Zona interdigitală	Zona perilabială	Zona perianală	Zona abdominală
367	**91**	**91**	**91**	**91**	**3**
Probe pozitive	**34** 37,36%	**26** 28,57%	**19** 20,87%	**7** 7,69%	**2** 66,6%
Probe Negative	**57** 62,64%	**65** 71,43%	**72** 79,13%	**84** 92,31%	**1** 33,3%

Examenul cultural pe mediul Dixon a permis obţinerea de colonii de *Malassezia* cu morfologie tipică, aşa cum se poate observa în următoarele imagini:

Fig. 1 şi 2: Colonii tipice de Malassezia pachydermatis pe mediul Dixon

Au fost însămânţate un număr de 367 de plăci cu agar Dixon, probele pozitive la examenul cultural fiind în număr de 95 cu un procent de 25,88%, în timp ce probele negative au reprezentat 74,22%, adica 272 de plăci pe care nu s-au dezvoltat colonii de *Malassezia*. Următorul tabel prezintă detaliat numărul de probe recoltate din fiecare zonă corporală, probele pozitive şi cele negative, dar şi exprimarea lor procentuală:

Tabel 2. Rezultatele examenului cultural

Numărul total de probe	Zonele anatomice din care s-au recoltat probele				
	Conductul auditiv extern	Zona interdigitală	Zona perilabială	Zona perianală	Zona abdominală
367	**91**	**91**	**91**	**91**	**3**
Probe pozitive	**38** 35,58%	**28** 30,76%	**20** 21,97%	**7** 7,69%	**2** 66,6%
Probe Negative	**53** 64,42%	**63** 69,24%	**71** 78,03%	**84** 92,31%	**1** 33,3%

După izolarea în cultură pură a coloniilor de *Malassezia* pe agar Dixon, un alt obiectiv al cercetărilor l-a constituit identificarea speciilor genului. Această identificare s-a facut prin pasarea tulpinilor izolate pe mediul Sabouraud, etapă care reuşeşte diferenţierea speciei tip, *M. pachydermatis,* de celelalte specii lipodependente. Pe fiecare placă Petri cu agar Sabouraud s-au însămânţat un numar de 4 tulpini de *Malassezia*, iar dezvoltarea acestora pe mediul Sabouraud presupune apartenenţa la specia *M. pachydermatis*.

Din totalul celor 109 tulpini izolate, 106 au fost reprezentate de specia *M. pachydermatis*, restul fiind *M. furfur* (2 tulpini) şi *M. globosa* cu o tulpină.

În privinţa producţiei de fosfolipaze, un număr total de 47 de tulpini de *M. pachydermatis* izolate de la câini cu otită şi dermatită au fost testate prin efectuarea de însămânţări pe plăci cu lecitină (mediu cu ou). Modalitatea de însămânţare a fost cea în spot, iar reacţia pozitivă a fost reprezentată de apariţia unei zone de opacifiere în jurul coloniilor producătoare de fosfolipază. S-a constatat o corelaţie evidentă între producţia de fosfolipaze şi patogenitatea tulpinilor, 39 dintre acestea (82,97%) fiind pozitive la producţia de fosfolipaze, iar 8 (17,03%) negative.

CONCLUZII

1. Din totalul celor 367 de tampoane sterile examinate din punct de vedere microscopic, 88 (23,97%) au fost pozitive iar 279 (76,03%) negative.
2. Pe regiuni corporale, cel mai ridicat procentaj de probe pozitive atât pentru examenul microscopic dar şi cultural, s-a înregistrat în cazul conductului auditiv extern, urmat de zonele interdigitală, perilabială şi perianală.
3. În cazul examenului cultural, din 367 de plăci însămânţate pe agar Dixon, 95 (25,88%) au fost pozitive, iar 272 (74,22%) negative.
4. Din totalul de 109 tulpini de *Malassezia* izolate, un număr de 106 au fost reprezentate de *M. pachydermatis*, restul speciilor fiind *M. furfur* (2 tulpini) şi *M. globosa* cu 1 tulpină.
5. Producerea de fosfolipaze pentru cele 47 de tulpini izolate s-a testat pe mediu cu lecitină, 39 (82,97%) de tulpini fiind pozitive, iar 8 (17,03%) negative.

BIBLIOGRAFIE

1. Cafarchia Claudia, Diana Romito, D. Otranto, 2005, Occurence and population of *Malassezia spp*. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis, Mycopathologia, 160(2), 143-149.
2. Chen T.A., P.B. Hill, 2005, The biology of Malassezia organisms and their ability to induce immune responses and skin disease, Veterinary Dermatology, 16, 4-26.
3. Girao M.D., M.R. Prado, R.S. Brilhante, 2006, *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative study, Veterinary Journal, 172(3), 544-548.
4. Guillot R., J. Bond, 1999, Malassezia pachydermatis: a review, Medical Mycology, 4, 72-73.
5. Nadăş G. C., 2007, *Malassezia pachydermatis*: Aspecte epidemiologice, morfo-culturale, imunogene şi de patogenitate la specia canină, Teză de Doctorat, Cluj-Napoca.
6. Nadăş G. C., Gh. Răpuntean, N. Fiţ, Adela Sorina Dascăl, 2007, Researches regarding *Malassezia pachydermatis* isolation in Cluj-Napoca, Simpozionul Perspective ale agriculturii mileniului III, Cluj-Napoca, pag. 571.
7. Nardoni S., M. Dini, F. Taccini, F. Manciati, 2007, Occurrence, distribution and population size of Malassezia pachydermatis on skin and mucosa of atopic dogs, Vet. Microbiology, 122, 172-177.

SENSIBILITATEA ŞI SPECIFICITATEA UNOR TESTE SEROLOGICE UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL INFECŢIEI CU BRUCELLA OVIS

SENSIBILITY AND SPECIFICITY OF SOME SEROLOGIC TESTS USED FOR *BRUCELLA OVIS* INFECTION DIAGNOSIS

NECULIŢĂ C.[1], CHIRIAC Adriana Gabriela [1], CARP-CĂRARE M.
[1]DSVSA Vaslui
[2]FMV Iaşi

The serological tests that are being used in the diagnosis of the infection with Brucella ovis at rams, according to the O.I.E Manual (2004) are: the immunodiffusion test in the gel (AGID), the fastening of the complement test (CFT) and the immunoenzymatic test (ELISA),using soluble surface antigens derived of B.ovis.Some variants of the ELISA test that are using recombined proteins and monoclonal anty-bodies are recommended for filed tests.The sensibility of the AGID and ELISA test is similar and sometimes ELISA has a higher sensibility than CFT. A combination of the AGID and ELISA tests has given a better result concerning the sensibility. However, if we consider the simpleness and the costs, the AGID test is the most used for the B.ovis diagnosis.Still,the prescribed test for the international trade remains the fastening of the complement(CFT).

In 2007, in the Vaslui district the supervision of the Brucella ovis infection at reproduction rams has been realised through the fastening reaction of the complement and the ELISA immunoenzymatic test.The rams with the positive serological reactions have been sacrified the confirmation of the diagnosis having been realised through bacteorological examination.

Thus, 13 626 blood samples of rams have been analysed through CFT.There have been traced 135 positive serological samples (0,99 %).Trough the sacrification of a number of 117 positive serological rams,the diagnosis was confirmed through a bacteorogical exam at a number of 86 samples 63,70 (%).

The immunoenzymatic test ELISA performed on...positive samples in CFT had positive result at. 125 samples (92,59 %).

The study that was carried out has demonstrated that the ELISA test has better sensitivity (80,37 %) than the CF test (55,84 %).Thanks to a large number of

negative serums that exist in ELISA and of positives in RFC, the combination between the 2 tests could give a much higher sensitivity.

Key words:diagnosis, serological tests ,sensitivity, specificity.

MATERIALE ŞI METODE

Reacţia de fixare a complementului - Reacţia se bazează pe proprietatea complementului de a interacţiona cu complexele antigen-anticorp (sistemul bacterian).Când combinarea unui antigen cu anticorpul specific are loc în prezenţa complementului, acesta se fixează pe complexele imune (5).

Reacţia de fixare a complementului este specifică şi sensibilă. Permite detectarea precoce a anticorpilor şi se menţine pozitivă ani la rând.

Pentru executarea reacţiei, în ţara noastră se prepară şi se livrează un set de diagnostic prin RFC pentru infecţia cu *Brucella ovis,* denumit *,,Brovset".*

Serurile de examinat se diluează în sol. fiziologică în proporţia 1/5 şi apoi se inactivează 60 de minute la 60°C. După inactivare, se adaugă antigenul diluat conform titrului şi calculat la volumul de 0,5 ml pentru fiecare tub. Apoi se adaugă complementul, diluat în momentul folosirii în reacţie, conform titrului stabilit în titrarea preliminară şi calculat la volumul de 0,5 ml pentru fiecare tub. Tuburile se agită şi apoi se introduc la baia de apă la 37°C timp de 30 minute, pentru incubarea reacţiei.

După incubare, în fiecare tub se distribuie câte 1 ml din sistemul hemolitic preparat în prealabil. Tuburile se agită din nou şi se introduc la baia de apă la 37° timp de 15 minute, pentru incubarea reacţiei, apoi se scot şi rezultatele se apreciază şi se interpretează imediat.

"Citirea" reacţiei şi interpretarea rezultatelor se face prin aprecierea gradului de hemoliză, respectiv a lipsei hemolizei.

Cercetările s-au efectuat pe 13 626 probe de sânge provenite de la berbecii de reproducţie. Rezultatele obţinute au fost sintetizate în tabelul 1.

Tabel 1 Rezultate test RFC

Nr.probe examinate	Nr. probe pozitive ++++	Nr. probe pozitive ++	Nr. probe cu reacţie anticomplementară	Nr. probe dubioase	Nr. probe negative
13 626	104	31	15	113	13 363
%	0,76	0,23	0,11	0,83	98,07

Probele cu reacţie de anticomplementaritate s-au examinat din nou la 21 de zile, rezultatul fiind pozitiv la două dintre ele.Un număr de 182 probe negative în RFC s-au examinat prin tehnica ELISA (tabel 2).

Testul imunoenzimatic ELISA S-a utilizat kitul imunoenzimatic CHEKIT –Brucella ovis (6). Acest kit furnizează o metodă rapidă, simplă, sensibilă şi specifică pentru detecţia anticorpilor anti-Brucella ovis în serul şi plasma de oaie.

Principiul testului - Plăcile de microtitrare sunt oferite pre-căptuşite cu antigen inactivat. Diluţiile serurilor de testat sunt incubate în godeurile acestor plăci. Numai anticorpul specific pentru *B.ovis* se ataşează la antigenul din godeuri şi formează un complex antigen-anticorp pe suprafaţa godeului plăcii. Proteinele nereacţionate se elimină din godeuri prin spălare după un anumit timp de incubare. Conjugatul anti IgG de rumegătoare marcat cu peroxidază reacţionează cu imunoglobulinele legate la antigenul fixat pe suportul solid. Conjugatul nereacţionat se elimină prin spălare, după un anumit timp de incubaţie. Se adaugă substratul enzimatic. Rata conversiei substratului este proporţională cu cantitatea de anticorpi specifici pentru B ovis. Relevanţa diagnosticului conferită de rezultate este obţinută prin compararea densităţii optice pe care o dezvoltă în godeurile conţinând probele cu densitatea optică din godeurile conţinând martorul control pozitiv.

Probele de ser şi martor de control se diluează 1:200 în tub, folosind CHEKIT soluţie de spălare şi diluţie. Se repartizează 100 µl de ser diluat şi martorii în godeuri apropiate ale plăcii, realizând diluţia finală de 1: 200. Se amestecă conţinutul din fiecare godeu prin agitare uşoară a microplăcuţei pentru scurt timp. Se acoperă microplăcuţa cu capac şi se incubează pentru 60 minute (± 10 minute) la 37 ˚C în cameră umedă.

Se spală placa de 2 ori cu cel puţin 300µl CHEKIT soluţie de spălalare.

Se repartizează 100 µl de conjugat CHEKIT anti-IgG rumegătoare – PO, gata preparat, în fiecare godeu.Se acoperă şi se incubează placa pentru 60 minute (± 10 minute) la 37˚ C în cameră umedă. Se repetă spălarea.

Se repartizează 100 µl de substrat CHEKIT –TMB, pre-încălzit la temperatura camerei (+18˚ C la 25˚ C) în fiecare godeu. Se incubează substratul la temperatura camerei sau temperatura optimă de 25˚ C timp de 15 minute (± 5 minute).

Stoparea reacţiei de culoare se face prin adăugarea a 100µl/godeu soluţie stopare TMB, adusă la temperatura camerei (+18˚ C la 25˚ C).

Citirea rezultatelor se efectuează cu ajutorul spectrofotometrului la o lungime de undă de 450 nm.

Pentru validarea densităţilor optice ale analizelor, valoarea martorului pozitiv nu trebuie să fie mai mare de 2 şi densitatea optică a martorului negativ sub 0,5. Diferenţa între martorul pozitiv şi negativ trebuie sa fie mai mare de 0,3.

Analiza probelor în corelaţie cu martorul negativ şi pozitiv se realizează cu ajutorul formulei:

$$\textbf{Valoarea (\%)} = \frac{\textbf{DOprobei - DO martor negativ}}{\textbf{DO martor pozitiv - DOmartor negativ}} \times 100$$

Valoare	<10%	10-50%	>50%
Interpretare	negativ	dubios	pozitiv

Prin acest test s-au examinat toate probele de sânge care au avut rezultat pozitiv dubios în RFC, precum şi alte probe de sânge provenite de la berbeci de reproducţie. Rezultatele obţinute au fost sintetizate în tabelul 2.

Tabel 2 Rezultate test imunoenzimatic ELISA la probele sânge berbeci pozitive în RFC

	Rezultat			**Rezultat**	
Nr.probe pozitive în RFC	Pozitiv	125	Alte probe ser berbeci	Pozitiv	68
	%	92,59		%	37,36
135	Dubios	10	182	Dubios	81
	%	7,41		%	44,51

De asemenea, prin testul ELISA s-au examinat şi probele de sânge berbeci dubioase şi anticomplementare în RFC, precum şi probe negative în RFC.Rezultatele au fost trecute în tabelul 3.

Tabel 3 Rezultat test imunoenzimatic probe dubioase, anticomplementare şi negative în RFC

Nr. şi felul probelor de sânge	Rezultat ELISA					
	Pozitiv	%	Dubios	%	Negativ	%
113 probe dubioase în RFC	18	15,93	8	7,08	87	76,99
169 probe negative în RFC	27	15,98	29	17,16	113	66,86
15 probe anticomplementare	10	66,66	-	-	5	33,33
Total: 297 probe	**55**	**18,52**	**37**	**12,46**	**205**	**69,02**

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Reacţia de fixare a complementului Studiul s-a efectuat pe efectivul de berbeci de reproducţie din judeţ..Analiza datelor din tabelul 1 demonstrează că prin acest test 0,76 % din animale au reacţionat pozitiv, 0,11 % au fost anticomplementare.

Cele 31 animale reacţionate pozitiv de ++ la RFC au fost dubioase la testul imunoenzimatic ELISA .

În funcţie de rezultatele testului imunoenzimatic ELISA efectuat pe cele 135 probe pozitive în RFC şi pe cele 297 probe (tabel 3) dubioase, negative şi anticomplementare în RFC, s-au calculat parametrii sensibilitate şi specificitate:

S_s = a/ a+c% = (125 + 55)/ (125 + 55) + 27 %= 180/180 + 27 % = 86,96 %
S_p= d/ d+b% = 113/ 113 + (15 -10)% = 113/ 118 % = 95,76 %
a = real pozitive; b = fals pozitive; c = fals negative; d = real negative;

Elementul de calcul pentru probele fals pozitive în RFC a fost obţinut scăzând din probele anticomplementare probele cu rezultat pozitiv în ELISA (tabelul 3).

Testul imunoenzimatic EIA_s- γ IFN .

Analiza datelor din tabelul 2 relevă că un procent de 92,59 % dintre berbeci pozitivi în RFC au prezentat reacţii pozitive la testul EIA_s- γ IFN. Peste 7,4 % % dintre animale au fost încadrate în categoria ,, dubioase".

Testul imunoenzimatic s-a efectuat şi pe un efectiv de 182 berbeci care nu au fost examinaţi în prealabil prin RFC.S-a observat că 37,36 % dintre ei au reacţionat pozitiv şi 44,51 % dubios.Ulterior, probele pozitive şi dubioase (149) prin testul ELISA au fost examinate prin RFC.S-au obţinut 12 (17,65%) rezultate pozitive, 7 (10,29%) dubioase, 2 (2,94 %) anticomplementare, restul fiind negative.

În contextul examenului bacteriologic de confirmare, s-a apreciat sensibilitatea şi specificitatea acestui test în urma rezultatelor obţinute:

S_s = a/ a+c% = 36/ 36 + 5 % = 87, 80 %

S_p= d/ d+b% = (205 – 5) / (205 – 5) +(55- 36) % = 91,32 %

a = real pozitive; b = fals pozitive; c = fals negative; d = real negative;

Elementul de calcul pentru probele fals negative în ELISA a fost obţinut utilizând ca referinţă cele 5 probe anticomplementare şi negative în ELISA, confirmate bacteriologic (tabelul 3). S-a observat că un număr de 18 (15,93 %) probe cu rezultat dubios în RFC şi 27 (15,98 %) probe cu rezultat negativ în RFC au fost pozitive la testul ELISA.De asemenea 10 (66,66 %) probe cu rezultat de anticomplementaritate au fost pozitive în ELISA.

CONCLUZII

1. Testul CFT, efectuat pe efectivul de berbeci de reproducţie din judeţul Vaslui în 2007, a avut o sensibilitate de 86,96 % şi o specificitate de 95,76 %.
2. Testul imunoenzimatic ELISA a avut o sensibilitate de 87,80 % şi o specificitate de 91,32 %.
3. Fiind un test biologic, testul imunoenzimatic ELISA poate furniza şi unele rezultate fals-pozitive şi deci trebuie interpretat în contextul datelor epidemiologice şi în completarea testelor ,, in vivo”.
4. Coroborarea rezultatelor testului imunoenzimatic ELISA cu RFC ar putea duce la o sensibilitate mai ridicată a diagnosticului serologic al brucelozei ovine la berbeci.
5. Din totalul animalelor sacrificate pentru stabilirea diagnosticului de bruceloză (117), boala s-a confirmat în 36 de cazuri (26,66 %).

BIBLIOGRAFIE

1. Carp - Cărare M., Eleonora Guguianu, Dorina Timofte (1997) - ***Lucrări practice de microbiologie veterinară***, Uz intern, U.A.M.V. Iaşi.
2. Oneţ E., Virginia Constantinescu, (1978) - ***Diagnosticul de laborator în medicina veterinară,*** Ed. Ceres, Bucureşti, 72-74.
3. Necşulescu M., Mariana Sarcă, Mihaela Mazaneţ (1999) - ***Brucelozele animale – tehnici de diagnostic***, S.N. ,, Institutul Pasteur ”, Bucureşti.
4. Pop M., Vasiu C., Răpuntean Gh. (1981) – ***Ghid de diagnostic al bolilor infecţioase la animale,*** Ed. Ceres, Bucureşti, 85-96.
5. *** ***Ghid practic pentru diagnosticul serologic al brucelozei***, (2002), I.D.S.A. Bucureşti
6. *** ***Instrucţiuni de utlilizare kit ,,CHEKIT Brucella ovis”,*** IDEXX LABORATORIES, 2007
7. *** ***Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals***, 5 th edition, 2004, Part 2, section 2.4., chapter 2.4.1.
8. *** Programul acţiunilor de supraveghere, prevenire şi control al bolilor la animale, al celor transmisibile de la animale la om, protecţia animalelor şi protecţia mediului pentru anul 2007.

OBSERVAŢII PRIVIND INFLUENŢA CONDIŢIILOR DE PRELUCRARE ASUPRA MICROFLOREI CARCASELOR DE PASĂRE ÎNTR-UN ABATOR RECENT MODERNIZAT

OBSERVATIONS CONCERNING THE INFLUENCE OF PROCESSING STEPS ON POULTRY CARCASS MICROFLORA IN A RECENTLY MODERNIZED ABATTOIR

NECULIŢĂ Elena Narcisa[1], FLORISTEAN V.[2], CREŢU Carmen[2], CARP-CĂRARE M.[2]
[1]DSVSA Vaslui
[2]FMV Iaşi

The microflora of poultry carcasses at different stages of processing from reception to chilling was evaluated. Total viable count (TVC), coliforms, Enterobacteriacee bacteria and E. coli were determined. The mean values of the TVC varies from 5.25 to 7.27 log CFU/g; coliforms varies from 3.8 to 5.43 log CFU/g; Enterobacteriaceae count varies from 4.06 to 5.68 log CFU/g and E. coli from 2.79 to 4.77 log CFU/g.

The highest values of the carcass microbiological parameters during the processing steps were detected after defeathering and after evisceration whereas the small values were detected after carcass washing. There were detected variation of values in relation with time of sampling and number of carcasses processed.

Key words: poultry carcass, poultry meat processing, microbiological quality, poultry meat safety.

Păsările ajung în abator purtând pe suprafaţa corpului, pe pene şi în tubul digestiv o microfloră bogată şi diversă. Prelucrarea păsărilor în abatoarele de profil este o operaţiune complexă care s-a dezvoltat mult în ultima perioadă. Acest proces de transformare a păsărilor vii în carne de pasăre, „modelează" microflora iniţială a carcaselor prin particularităţile de procesare. În timpul procesării în abator carcasele de pasăre suferă contaminări microbiene multiple, tehnologia şi metodele de sacrificare folosite având un rol important din acest punct de vedere *(5, 6, 7)*.

Cu toate că procesarea se desfăşoară într-un interval de timp scurt, carcasele fiind rapid răcite iar multiplicarea microorganismelor mezofile este încetinită, microorganismele psihrofile de pe suprafaţa umedă a carcaselor se pot multiplica şi contribuie la degradarea precoce a cărnii de pasăre.

Studiul efectuat a urmărit evaluarea microflorei carcaselor, a apei, a spaţiilor şi a instalaţiilor folosite în prelucrarea păsărilor în abator concomitent cu monitorizarea variaţiilor de temperatură şi umiditate pentru a observa evoluţia microflorei carcaselor şi a identifica principalele cauze ale variaţiilor.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul influenţei condiţiilor de procesare asupra microflorei carcaselor de pasăre efectuat în perioada februarie – decembrie 2006 într-un abator din judeţul Vaslui. Abatorul are o capacitate de sacrificare de 10.000 de păsări pe zi (2000 păsări/oră) iar din punct de vedere tehnologic este divizat în trei zone principale: zona prelucrării iniţiale, zona de prelucrare finală şi zona de refrigerare şi congelare a carcaselor. În zona de prelucrare iniţială se efectuează operaţiunile până la eviscerare, în zona de prelucrare finală se realizează în principal eviscerarea şi condiţionarea carcaselor până la ambalare iar în ultima zonă se realizează refrigerarea şi sau congelarea carcaselor. Majoritatea produselor rezultate din abator se comercializează sub formă refrigerată.

De la carcasele selecţionate s-au îndepărtat, în condiţii care să împiedice contaminarea suplimentară a carcaselor, câte un fragment de piele de la gât de aproximativ 10 grame. Fragmentele de piele au fost prelevate cu ajutorul unor foarfece sterile, în pungi de plastic sterile (pungi speciale pentru Stomacher - 305/175 mm) şi păstrate pe gheaţă de la recoltare până la laborator. Probele au fost prelucrate pentru examinare în maxim 5 ore de la recoltare.

Au fost determinaţi următorii parametri microbiologici: numărul total de germeni aerobi mezofili, coliformi, enterobacteriacee şi *E. coli*. Numărul total de germeni aerobi mezofili a fost determinat cu respectarea cerinţelor standardului ISO 4833. *Enterobacteriaceele* s-au determinat în conformitate cu prevederile standardului ISO 5552. *Coliformii* au fost determinaţi conform

standardului ISO 4832 iar *Escherichia coli* s-a determinat pe agar EMB (Eosine Methylene Blue), confirmarea coloniilor caracteristice făcându-se prin următoarele teste: indol, Voges-Proskauer, roşu de metil, utilizarea citratului.

Rezultatele obţinute au fost interpretate statistic folosindu-se programul Microsoft Office Excel 2003, pentru calcularea mediei şi deviaţiei.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În *tabelul 1* sunt prezentate rezultatele obţinute în urma examenului microbiologic al probelor recoltate de la carcase pentru *numărul total de germeni*, *coliformi, enterobacteriacee şi E. coli*, microorganisme care caracterizează starea de igienă a procesului de prelucrare şi implicit influenţa procesării asupra microflorei carcaselor.

Încărcătura bacteriană cea mai mare pe suprafaţa carcaselor examinate a fost evidenţiată imediat după deplumare şi după eviscerare, acestea fiind etapele în care contaminarea cu microorganisme s-a manifestat foarte intens. La polul opus s-au situat rezultatele obţinute după etapa spălării carcaselor.

Numărul microorganismelor de pe suprafaţa carcasei a crescut progresiv odată cu numărul de carcase procesate, însă creşterea a fost nesemnificativă. O creştere mai însemnată se observă în cazul numărului total de germeni deoarece în această categorie de microorganisme sunt încadrate şi microorganismele psichrotrofe (Tabel 2).

Compararea rezultatelor obţinute, în funcţie de numărul carcaselor procesate, a relevat o creştere a numărului de microorganisme pe suprafaţa carcaselor concomitent cu creşterea numărului de carcase procesate. Încărcătura microbiană evidenţiată la trei ore de la începerea sacrificărilor a fost mai mare cu aproximativ 0,7 – 0,8 log în comparaţie cu valorile obţinute la o oră de la începerea procesului de sacrificare. Creşterea cea mai mare a fost evidenţiată la toţi parametrii evaluaţi după eviscerare şi după depulmare. *(Tabel 2)*.

Tabel nr. 1 Microflora carcaselor de pasăre în diferite etape de procesare în abator

Locul de recoltare	NTG*	Coliformi*	Enterobact.*	E. coli*
Sângerare	5,43 ± 0,31	3,84 ± 0,54	4,61 ± 0,37	3,22 ± 0,18
Deplumare	6,95 ± 0,33	5,00 ± 0,65	5,40 ± 0,13	4,64 ± 0,30
Eviscerare	7,27 ± 0,81	5,43 ± 0,14	5,68 ± 0,35	4,77 ± 0,18
Spălare	5,25 ± 0,06	3,8 ± 0,43	4,36 ± 0,34	3,61 ± 0,32
Răcire	5,37 ± 0,14	3,99 ± 0,62	4,06 ± 0,40	3,41 ± 0,23
Ambalare	5,45 ± 0,20	3,79 ± 0,42	4,44 ± 0,34	2,79 ± 0,51

** Log UFC/g ± deviaţia standard*

Tabel nr. 2 Evoluţia microflorei carcaselor de pasăre în diferite etape de procesare în abator în timpul procesului de sacrificare

	Parametrul microbiologic											
	NTG			Coliformi			Enterobacteriaceeae			E. coli		
	A*	**B	***C	A*	**B	***C	A*	**B	***C	A*	**B	***C
Sângerare	4,87	5,37	6,1	3,52	3,58	4,01	3,98	4,35	4,84	2,88	3,02	3,29
Deplumare	6,58	6,94	7,3	4,28	4,65	5,11	4,88	5,34	5,64	4,17	4,26	4,85
Eviscerare	6,76	7,12	7,31	5,21	5,35	5,44	4,96	5,53	5,89	4,23	4,39	4,94
Spălare	4,96	5,17	5,43	3,63	3,74	3,97	4,27	4,28	4,39	3,38	3,56	3,67
Răcire	4,86	5,24	5,36	3,68	3,74	4,13	3,61	3,89	4,12	3,03	3,22	3,48

*A – la o oră de la începere procesării; **B - la două ore de la începerea procesării; ***C - la trei ore de la începerea procesării

Tabel nr. 3Evoluţia parametrilor microbiologici evaluaţi în cursul procesării

	NTG	***Coliformi***	***Enterobact.***	***E. coli***
Deplumare	1,52	1,16	0,79	1,42
Eviscerare	0,32	0,43	0,28	0,13
Spălare	-2,02	-1,63	-1,32	-1,16
Răcire	0,12	0,19	-0,3	-0,2
Ambalare	0,08	-0,2	0,38	-0,62

** Log UFC/g ± deviaţia standard*

Deplumarea păsărilor, efectuată cu ajutorul deplumatoarelor mecanice constituie una din etapele fluxului tehnologic de prelucrare în care carcasele de pasăre se îmbogăţesc cu microorganisme, în principal de pe mijloacele active care realizează îndepărtarea mecanică a penelor. Prin utilizarea îndelungată, pe suprafaţa acestor „degete de cauciuc" apar crevase care se colonizează cu microorganisme, constituind adevărate surse de contaminare perpetuă a carcaselor. Temperatura ridicată din interiorul deplumatoarelor reprezintă un alt factor care favorizează multiplicarea microorganismelor.

Îndepărtarea penelor, prin acţiunea mecanică asupra carcaselor opărite, conduce la eliberarea de materii fecale care se dispersează pe suprafeţele instalaţiei de deplumat. Astfel se explică încărcătura mare de *coliformi, enterobacteriaceae şi E. coli* de pe suprafaţa carcaselor imediat după ieşirea lor din deplumator.

De asemenea, deplumarea păsărilor în piele, cavităţi care sunt, în mod inevitabil, colonizate de către bacterii, unele potenţial patogene pentru om *(3, 4)*.

Contaminarea carcaselor cu microorganisme în această etapă a procesării în abator poate fi redusă prin decontaminarea frecventă a deplumatorului, dar mai ales prin aspersarea continuă a carcaselor pe parcursul deplumării cu apă intens clorinată. Pe de altă parte, pentru a reduce la minim posibilitatea dispersiei microorganismelor în celelalte zone ale abatorului, este necesară separarea mecanică a zonei în care se efectuează deplumarea păsărilor.

La ora actuală, aşa cum sunt concepute deplumatoarele, contaminarea încrucişată nu poate fi evitată. Se poate însă reduce intensitatea contaminării până la limite acceptabile prin efectuarea de decontaminări periodice a căror eficienţă poate fi mărită prin alegerea unor substanţe active faţă de microorganismele identificate mai frecvent în acest loc şi foarte important, spălarea suplimentară a carcaselor după deplumare cu soluţii (alcaline, acide sau hiperclorinate) care să asigure reducerea numărului de microorganisme de pe carcase.

Eviscerarea, etapă importantă a prelucrării păsărilor, a fost monitorizată în ceea ce priveşte evoluţia microflorei şi stabilirea principalelor cauze ale acestei evoluţii prin evaluarea încărcăturii microbiene de la suprafaţa carcaselor după eviscerare, evaluarea calităţii microbiologice a apei înainte şi după spălarea carcaselor eviscerate, evaluarea încărcăturii microbiene a aerului din spaţiul în care s-a realizat eviscerarea şi evaluarea încărcăturii microbiene a suprafeţelor instalaţiei de eviscerare care vin în contact cu carcasa.

Eviscerarea, în abator, presupune deschiderea cavităţii corporale, extragerea masei gastro-intestinale şi spălarea carcasei la interior şi exterior. Extragerea masei gastro-intestinale şi a organelor din cavitatea corporală este un proces multistadial care începe cu deschiderea cavităţii prin o incizie circulară în jurul cloacei după care se extrage conţinutul cavităţii care se separă de carcasă, fiind agăţat pe un conveier separat pentru a fi examinat sanitar veterinar.

Datorită faptului că instalaţia nu este ajustabilă permanent, în funcţie de dimensiunile carcaselor, pot apare accidente concretizate prin ruperi ale intestinelor şi contaminarea carcaselor cu conţinut intestinal. Sancţiunile aplicate în cazul contaminării carcaselor cu conţinut intestinal sunt în funcţie de mărimea suprafeţei afectate, mergând de la confiscări parţiale până la confiscarea totală a carcasei.

Numărul total de germeni de pe carcasele de pasăre examinate în această etapă a procesării a fost în medie de 7,27 ± 0,81 log UFC/g, *coliformii* 5,43 ± 0,14 log UFC/g, *Enterobacteriaceele* 5,68 ± 0,35 log UFC/g iar *E. coli* 4,77 ± 0,18 log UFC/g (Tabel 1).

Comparativ cu valorile medii evidentiate după deplumare se observă o creştere a numărului de microorganisme la toţi parametri evaluaţi, creşterea fiind în medie de regulă mai mică de 0,5 log UFC/g (Tabel nr. 3).

Spălarea carcaselor imediat după eviscerare are rolul de a îndepărta eventualele impurităţi şi sângele de pe carcase. Operaţiunea se efectuează în abator cu ajutorul unor dispozitive care proiectează apa, cu presiune, atât la interiorul cât şi la exteriorul carcaselor. În procesul de îndepărtare a impurităţilor vizibile se îndepărtează de pe carcasă şi unele microorganisme.

Efectul spălării carcaselor a fost evaluat prin determinarea microorganismelor de pe suprafaţa carcaselor înainte şi după spălarea acestora. Compararea statistică a rezultatelor obţinute privind încărcătura microbiană a carcaselor după eviscerare şi după spălare a evidenţiat o diferenţă statistic semnificativă ($F = 6,29$; $P < 0,05$), valorile obţinute după spălare fiind mai mici.

În condiţiile studiului efectuat spălarea carcaselor a redus numărul de microorganisme de pe carcasele evaluate cu aproximativ 1,5 log UFC/g , reducerea cea mai mare fiind constatată în cazul numărului total de germeni (2.02 log UFC/g) iar cea mai mică în cazul *E. coli (Tabel 3).*

Spălarea carcaselor reprezintă un punct critic de control în sistemul HACCP întrucât aici se poate reduce până la un nivel acceptabil microorganismele de pe carcasele de pasăre. Ca elemente cu importanţă în reducerea numărului de microorganisme în această etapă sunt: utilizarea unor instalaţii eficiente care să asperseze apa sub presiune pe toată suprafaţa carcaselor, folosirea unor substanţe cu efect bactericid (cloramina, acizi organici etc.), reducerea vitezei conveierului, examinarea cu atenţie a procesului carcaselor pentru a se reduce la minim procentul carcasele cu defecte vizibile, monitorizarea permanentă a calităţii apei de spălare şi periodic a eficienţei spălării.

Pe baza rezultatelor obţinute se poate susţine că procesului de spălare a carcaselor are o eficienţă limitată în reducerea numărului de microorganisme de pe carcasă. În interpretarea rezultatelor trebuie să ţinem cont că îndepărtarea microorganismelor de pe carcase este influenţată de fenomenul de adeziune al acestora la suprafaţa carcaselor, fenomen mai evident la *Enterobacteriacee (1).*

Răcirea carcaselor la temperaturi mai mici de 10ºC este necesară pentru a preveni dezvoltarea şi multiplicarea microorganismelor mezofile (unele patogene) şi pentru a se limita multiplicarea celor psichrotrofe. În abatorul investigat răcirea carcaselor se face cu ajutorul aerului, tehnologie foarte răspândită în ţările europene, fără a se stropi carcasele cu apă pentru a se preveni pierderile în greutate. Pentru a fi răcite păsările sunt vehiculate prin tunelul de răcire la temperatura de 2-4ºC şi umiditate relativă de 85%, timp de aproximativ 90 minute. Viteza curentului de aer este, în medie, de 5,8 m/s.

După cum se poate observa din tabelul 1, răcirea carcaselor nu a condus la o modificare evidentă a microflorei carcaselor din punct de vedere cantitativ. De cele mai multe ori valorile parametrilor microbiologici evaluaţi au înregistrat creşteri pe parcursul procesului de răcire. În cazul *enterobacteriaceelor* s-a înregistrat o scădere a numărului de microorganisme dar fără a fi semnificativă. Rezultate similare au obţinut şi alţi autori *(1, 2).*

CONCLUZII

1. Procesarea păsărilor în abator este un proces complex cu implicaţii majore asupra microflorei carcasei de pasăre şi asupra siguranţei alimentare;
2. În condiţiile studiului efectuat etapele procesării în urma cărora s-au produs cele mai mari variaţii ale microflorei carcaselor au fost: eviscerarea şi deplumarea care au avut un efect de creştere a încărcăturii bacteriene, iar la polul opus se situează spălarea carcaselor care a condus la scăderea numărului de microorganisme;
3. Gradul de contaminare a suprafeţelor, aerului şi indirect al carcaselor a crescut concomitent cu creşterea numărului de carcase procesate;
4. Variaţiile în timp constatate pe parcursul efectuării studiului nu au putut fi explicate decât prin variaţii ale calităţii păsărilor aduse spre sacrificare şi prin unele deficienţe în organizarea procesului de sacrificare.

BIBLIOGRAFIE

1. Abu Ruwaida, A. S., Sawaya, W. N., Dashti, B. H., Murad, M., Al Othman, H. A. 1994. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *Journal of Food Protection. 1994*. 57(10)::887-892 ; 38 ref.
2. Allen, V. M., Corry, J. E. L., Burton, C. H., Whyte, R. T., Mead, G. C. 2000. Hygiene aspects of modern poultry chilling. *International Journal of Food Microbiology*. 58:39-48.
3. Bolder, N. M. 1998. The microbiology of the slaughter and processing of poultry. p. 158-173. *In* Davies, A., Board, R. (ed.), The microbiology of meat and poultry. Blakie Academic & Professional.
4. Mead, G. C. 2000. Fresh and further-processed poultry. p. 445-471. *In* Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (ed.), The microbiological safety and quality of food vol. 1. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland.
5. Şindilar, E., Bondoc, I., Şindilar, E. V. 1997. Unele aspecte privind sursele de poluare microbiană a carcaselor de pui broiler I. *Lucrări Ştiinţifice USAMV*. 40:88.
6. Şindilar, E., Bondoc, I., Şindilar, E. V. 1997. Unele aspecte privind sursele de poluare microbiană a carcaselor de pui broiler II. *Lucrări Ştiinţifice USAMV*. 40.
7. Şindilar, E., Grecianu, A., Verdeş, E., Cărare, M. C. 1988. Izolarea şi identificarea microflorei psichrotrofe de pe carcasele de pasăre conservate prin frig. *Lucrări Ştiinţifice I.A. Iasi*. 31:81-83.

OBSERVAŢII PRIVIND MICROFLORA AERULUI ÎNTR-UN ABATOR DE PĂSARI RECENT MODERNIZAT

OBSERVATION CONCERNING AIRBORNE MICROFLORA FROM IN A RECENTLY MODERNIZED POULTRY ABATTOIR

NECULIŢĂ Elena Narcisa[1], FLORISTEAN V.[2], CREŢU Carmen[2], CARP-CĂRARE M.[2]
[1]DSVSA Vaslui
[2]FMV Iaşi

The air microflora at various locations in a poultry processing plant was evaluated quantitatively and qualitatively. Quantitatively, total viable counts (TVC) and Enterobacteriaceae counts were assessed. High level of air contamination were found in plucking room (6.73 log cfu/m^3 for TVC and 3,21 log cfu/m^3 for Enterobacteriaceae).

Even if commonly the Gram positive bacteria were predominant, the composition of microflora from the different location of the abattoir shows particularities. In the plucking room area prevailing bacteria from Staphylococcus genus and the Enterobacteriaceae, whereas in the chilling room predominate the Micrococcus genus from Gram positive bacteria and Pseudomonas and other psychrotrophic Gram negative bacteria.

Key words: airborne microorganisms; poultry meat processing, poultry hygiene, poultry meat safety

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul influenţei condiţiilor de procesare asupra microflorei aerului a fost efectuat în perioada februarie – decembrie 2006 într-un abator din judeţul Vaslui.

Probele de aer au fost recoltate din secţia de prelucrare iniţială - la locul de agăţare a păsărilor pe conveier, din apropierea instalaţiei de deplumat, din secţia de prelucrare finală unde se realizează eviscerarea şi din spaţiul în care se realizează răcirea carcaselor. Probele de aer au fost recoltate cu ajutorul aparatului Mas-100 (Merck KGaA), la o înălţime de 1,5 m deasupra pardoselii, în trei locuri diferite ale spaţiului analizat iar interpretarea s-a făcut în funcţie de media celor trei determinări. Probele de aer au fost recoltate în urma a 4 vizite efectuate la interval de trei luni. În total au fost recoltate 108 probe din aer pentru fiecare parametru microbiologic determinat.

Au fost determinaţi următorii parametri microbiologici: numărul total de germeni aerobi mezofili, coliformi, enterobacteriacee şi *E. coli*.

Numărul total de germeni aerobi mezofili a fost determinat cu respectarea cerinţelor standardului ISO 4833.

Enterobacteriaceele s-au determinat în conformitate cu prevederile standardului ISO 5552 pe mediul VRBGA cu confirmare prin testarea capacităţii de a produce oxidază şi de a fermenta glucoza. Iniţial, în aparatul Mas-100 au fost introduse plăci Petri cu agar nutritiv care, după aspirarea volumului de aer prestabilit, au fost incubate la 20°C pentru două ore, apoi s-a turnat mediul VRBGA la temperatura de 45°C şi s-a incubat la 30°C pentru alte 48 de ore.

Escherichia coli s-a determinat pe mediul EMB (Eosine Methylene Blue Agar) cu incubare la 37°C pentru 24 de ore urmata de confirmarea coloniilor caracteristice (întunecate cu luciu verde metalic) prin următoarele teste: indol, Voges-Proskauer, roşu de metil, utilizarea citratului.

Pentru caracterizarea calitativă a microflorei aerului, din fiecare placă Petri în care s-a determinat numărul total de germeni s-au recoltat câte 10 colonii, fiecare colonie fiind ulterior supusă identificării până la nivel de gen pe baza morfologiei (forma şi dispoziţia celulelor bacteriene, abilitatea de a produce spori), afinităţilor tinctoriale (coloraţia Gram), motilităţii şi a unor caractere biochimice (producerea de catalază, producerea de oxidază, producerea de acetoin din glucoză – testul VP, reducerea nitraţilor la nitriţi, oxidarea/fermentarea glucozei, producerea de pigmenţi). Interpretarea rezultatelor şi diferenţirea microorganismelor a avut la bază *Bergey Manual of Systematic Bacteriology* dupa tehnica descrisă de *Flukey şi col. (4)*

Rezultatele obţinute au fost interpretate statistic folosindu-se Microsoft Excel 2003 pentru calcularea mediei şi deviaţiei standard.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În *tabelul 1* sunt prezentate valorile NTG şi a bacteriilor *Enterobacteriaceae* din aerul spaţiilor de lucru ale abatorului. Evaluarea cantitativă a microflorei aerului din spaţiile de lucru ale abatorului a relevat un număr total de germeni care a variat între 3,39 şi 6,73 log UFC/m^3. Bacteriile din familia *Enterobacteriaceae* au evoluat cantitativ asemănător cu numărul total de germeni cu deosebirea că au fost înregistrate valori mari şi în zona de prelucrare finală.

Numărul total de germeni şi *enterobacteriaceele* din spaţiile în care se realizează recepţia păsărilor au fost, în medie, de 4,23 log UFC/m^3 şi respectiv 2,53 log UFC/ m^3 *(Tabel 1)*.

Identificarea microorganismelor izolate din aer a relevat predominanţa bacteriilor Gram pozitive, care au reprezentat 79,8% din coloniile caracterizate cu predominanţa bacteriilor din genurile *Micrococcus* şi *Staphylococcus* care au reprezentat împreună 40,7% din totalul bacteriilor Gram pozitive. Dintre bacteriile Gram negative genurile *Pseudomonas*, *Moraxela* şi bacteriile din familia *Enterobacteriaceae* au fost cel mai bine reprezentate *(Tabel 2a)*.

Tabel nr. 1 Microflora aerului în spaţiile de lucru din abator

Locul de recoltare	**NTG***	**Enterobacteriaceae***
Prelucrare iniţială - recepţie	4,23 ± 1,59	2,53 ± 0,74
Deplumare	6,73 ± 1,01	3,21 ± 0,71
Prelucrare finală - eviscerare	3,79 ± 1,92	3,0 ± 0,83
Spaţii de răcire	3,39 ± 1,73	1,90 ± 0,65

** Log UFC/m^3 ± deviaţia standard*

Tabel nr. 2a Compoziţia microflorei aerului din spaţiile de lucru ale abatorului

Locul de recoltare	**Microflora aerului**		
	Categorie	**Gen**	**%**
Prelucrare iniţială - Recepţie	Bacterii Gram pozitive **(79,8%)**	Bacillus	11,1
		Micrococcus	22,3
		Staphylococcus	18,4
		Streptococcus	6,3
		Alte genuri	21,7
	Bacterii Gram negative **(20,2%)**	Acinetobacter	2,0
		Enterobacteriaceae	3,0
		Flavobacterium	3,0
		Moraxela	1,0
		Pseudomonas	4,7
		Alte genuri	6,5

Evaluarea cantitativă a microflorei aerului din zona deplumatoarelor a relevat un număr total de germeni de 6,73 log UFC/m^3, fiind valoarea cea mai mare constatată în acest studiu. Nivelul mare al încărcăturii microbiene în aceasta zonă a abatorului a fost constatată şi de alţi cercetători *(1, 12)* şi este consecinţa particularităţilor de funcţionare ale instalaţiilor de deplumat, dar şi a unor deficienţe de igienă (*Tabel 1*).

Calitativ din aerul din jurul deplumatoarelor s-a izolat cu frecvenţă mare bacteriile Gram pozitive din genul *Staphylococcus* (26,5%) şi *Enterobacteriacee* (11,2%) din grupul bacteriilor Gram negative. Bacteriile Gram pozitive au fost predominante (71,3%) *(Tabelul 2b)*.

Prezenţa în număr mare a bacteriilor din genul *Staphylococcus* în aer este strâns legată de prezenţa bacteriei pe suprafeţele active ale deplumatoarelor fenomen, sesizat şi de alţi autori *(3, 7, 8)*. Dintre speciile genului cel mai frecvent sunt izolate *S. aureus* şi *S. sciuri,* primul fiind, din punctul de vedere al siguranţei alimentare, mai important, întrucât poate produce enterotoxine. Originea tulpinilor „endemice" de *Staphylococcus* în această zonă a abatorului nu este în totalitate lămurită dar se consideră că cea mai mare parte a tulpinilor provin de pe pielea păsărilor aduse spre sacrificare *(3, 7, 8)*. Supravieţuirea şi reuşita în competiţia cu alte specii bacteriene se explică prin rezistenţa

mare a acestor specii la acţiunea cloraminei şi abilităţii acestor bacterii de a forma aglomeraţii, asemănătoare cu filmele descrise la alte specii bacteriene, care le conferă o rezistenţă mărită la acţiunea substanţelor decontaminante. Aceste caracteristici face ca speciile din genul *Staphylococcus* să persiste în această zonă a abatorului şi în special pe suprafeţele active ale deplumatoarelor luni sau chiar ani, fiind o sursă continuă de contaminare a cărnii de pasăre *(2, 3, 7, 8)*. În plus, cu toate că majoritatea tulpinilor de *S. aureus* izolate de la păsări sunt netoxigene, în abatoare, de la nivelul deplumatoarelor, au fost izolate tulpini toxigene capabile să producă enterotoxine de tip C şi D *(7, 8)*.

Prezenţa *enterobacteriaceelor* în proporţie ridicată în aerul din această zonă a abatorului este consecinţa contaminării cu materii fecale expulzate ca urmare a presiunii exercitate asupra carcaselor în deplumator.

Tabel nr. 2b Compoziţia microflorei aerului din spaţiile de lucru ale abatorului

Locul de recoltare	**Microflora aerului**		
	Categorie	**Gen**	**%**
Deplumare	Bacterii Gram pozitive **(71,3%)**	Bacillus	6,4
		Micrococcus	12,6
		Staphylococcus	26,5
		Streptococcus	1,2
		Alte genuri	24,6
	Bacterii Gram negative **(28,7%)**	Acinetobacter	2,1
		Enterobacteriaceae	11,2
		Flavobacterium	2,4
		Pseudomonas	5,1
		Alte genuri	7,9

Analiza microflorei aerului din spaţiile în care se efectuează eviscerarea a evidenţiat o încărcătură microbiană relativ redusă dacă o comparăm cu cea din încăperile sectorului de prelucrare iniţială a păsărilor Se remarcă proporţia mare a *enterobacteriaceelor,* valorile fiind comparabile cu cele din aerul din spaţiile în care se efectuează recepţia păsărilor De asemenea, se poate observa prezenţa într-o proporţie mare a microorganismelor Gram negative asociate cu degradarea cărnii, fapt care sugerează persistenţa în aceste spaţii a unei microflore care a ajuns aici odată cu păsările, care, sub influenţa condiţiilor de mediu din această zonă (temperatura scăzută şi umiditate ridicată), a suferit o selecţie în acest sens. Astfel în urma caracterizării pe baza caracterelor morfologice, metabolice şi tinctoriale s-au identificat în aer bacterii din genurile: *Pseudomonas, Acinetobacter şi Flavobacterium*. Şi în această secţie, în aer au predominat microorganismele Gram pozitive; genul *Staphylococcus* fiind cel mai bine reprezentat (23,3%) *(Tabelul 2c).*

Microflora aerului din spaţiile de refrigerare a carcaselor, în comparaţie cu cea din spaţiile de eviscerare, a fost, la parametrii microbiologici evaluaţi, mai mică, în medie, cu 0,4 log UFC/m^3 pentru NTG şi cu,1 log UFC/m^3 pentru *Enterobacteriacee (Tabel nr.1).*

Tabel nr. 2c Compoziţia microflorei aerului din spaţiile de lucru ale abatorului

Locul de recoltare	**Microflora aerului**		
	Categorie	**Gen**	**%**
Prelucrare finală - eviscerare	Bacterii Gram pozitive **(76,7%)**	Bacillus	6,0
		Micrococcus	21,3
		Staphylococcus	23,3
		Streptococcus	1,5
		Alte genuri	24,6
	Bacterii Gram negative **(23,3%)**	Acinetobacter	5,1
		Enterobacteriaceae	8,2
		Flavobacterium	2,6
		Pseudomonas	2,3
		Alte genuri	5,1

Tabel nr. 2d Compoziţia microflorei aerului din spaţiile de lucru ale abatorului

Locul de recoltare	Microflora aerului		
	Categorie	**Gen**	**%**
Spaţii de răcire	Bacterii Gram pozitive **(72,6%)**	Bacillus	11,2
		Micrococcus	16,1
		Staphylococcus	12,7
		Streptococcus	1,6
		Alte genuri	31,0
	Bacterii Gram negative **(27,4%)**	Acinetobacter	4,1
		Enterobacteriaceae	2,1
		Flavobacterium	3,1
		Moraxela	4,3
		Pseudomonas	8,2
		Alte genuri	5,6

Calitativ în microflora aerului din tunelul de refrigerare a predominat, tot de bacteriile Gram pozitive, acestea reprezentând 72,6 % din totalul coloniilor investigate. Între bacteriile Gram pozitive identificate predomină genul Micrococcus (16,1%) şi genul Staphylococcus (12,7%), un procent ridicat din bacteriile din această grupă nu au putut fi identificate neechivoc prin testele folosite.

Bacteriile Gram pozitive reprezintă 27,4% dintre microorganismele identificate. Între bacteriile Gram pozitive au fost identificate cu frecvenţă mai mare genurile Pseudomonas, Flavobacterium, Acinetobacter şi Moraxela dar şi Enterobacteriacee, 5,6% dintre acestea nefiind identificate (Tabel 2d).

Cantitativ, microflora aerului, a crescut, de regulă odată cu numărul carcaselor procesate fiind mai mare decât în cazul spaţiilor în care se realizează prelucrarea finală a păsărilor(Tabel nr. 3).

Tabel nr. 3 Evoluţia microflorei aerului în spaţiile de lucru din abator în timpul procesului de sacrificare

	NTG			Enterobacteriaceae		
	A*	****B**	*****C**	**A***	****B**	*****C**
Recepţie	3,43	4,26	4,63	1,63	2,14	2,71
Deplumare	5,36	6,48	6,95	2,32	2,85	3,45
Eviscerare	3,21	3,58	3,94	2,62	2,76	3,14
Răcire	2,64	3,13	3,87	1,58	1,76	2,21

**A – la o oră de la începere procesării; **B - la două ore de la începerea procesării; ***C - la trei ore de la începerea procesării*

Una din explicaţiile a acestui fenomen este viteza mare a curenţilor de aer necesari accelerării răcirii carcaselor care preiau de pe carcase şi de pe suprafeţe microorganisme pe care le vehiculează realizând o contaminare încrucişată. Acesta este motivul pentru care, în literatura de specialitate, se susţine că în urma răcirii cu aer a carcaselor acestea au de regulă o încărcătură microbiană mai mare decât carcasele răcite cu apă, prin imersie *(6)*.

Microorganismele, odată ajunse pe carcase sunt mai greu de îndepărtat decât în cazul răcirii cu apă, unde intervine şi un efect de spălare a carcaselor. În ambele cazuri este foarte important gradul de poluare microbiologică a carcaselor înainte de a fi introduse la răcire. În cazul răcirii cu aer se poate conchide că aerul are un rol important în vehicularea microorganismelor de pe o carcasă pe alta, microorganisme care provin, în principal, tot de pe carcase.

CONCLUZII

1. Procesarea păsărilor în abator este un proces complex cu implicaţii majore asupra microflorei carcasei de pasăre şi asupra siguranţei alimentare;
2. În toate spaţiile de prelucrare microflora aerului a fost predominată de bacteriile Gram pozitive.
3. În condiţiile studiului efectuat, etapele procesării în urma cărora s-au evidenţiat cele mai mari variaţii cantitative şi/sau calitative ale microflorei aerului au fost deplumarea şi răcirea carcaselor, spaţii caracterizate prin o microfloră a aerului bogată cantitativ şi calitativ;

4. Gradul de contaminare a aerului din spațiile de lucru a crescut concomitent cu creşterea numărului de carcase procesate;
5. Studiul efectuat, cu toate ca s-a limitat doar la o parte din microorganismele ce pot alcătui microflora aerului, confirmă importanța calității aerului din spațiile de lucru ca sursă de contaminare microbiană a carcaselor şi accentuează necesitatea controlului microflorei aerului prin mijloace directe şi indirecte, în vederea obținerii unor caracase de pasăre de calitate.

BIBLIOGRAFIE

1. Abu Ruwaida, A. S., Sawaya, W. N., Dashti, B. H., Murad, M., Al Othman, H. A. 1994. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. *Journal of Food Protection.* 57(10):887-892.
2. Bolton, K. J., Dodd, C. E. R., Mead, G. C., Waites, W. M. 1988. Chlorine resistance of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants. *Letters in Applied Microbiology*. 6(2):31-34
3. Dodd, C. E. R., Mead, G. C., Waites, W. M. 1988. Detection of the site of contamination by *Staphylococcus aureus* within the defeathering machinery of a poultry processing plant. *Letters in Applied Microbiology.* 7(3):63-66.
4. Fluckey, W. M., Sanchez, M. X., McKee, S. R., Smith, D., Pendleton, E., Brashears, M. M. 2003. Establishment of a microbiological profile for an air-chilling poultry operation in the United States. *Journal of Food Protection*. 66:272-279.
5. Mead, G. C. 1989. Hygiene problems and control of process contamination. p. 183 - 220. *In* Mead, G. C. (ed.), Processing of poultry Elsevier Applied Science, Barking, England.
6. Mead, G. C. 2000. Fresh and further-processed poultry. p. 445-471. *In* Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (ed.), The microbiological safety and quality of food vol. 1. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland.
7. Mead, G. C., Dodd, C. E. R. 1989. Incidence, origin and significance of *staphylococci* on processed poultry.
8. Mead, G. C., Dodd, C. E. R. 1990. Incidence, orgin and significance of *staphylococci* in processed poultry. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement.* (19):81S-91S.
9. Şindilar, E., Bondoc, I., Şindilar, E. V. 1997. Unele aspecte privind sursele de poluare microbiană a carcaselor de pui broiler I. *Lucrări Ştiinţifice USAMV*. 40:88.
10. Şindilar, E., Bondoc, I., Şindilar, E. V. 1997. Unele aspecte privind sursele de poluare microbiană a carcaselor de pui broiler II. *Lucrări Ştiinţifice USAMV*. 40.
11. Şindilar, E., Grecianu, A., Verdeş, E., Carp-Cărare, M. 1988. Izolarea şi identificarea microflorei psichrotrofe de pe carcasele de pasăre conservate prin frig. *Lucrări Ştiinţifice I.A. Iasi*. 31:81-83.
12. Whyte, P., McGill, K., Monahan, C., Collins, J. D. 2004. The effect of sampling time on the levels of micro-organisms recovered from broiler carcasses in a commercial slaughter plant. *Food Microbiology*. 21(1):59-65

ASPECTE EPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECŢIA CU *BRUCELLA OVIS* ÎN JUDEŢUL CLUJ

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF *BRUCELLA OVIS* INFECTION IN THE AREA OF CLUJ COUNTY

OLELEU Ana-Maria, RĂPUNTEAN Gh., OLELEU I.
USAMV Cluj-Napoca

The epidemiological study was performed during the 1999-2007 period, the analysis being made just for the cases that were confirmed by serologic laboratory investigations. Regarding spatial dissemination the outbreaks were distributed in the entire territory of the county. From the 80 Veterinary Practices situated in the county of Cluj, disease outbreaks were recorded in 77 (96,25%). During the study period a total number of 5483 seropositive cases were investigated. Correlated with the total number of samples that were examined during the entire period (113215 samples) a prevalence of 4,84% was obtained. In terms of temporal distribution, the illness was recorded in each study year. The annual prevalence had values situated between 19,48% during 2002 (the higher recorded value) and 0,71% during 2005 (the lower recorded value). From the syntethised data on each year, we can see that during campaign I –before breeding (july-august) the number of centers increased in comparison with the second campaign – after breeding (november-december), which demonstrates that the antiepidemic measures aplyed were efficient. We can see links between same centers or different centers, but nearly situated, during the same year or even for a few years. Analising the stationary or the repetitive character of the infection inside the centers, we can state the followings: centers in wich the infection is mentained 9 years: 11 local veterinary districts; centers with 1 year interruption: 8 local veterinary districts; centers with 2 years interruption: 18 local veterinary districts; centers with 3 years interruption: 10 local veterinary districts; centers with 1-4 years interruption period: 21 local veterinary districts; centers with no infection: 3 local veterinary districts. In Cluj infectious orhiepidydmitis of rams is endemic, fact established after serological tests.

În contrast cu progresele ştiinţifice substanţiale asupra biologiei germenilor, reactivităţii organismului şi epizootologiei bolii, care stau la baza principiilor de combatere şi eradicare, infecţia cu Brucella ovis continuă să aibă o răspândire mare, importanţa bolii fiind exclusiv economică şi se caracterizează prin deprecierea berbecilor care nu mai pot fi utilizaţi la montă şi scăderea natalităţii care devine evidentă în efectivele în care procentul de infecţie la berbeci depăşeşte 10%.

Intensificarea creşterii animalelor pare să favorizeze răspândirea maladiei. Distribuţia orhiepididimitei infecţioase în zone bine conturate de infecţie poate fi explicată prin faptul că anumite efective sunt izolate, în timp ce pentru altele păşunile sunt comune pentru diverse efective cu statut sanitar necunoscut. Contaminarea unui efectiv indemn clinic şi serologic se realizează mai ales din surse exogene introduse recent prin animale de ambele sexe. Se poate întâmpla totuşi ca într-un efectiv declarat asanat în care creşterea se practică în circuit închis, să se înregistreze după 2-4 ani cazuri confirmate de bruceloză prin reactivare endogenă sau prin animale cu stare de toleranţă imunologică la data eradicării brucelozei. Fenomenul toleranţei ocupă în momentul de faţă un loc central în biopatologia brucelozei.

Epididimita infecţioasă a berbecilor sporeşte ca frecvenţă în sezonul de montă şi în perioada imediat următoare.

Este o boala infecţioasă enzootică, cu evoluţie obişnuit cronică, ce afectează ovinele, în special masculii, manifestată prin diminuarea fertilităţii, epididimită sau orhiepididimită şi inaparent la femele, uneori prin avort, naştere de miei debili şi sterilitate temporară.

Brucella ovis este o specie monopatogenă, afectând doar specia ovină. Nu se cunosc cazuri de îmbolnăvire produse de această specie la om sau alte animale.

Sursa principală de infecţie este reprezentată de către berbecii infectaţi, adesea purtători inaparenţi şi mai putin de către oi, la care infecţia este tranzitorie, ele se autosterilizează în câteva luni după contaminare (Bulgin; 1990).

Diagnosticul în orhiepididimita infecţioasă a berbecilor se bazează pe coroborarea datelor obţinute în urma examenului clinic, bacteriologic (izolarea *Brucellei ovis* din spermă) şi serologic

(rezultate pozitive în probele de sânge)(Alton şi col.,1988). Pe de altă parte, trebuie avută în vedere situaţia epidemiologică a exploataţiei, date legate de reproducţie, vaccinări şi antecedentele de orhiepididimită. Totuşi diagnosticul unui animal cu epididimită este doar orientativ, pentru confirmarea bolii trebuie făcut un examen diferenţial. La noi în ţară orhiepididimita infecţioasă a berbecilor produsă de *B. ovis*, trebuie diferenţiată faţă de infecţiile cu *Arcanobacterium pyogenes (Corynebacterium pyogenes)* cu care poate evolua uneori împreună şi faţă de infecţiile cu *Actinobacillus spp*. Diferenţierea certă în aceste cazuri este posibilă numai prin examen bacteriologic.

În caz de confirmare a bolii, toate animalele cu semne clinice şi cele serologic pozitive se elimină, se efectuează dezinfecţii, iar restul animalelor se examinează clinic şi serologic şi în funcţie de rezultate se decide situaţia lor.

Asanarea se consideră încheiată când la două examene complexe şi consecutive, efectuate trimestrial, nu se mai depistează animale bolnave.

Instalarea infecţiei cronice este un rezultat al capacităţii de supravieţuire în celulele fagocitatre a *Brucellei ovis* care o ţin la adăpost de mecanismele extracelulare ale gazdei de apărare cum ar fi complementul şi anticorpul.

Dinamica îmbolnăvirilor în focar caracterizează epididimita ca enzootie cu difuzibilitate limitată, cu extindere lentă, mai mare în sezonul de montă şi în perioada imediat următoare.

Contribuţia laboratorului este indispensabilă pentru confirmarea diagnosticului.

Rezultatul negativ în urma examenului bacteriologic nu exclude prezenţa *B. ovis*, dată fiind natura cronică a bolii în care germenii se elimină intermitent sau nu se elimină de loc.

În România, pentru orhiepididimita infecţioasă a berbecilor Programul Naţional de supraveghere prevede - supravegherea serologică prin RFC sau ELISA.

Reacţia de fixare a complementului este cel mai utilizat test şi este recomandat ca tehnică de referinţă pentru schimburi internaţionale. Sensibilitatea şi specificitatea acestuia depind de antigenele utilizate, de temperatura de incubare a primei faze (tehnica la rece sau la cald) şi de durata de incubare.

MATERIALE ŞI METODE

Scopul prezentei lucrări este acela de a determina incidenţa şi prevalenţa infecţiei cu *Brucella ovis* la berbecii reproducători din arealul judeţului Cluj, unde boala evoluează endemic, în perioada 1999 – 2007.

Ca surse de informaţie am utilizat datele statistice cumulate pe o perioadă de 9 ani, 1999 – 2007, existente la Direcţia Sanitară Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor Cluj.

Culegerea datelor s-a făcut din arhiva Laboratorului Sanitar Veterinar de Stat Cluj, conform metodelor epidemiologice clasice.

Materialul este reprezentat de populaţia de berbeci reproducători din judeţul Cluj, probele de ser şi de testicule provenite de la aceştia.

În perioada menţionată, controalele s-au realizat în circumscripţiile sanitar – veterinare (C.S.V.) din judeţ, conform programului naţional de supraveghere sanitar veterinar, iar analizele s-au efectuat în cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar de Stat Cluj, Secţia Serologie bacteriană.

Pe parcursul celor 9 ani, din cele 80 de circumscripţii sanitare-veterinare existente pe raza judeţului Cluj, în marea majoritate s-au semnalat cazuri de orhiepididimită infecţioasă cu Brucella ovis, cel puţin odată sau chiar ani la rând.

Examenul serologic pentru orhiepididimită infecţioasă a berbecilor, în laboratoarele sanitare veterinare de stat judeţene (LSVS-uri) se efectuează în prezent numai prin reacţia de fixare a complementului (RFC), tehnica de lucru omologată în cadrul Institutului de Diagnostic şi Sănătate Animală Bucureşti (18).

În perioada luată în studiu, cuprinsă între anii 1999-2007 s-au recoltat de la efectivele de berbeci din judeţul Cluj de către medicii veterinari concesionari un total de 113.215 probe de sânge, care au fost expediate la LSVS Cluj pentru diagnostic serologic prin RFC pentru Orhiepididimita infecţioasă a berbecilor.

Datele le-am sintetizat pe ani, în fiecare an – campania I – înainte de montă (perioada iulie-august) şi campania II – după montă (perioada noiembrie-decembrie), conform programului strategic național de supraveghere.

Raționamentul acestei programări este următorul: în cele 2 săptămâni de dinaintea montei, berbecii seropozitivi trebuie neapărat excluşi din efectiv (castrați, sacrificați) pentru a împiedica participarea lor la reproducție, infectarea oilor şi a altor berbeci. La examenul serologic de după sfârşitul perioadei de montă vor fi depistați berbecii care s-au pozitivat în această perioadă, astfel şi ei vor fi scoşi din efectiv. Testiculele de la berbecii sacrificați sau castrați trebuie să ajungă la LSVSJ şi de aici la IDSA, astfel dovedindu-se că animalele seropozitive s-au scos întradevăr din efectiv, deci s-a eliminat veriga cea mai importantă a lanțului epidemiologic.

În perioada luată în studiu (1999 - 2007), prețul de cost al examenelor serologice în direcția epididimitei ovine a fost suportată din bugetul de stat.

Deoarece orhiepididimita infecțioasă a berbecilor nu se transmite la om şi are importanță exclusiv economică, nu întotdeauna i s-a acordat atenția cuvenită. Astfel se poate explica dinamica ascendentă, descendentă şi iarăşi ascendentă a bolii în perioada studiată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatul investigațiilor serologice, numărul de probe pozitive şi incidența procentuală a infecției în efectivul de berbeci examinat, în funcție şi de structura de proprietate este prezentat mai jos.

Tabel nr. 1. Evoluţia numărului de focare şi al probelor în perioada studiată

Anul	Nr. focare	Nr. probe	Pozitive	
			Nr.	%
1999	35	8340	483	5,79
2000	59	10202	764	7,48
2001	37	12772	272	2,12
2002	71	10871	2118	19,48
2003	62	12848	642	4,99
2004	52	14293	404	2,82
2005	32	13361	96	0,71
2006	56	14456	267	1,84
2007	64	16072	437	2,71

Analiza distribuției spațiale a focarelor existente, în perioada luată în studiu, a permis să se constate o amplasare a acestora de o manieră grupată, ceea ce denotă existența unor posibilități de contaminare directe, ca urmare a schimburilor sau vânzărilor de ovine, în deosebi a berbecilor de reproducție, purtători şi eliminatori.

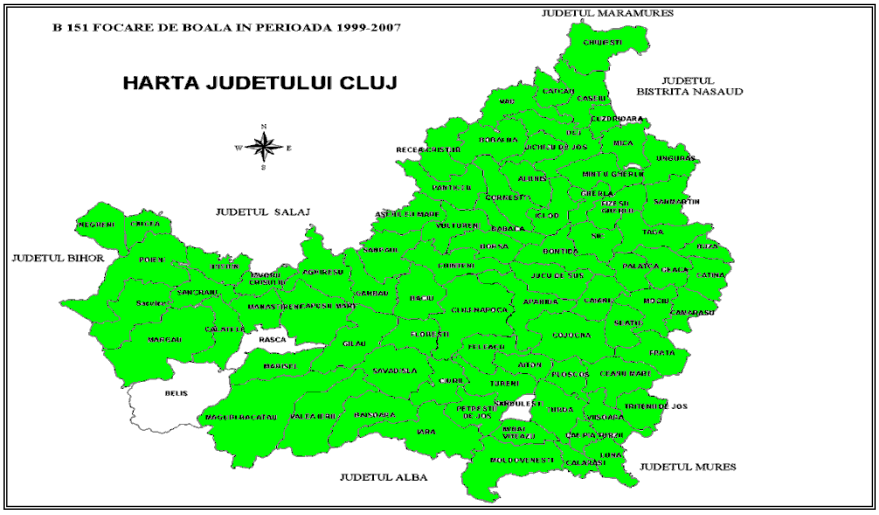


Fig. nr. 1 . Evoluţia focarelor în perioada studiată

După cum reiese din fig. nr.1 , în perioada luată în studiu 1999-2007, din cele 80 de circumscripţii sanitar-veterinare, doar 3 circumscripţii, respectiv Călăţele, Râşca şi Sănduleşti au fost indemne la infecţia cu *Brucella ovis*. În rest cele 77 de circumscripţii sanitar-veterinare au prezentat pe parcursul celor 9 ani infecţia cu *Brucella ovis*, după cum urmează:

Tabel nr. 2. Evoluţia focarelor în perioada 1999-2007

Nr. Ani	**Nr. CSV**	**Nr. Ani**	**Nr. CSV**
Lipsa infecţiei	3	5 ani	9
1 an	5	6 ani	10
2 ani	1	7 ani	18
3 ani	8	8 ani	8
4 ani	7	9 ani	11

Ciobanul tipic acceptă să păzească oile proprietarilor care în anii precedenţi au fost în alte turme, chiar pe raza altor localităţi. Tot el face foarte uşor schimburi şi achiziţii de animale, fără să cunoască statusul de sănătate a animalelor introduse în turmă. Dacă află despre vreun berbec „bun" din turma lui că ar fi bolnav de orhiepididimită, ori prezintă spre castrare un alt berbec, care nu-i place şi îl păstrează pe cel bolnav în efectiv, ori scapă de el fără urmă (prin schimbarea sau vânzarea lui), înainte ca autoritatea veterinară să poată interveni eficient, astfel introduce odată cu berbecul şi boala în turma altuia.

Sunt cazuri când nu se declară numărul real de berbeci reproducători din efectiv, astfel că unii masculi, posibil bolnavi, scapă examenului serologic. Alteori chiar medicul veterinar din comoditate nu recoltează sânge de la toţi berbeci, din efectiv ci doar de la câţiva. Printre berbeci omişi pot exista seropozitivi, care vor menţine infecţia în efectiv.

Ipostazele prezentate mai sus ajută la înţelegerea modului de apariţie a noilor focare sau persistenţa ani la rând a bolii în unele turme, deşi berbeci diagnosticaţi seropozitivi s-au castrat/sacrificat în fiecare an.

Toate acestea erau posibile şi din cauza proastei educaţii a celor implicaţi şi lipsei unor mijloace de identificare permanentă a animalelor. Astfel se explică de ce numărul focarelor a crescut , chiar dacă numărul berbecilor seropozitivi a scăzut.

CONCLUZII

1. În judeţul Cluj orhiepididimita infecţioasă a berbecilor evoluează endemic, aspect stabilit în urma efectuării examenelor serologice.
2. Din datele sintetizate, pe fiecare an, reiese că în campania I – înainte de montă (perioada iulie-august) numărul focarelor este mai mare comparativ cu campania a II-a – după montă (perioada noiembrie-decembrie), ceea ce denotă că măsurile antiepidemice aplicate au fost eficiente.
3. Prevalenţa cazurilor pozitive în efectivul de berbeci din judeţul Cluj în perioada 1999-2007 poate fi caracterizată ca infecţie slabă (când valoarea este sub 3%) în anii 2001, 2004, 2005, 2006, 2007; infecţie de intensitate medie (când valoarea este sub 10%) în anii 1999, 2000, 2003; infecţie foarte intensă (când valoarea depăşeşte 10%) în anul 2002.
4. Boala a avut o evoluţie ascendentă în anii 1999-2000, pentru ca în anul 2001 evoluţia să scadă, iar în anul 2002 evoluţia bolii să crească brusc (în acest an s-a înregistrat numărul cel mai mare de cazuri), pentru a scădea progresiv în ani 2003-2005 datorită măsurilor antiepidemice aplicate, ulterior în anii 2006-2007 boala înregistrând din nou o evoluţie uşor ascendentă.
5. Pe parcursul celor nouă ani de studiu reiese că din cele 80 de circumscripţii sanitar veterinare existente, 77 au prezentat infecţie cu Brucella ovis, ceea ce reprezintă un procent de 96,25% din suprafaţa judeţului Cluj.
6. Crescători de ovine trebuie să fie informaţi despre importanţa economică a bolii, căile şi modurile de transmitere, cât şi posibilităţile de luptă antiepidemică, lucru ce se poate realiza prin organizarea de cursuri de instruire.
7. Conştientizarea medicilor veterinari practicieni despre rolul lor în realizarea screening-ului de la nivelul populaţiei de ovine şi aplicarea cu rigurozitate a măsurilor de profilaxie nespecifică şi de combatere a bolii.

8. Identificarea şi înregistrarea ovinelor prin crotaliere, cât şi ținerea unei evidențe informatizate la nivelul circumscripțiilor veterinare pentru a se asigura cunoaşterea exactă a efectivelor, a mişcărilor de animale şi trasabilitatea.
9. Eliminarea cât mai rapidă a animalelor depistate ca pozitive din efectiv, pentru a nu se permanentiza sursele de infecție şi despăgubirea corespunzătoare a proprietarilor, pentru ca aceştia să fie co-interesați în aplicarea măsurilor de combatere.
10. Cu toate că numărul animalelor pozitive serologic se reduce după anul 2002, numărul focarelor a crescut uşor în 2007, ceea ce demonstrează că mişcarea animalelor nu este stăpânită.
11. Sursa principală de infecție este reprezentată de către berbecii infectați, adesea purtători inaparenți şi mai puțin de către oi, la care infecția este tranzitorie, ele se autosterilizează în câteva luni după contaminare.
12. Dinamica îmbolnăvirilor în focar caracterizează epididimita ca enzootie cu difuzibilitate limitată, cu extindere lentă, mai mare în sezonul de montă şi în perioada imediat următoare.

BIBLIOGRAFIE

1. Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus, J.M. Verger (1988). Brucella ovis, Techniques for brucellosis laboratory, INRA, Paris.
2. Aldridge M., – (1982) Brucella Ovis Infections in Sheep The Compendium, 4, (11), Continuing Education Article, nr.8. [pagina / internet]
3. Berrier J. Randal – (2002) Ram Epididymitis – Veterinarian ′s Corner, 2,(1)
4. Boldizsar E., Răpuntean S., Fiţ N. (2002). Microbiologie generală – Practicum – Ed. Genesis Tipo Cluj-Napoca, 83-85.
5. Bulgin M.S.(1990$_c$). Epididymitis in rams and lambs. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract., 6: 683-690.
6. Cătoi C. – (2003) Diagnostic Necropsic Veterinar, Editura Academic Press, Cluj – Napoca, –p. 355 – 358
7. Gaffuri A., Garbarino C. – (1999) Brucella ovis, control and eradication plan in Lombardy, 2 (2), [pagina Brucella ovis/ internet]
8. Gall D., Nielsen K. şi col. – (2003) Evaluation of an indirect enzyme – linked immunoassay for prezumptive serodiagnosis of Brucella ovis in sheep, Small Ruminant Research, 48, –p. 173 – 179, [pagina Brucella ovis in Sheep – Evaluation…/ internet]
9. Moga Mânzat R. şi col. – (2001) Boli Infecţioase ale Animalelor–Bacterioze, –Editura Brumar, Timişoara, –p. 105 – 109
10. Perianu, T. – (2003) Boli Infecţioase ale Animalelor, Bacterioze, vol.I –Editura Venus, Iaşi, –p. 120 – 126
11. Rădulescu, Ruxandra; Petriceanu, Geta; Alexandru, Valeria Elisabeta; Răgălie, Adriana – Ghid practic pentru diagnosticul serologic al brucelozei – Institutul de diagnostic şi sănătate animală (IDSA), Secţia Serologie – 2002. –p. 19 – 27
12. Răpuntean Gh. – (2007) Epidemiologie generală veterinară, Editura Academic Press, Cluj – Napoca
13. Răpuntean Gh., Răpuntean S. – (2005) Bacteriologie specială veterinară, Editura Academic Press, Cluj – Napoca,
14. Vasiu, C. – (2001) Bacterioze la animale, Editura Academic Press, Cluj – Napoca, –p. 393 – 397
15. ××× – Autoritatea Naţională Sanitar – Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor – Brucelloza (la ovine – infecţia cu Brucella ovis)
16. ××× – Breeding Soundness Examination of the Male: Introduction – Merck Vet. Edition 2003 –p. 3, [pagina merckvetmanual…/ internet]
17. ××× – Brucellosis in Sheep, (2003) [pagina www.merckvetmanual.com/ internet]
18. ××× – Office International des Epizooties (OIE) (2004) – Ovine epididymites (*Brucella ovis*), Chapter 2.4.1. in manual of diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004.

DIAGNOSTICUL COMPARATIV AL HIDATIDOZEI LA BOVINE SACRIFICATE ÎN ABATOR

COMPARATIVE DIAGNOSTIC OF HIDATIDOSIS IN BOVINES SACRIFICED IN ABATTOIR

ONAC Diana, TITILINCU Adriana, COZMA V.
USAMV Cluj-Napoca
dianaonac@yahoo.com

Major parasitical zoonosis, hydatidosis is one public health problem, with tendency of relapse and mortality, producing great sufferance.

The purpose of this study was the obtaining of a diagnostic method with higher sensitivity and specificity in bovines natural infected with Echinococcus granulossus and to evaluate the validity of necropsy as a reference test.

At 33 bovines (sacrificed in abattoir) it was tested an ELISA kit, a German product (NovaTec) for human use, which was standardized for bovines by replacement the conjugate from the kit with conjugate anti-species and increasing the time for incubation at 60 minutes.

At necropsy, the hydatic cists were identified 65% in the liver and to 35% of the animals both in liver and lungs. At intradermic reaction, 10 bovines were positive. ELISA enzyme immunoassay was positive at 60,6% of tested animals, the maximum being 29,67 NTU; 27,27% were between 9 and 11 NTU, the results being dubious and 12,12% negative. The minimum titer was 7,45 NTU.

The statistic evaluation of the dates reveal that the sensitivity of IDR comparing necropsy was 80%, and the specificity of 78,26%. For ELISA enzyme immunoassay the sensitivity was 82,75% and specificity 50%.

Zoonoză parazitară majoră, hidatidoza reprezintă o problemă de sănatate publică, cu tendinţă de recidivă şi mortalitate deloc neglijabilă, provocând mari suferinţe. Adaptarea lui E. granulossus la o varietate mare de specii de gazde definitive şi intermediare, precum şi la transporturile repetate ale animalelor domestice din Europa către alte zone de pe glob a avut drept rezultat distribuţia geografică a acestui cestod pe o arie extrem de largă.

Studiile epidemiologice referitoare la bolile transmisibile ale animalelor necesită cunoaşterea agenţilor patogeni, modalităţilor de diseminare a elementelor contaminante, căilor de transmitere, nivelului de receptivitate şi sensibilitate a indivizilor expuşi riscului.

Hidatidoza este o boală ubicvitară, fiind întâlnită practic pe toate continentele, existând puţine ţări în care boala a fost eradicată (Islanda, Cipru). În România, se constata o incidenţă de 22,19% la bovine, 13,1% la ovine, 7,23% la porcine şi 12,2% la cabaline. Actualul nivel de cunoaştere indică existenţa a patru specii ale genului Echinococcus: E. granulosus, E. multilocularis, E. oligarthus şi E. vogeli (Coman I., 2006).

Se consideră că cel puţin 50 de specii de ierbivore sau omnivore pot fi parazitate de forma larvară a diferitelor specii, subspecii şi variante de Echinococcus. Ovinele sunt considerate gazde intermediare de importanţă majoră. Frecvenţa parazitării, gradul ridicat de fertilitate a chiştilor şi interrelaţia elocventă între cazurile de hidatidoză umană şi ovină subliniază acest fapt, iar bovinele au un rol mai puţin important în epidemiologia hidatidozei datorită faptului că majoritatea chistelor hidatice sunt sterile.

În hidatidoză, pe plan mondial au luat un avânt deosebit cercetările privind diagnosticul timpuriu al parazitozei la animale şi om, precum şi studiile privind chimioterapia hidatidozei. In direcţia diagnosticului bolii, între 1970 – 1980 s-a perfecţionat testul imunoenzimatic ELISA, cu sensibilitate şi specificitate variind între 90 – 95 % la gazdele definitive.

Pe plan naţional, cercetarile în hidatidoză sunt axate pe trei domenii importante: epizootologie – epidemiologie, diagnostic şi chimioterapie. Diverse studii relevă o extensivitate între 60 – 100 % a bolii la taurine şi ovine, pentru ca la porcine incidenţa parazitozei să fie între 2 – 20 % (Mitrea I. L., 1999).

OBIECTIVE

Prin testările efectuate la animalele luate în studiu s-a urmărit determinarea eficacităţii diagnostice comparative a intra-dermoreacţiei (IDR), examenului necropsic şi testului ELISA în echinococoză.

ELISA este tehnica folosită cel mai mult, iar în cazul folosirii la rumegătoare metoda se dovedeşte cu mare sensibilitate şi specificitate. Problema necesară a acestei metode se dovedeşte a fi standardizarea şi conservarea antigenelor folosite. La gazdele intermediare reacţia ELISA pune în evidenţă Ig G care reacţionează cu un antigen glico-proteic de 8 kda, izolat din lichidul hidatic al veziculelor fertile(Euzeby, 1998).

Testul Casoni se bazează pe interacţiunile tisulare declanşate de complexele imune având ca prototip fenomenul Arthus. Atât la animale cât şi la om nu există o corelaţie directă între intensivitatea parazitismului şi nivelul reacţiei locale, astfel că nu se poate face deosebire între animalele care conţin chisturi hidatice vii, de dimensiuni mari, mici sau degenerate.

MATERIAL ŞI METODĂ

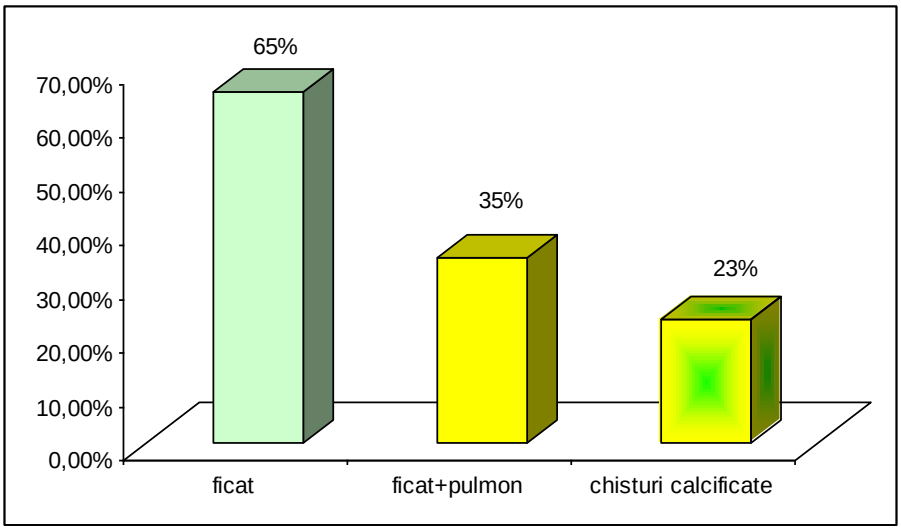
Acest studiu epidemiologic a fost realizat la două abatoare din judeţele Bistriţa-Năsăud şi Alba, pe un număr total de 33 de bovine. Testările au fost realizate în perioada octombrie-decembrie 2007.

Examenul necropsic a fost realizat prin inspecţia şi palparea organelor interne. Intradermoreacţia s-a realizat prin inocularea la baza cozii a 0,2 ml lichid hidatic, recoltat de la o bovină diagnosticată cu echinococoză chistică. Citirea intradermoreacţiei s-a realizat la 30 de minute de la administrarea antigenului prin măsurarea chiştilor formaţi, prin inspecţie şi palparea zonei de inoculare.

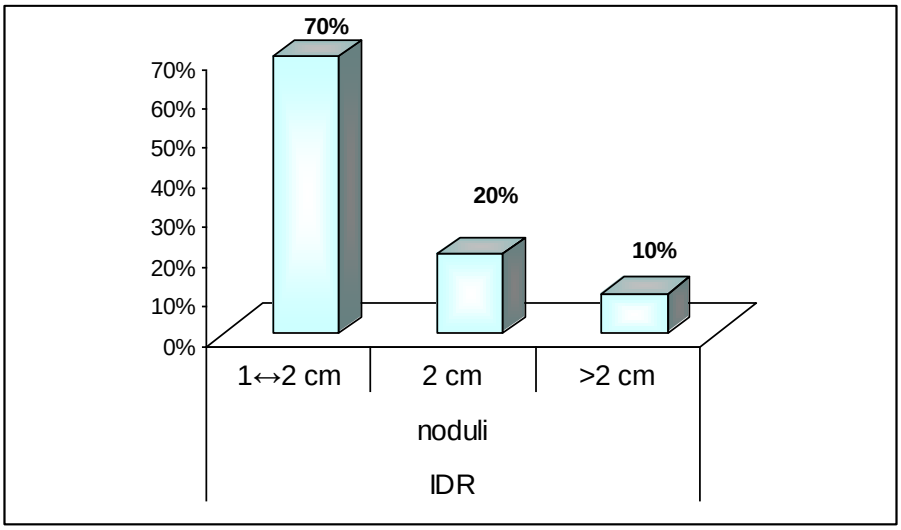
S-a testat o trusă ELISA produsă de firma germană NovaTec pentru uz uman. S-a folosit această trusă datorită faptului că pe piaţa mondială nu există truse ELISA pentru uz veterinar pentru testarea statusului imunitar la gazdele intermediare. În cazul nostru s-a adaptat această trusă pentru animale prin înlocuirea conjugatului din trusă cu conjugat anti-specie. Înainte de efectuarea testului ELISA s-a făcut tatonarea conjugaţilor pentru a se ajunge la diluţiile corespunzătoare pentru pozitivarea testului. S-au luat în lucru diluţii succesive, astfel: 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:50000 şi 1:100000. În urma tatonărilor s-a stabilit faptul că diluţiile corespunzătoare ale conjugaţilor sunt de 1:100000 pentru bovine. Serurile au fost preparate după instrucţiunile kitului 1:100 cu soluţie de diluare. Au fost adăugate serurile pe placă astfel: primul godeu a fost blank-ul (s-a pus numai soluţia de diluare a serurilor), în al doilea godeu martorul negativ, în al 3-lea martorul pozitiv, în al patrulea godeu cut-off-ul şi în continuare serurile de cercetat. Placa a fost incubată pentru o oră la 37°C, s-a făcut spălarea fiecărui godeu de 3x cu soluţie de spălare, după care s-au adăugat conjugaţii. Au fost adăugaţi în diluţiile alese conjugaţii anti-specie, câte 100µl, cu precizarea că primul godeu a rămas fără conjugat, în următoarele 3 godeuri s-au adăugat conjugaţii furnizaţi cu kitul, iar în următoarele s-a folosit conjugat anti-bovine. Godeurile care conţineau conjugaţii anti-bovine au fost incubate pentru o oră la 37°C, iar cele în care am avut martorii furnizaţi de către kit au fost incubate doar pentru 30 de minute. Următorul pas a fost spălarea fiecărui godeu de 3x cu soluţie de spălare, adăugarea substratului TMB în toate godeurile şi incubarea pentru 15 minute la temperatura camerei şi la întuneric. După incubare s-a adăugat soluţia de stopare a reacţiei în ordinea în care a fost adăugat şi substratul. În momentul adăugării soluţiei de stopare culoarea din godeurile pozitive a virat de la albastru în galben. S-a măsurat absorbanţa la o lungime de undă de 450/620 nm într-un interval de 30 de minute de la adăugarea soluţiei de stopare. Rezultatele se exprimă în unităţi NovaTec şi se calculează în funcţie de rezultatul cut-off-ului după următoarea formulă: absorbanţa serului x 10/cut-off. Rezultatele pozitive se consideră a fi cele cu valoarea peste 11, cele negative sub 9, iar cele situate între 9-11 sunt considerate rezultate dubioase şi trebuiesc retestate într-un interval de 2-4 săptămâni.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

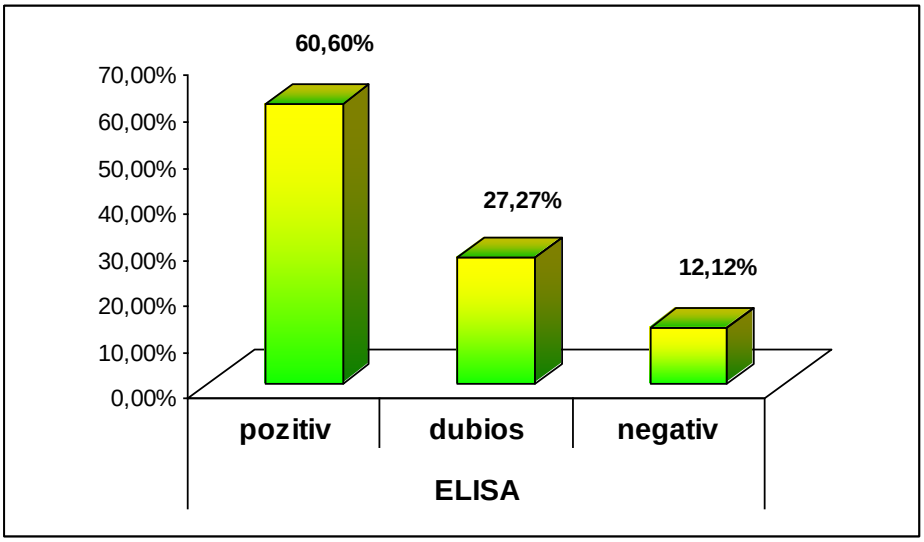
Pentru interpretarea rezultatelor, examenul necropsic a fost luat în considerare ca fiind testul standard în functie de care am evaluat sensibilitatea şi specificitatea intradermoreacţiei şi a testului Elisa. Pentru interpretarea statistică a datelor am utilizat softul Episcope 2.0.



La examenul necropsic, cea mai mare pondere a chisturilor hidatice a fost în ficat (65% din totalul de bovine luate în studiu), iar la restul de 35% bovine au fost identificaţi chişti hidatici atât în ficat cât şi în pulmoni. La un total de 23% bovine examinate chisturile hidatice erau cazeificate sau în curs de calcificare.



În urma efectuării reacţiei intradermice, la 10 bovine s-a observat o reacţie pozitivă. La majoritatea animalelor s-a observat formarea unor noduli de dimensiuni mici de aproximativ 1-2 cm. La 20% dintre animalele cu reacţie pozitivă am identificat noduli de aproximativ 2 cm, edem păstos şi la unele cazuri eritem. La un singur caz s-a observat formarea de nodul eritematos, edem păstos şi cu centrul violaceu.



Testul imunoenzimatic ELISA a fost pozitiv la 20 de animale testate (60,6%), titrul maxim al anticorpilor fiind de 29,67 NTU. 9 animale (27,27%) au avut titrul anticorpilor situat între 9 şi 11 NTU, rezultatele fiind dubioase. Aceste animale ar trebui retestate, dar cum au fost abatorizate, acest lucru nu a fost posibil. Doar la 4 bovine (12,12%) titrul anticorpilor a fost situat sub valoarea de 9 NTU, animalele fiind considerate negative. Titrul minim al anticorpilor a avut valoarea de 7,45 NTU.

Relaţia dintre animalele pozitive la examenul necropsic, la intradermoreacţie şi cele pozitive la ELISA coincide în proporţie de 24,24%. 16 animale (48,48%) au dezvoltat un răspuns pozitiv la testul ELISA şi au avut chişti hidatici la examenul necropsic, dar nu au prezentat o reacţie pozitivă la IDR. 6,06% dintre bovine au fost diagnosticate cu chişti hidatici la examenul necropsi, dar IDR şi ELISA au fost negative. Acest lucru se datorează faptului că animalele în cauză fie aveau chişti hidatici în curs de cazeificare sau calcificare, fie titrul anticorpilor nu a fost destul de mare pentru a putea fi pozitivat la testul ELISA. Din totalul de bovine sacrificate, 9,09% au fost pozitive la ELISA şi negative la celelalte teste. Acest lucru se datorează eventual nedepistării chisturilor hidatice localizate în profunzimea organelor, sau o infecţie recentă în urma careia nu s-au dezvoltat încă chisturi.

În urma evaluării statistice a datelor obţinute cu cele trei teste utilizate am constatat faptul că sensibilitatea intradermoreacţiei comparativ cu examenul necropsic a fost de 80%, iar specificitatea testului de 78,26%.

Pentru testul imunoenzimatic Elisa s-a determinat o sensibilitate de 82,75% şi o specificitate de 50%.

Utilizarea diagnosticului necropsic ca test de referinţă pentru aprecierea sensibilităţii specificităţii este limitat, fapt demonstrat în acest studiu. Testele utilizate în screeningul populaţiilor de animale cu privire la echinococoza chistică ar trebui să includă teste cu o specificitate mai ridicată decât examenul necropsic (Western Blot, PCR, sau o trusă ELISA standardizată).

BIBLIOGRAFIE

1. Antonio Gatti, Angela Rosa Alvarez, Daniel Araya, Sergio Mancini, Eduarddo Herrero (2006) – Ovine echinococcosis. I. Immunological diagnosis by enzyme immunoassay, www. ScienceDirect.com
2. Coman I. (2006) – Hidatidoza la animale. *„Editura Risoprint”* Cluj-Napoca
3. Euzeby J.(1998) - Les parasites des viandes, Ed. M inter&DOC, Paris
4. Mitrea I. L.(1999) - Hidatidoza la om şi animale, Ed. Premier, Ploieşti

CUNNINGHAMELLA SPP. MICROMICET CU POTENŢIAL PATOGEN IZOLAT ÎN PREMIERĂ ÎN ŢARA NOASTRĂ

PANAGACHI-T. (Gogu) Mihaela[1], COMAN I. [1], MIRON L. [1], TARŢĂU Liliana[2], BOMPA C. [2], GOGU P.[3]

[1] FMV Iaşi

[2] UMF Iaşi

[3] DSVSA Iaşi

Genul Cunninghamella aparţine ordinului Mucorales şi include micromiceti oportunişti, ocazional patogeni, descoperiţi relativ recent şi s-a descris caracterul lor ubicvitar (aer, sol, furaje, ape uzate). Cunninghamella bertholletiae, agent al infecţiilor nosocomiale întâlnite în special la subiecţii cu statusul imunitar deficitar (leucemie, SIDA, diabet) sau post traumatic (transplant de maduvă osoasă, intervenţii chirurgicale), produce frecvent afecţiuni pulmonare fatale la trei din patru pacienti pe parcursul a doi ani (1,3, 4).

Genul cuprinde aproximativ zece specii, aria de raspândire fiind destul de largă, incluzând zone geografice îndepărtate (Brazilia, SUA, India, Japonia, Egipt, chiar şi în Germania). Cele mai importante fiind C. bertholletiae, C. echinulata, C. elegans etc. În ţara noastră specii ale acestui gen nu au fost izolate sau semnalate conform bibliografiei consultate. motiv pentru care în acest articol vor fi prezentate investigaţii, care au urmărit identificarea şi încadrarea taxonomică a unei suşe, izolate din furaje (grâu probabil de import) şi care pe baza caracterelor culturale poate fi încadrat în acestă grupare taxonomică. Semnalăm totodată probabil pentru prima dată în ţara noastră prezenţa proceselor sexuate la specia identificată (Cunninghamella spp.). (2, 5, 6, 7, 8)

Materiale şi tehnici de lucru

Material biologic:

- *Cunninghamella spp.*, culturi izolate din plăci Petri şi menţinute în stare pură pe medii selective lichide şi solide

Medii de cultivare:

- Potato Dextrose Agar (PDA) şi Sabouraud agar
- extract de cartof – mediu lichid

Tehnici de lucru:

- Caracterele culturale ale coloniilor izolate dezvoltate pe suprafaţa mediilor solide au fost evaluate şi apreciate în dinamică.
- În acest scop au fost efectuate preparate între lamă şi lamelă, colorate cu soluţie lactofenol. Acestea au fost examinate la microscop cu obiectivul x10, respectiv x40
- Pentru a surprinde secvenţialitatea evenimentelor biologice atât macroscopic cât şi microscopic culturile au fost examinate şi cu lupa stereomicroscopică

Rezultate şi discuţii:

Tulpina care a constituit obiectul acestui studiu a fost observată prima dată într-o placă Petri, pe mediu PDA, la temperatura de 25^{0}C, care a servit pentru stabilirea numărului de unităţi formatoare de colonii dintr-o probă de *grâu probabil de import*. Ceea ce ne-a atras atenţia a fost o formă particulară de manifestare a unui antagonism activ, între o colonie de *Penicillim spp.* şi cultura abundentă, exploziv dezvoltată de *Cunninghamella spp.*.

Ea a prezentat caractere morfoculturale inedite şi a surprins în primul rând capacitatea ei expansivă. Aşa cum se poate constata din fig. 1, 2 colonia este mare, rotundă, în nuanţe de roz-cenuşiu, cu aspect uşor floconos pe avers; reversul se menţine în tonuri mai terne de la crem la roz pal.

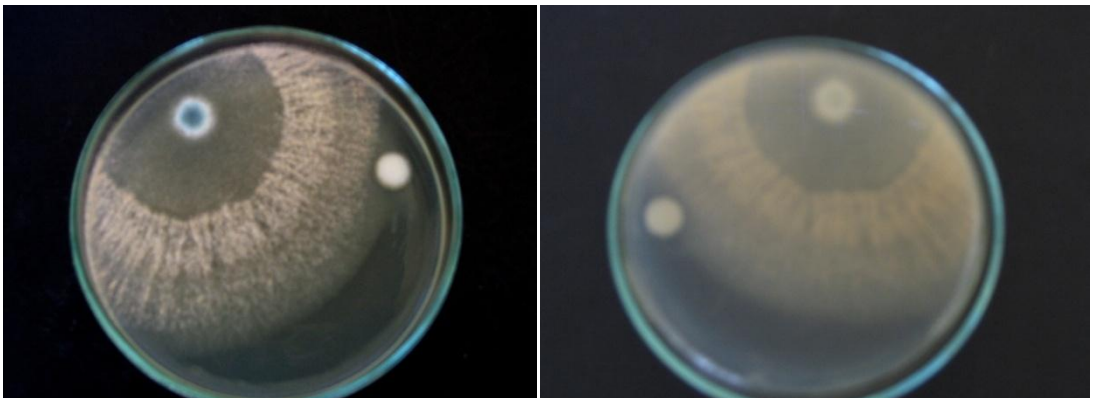


Fig. 13, 14 Antagonism activ între Cunninghamella spp. şi Penicillium spp.

Aspectele culturale au fost competate de examene la stereomicroscop, care au competat investigaţiile obţinute. (fig. 2 şi 3)

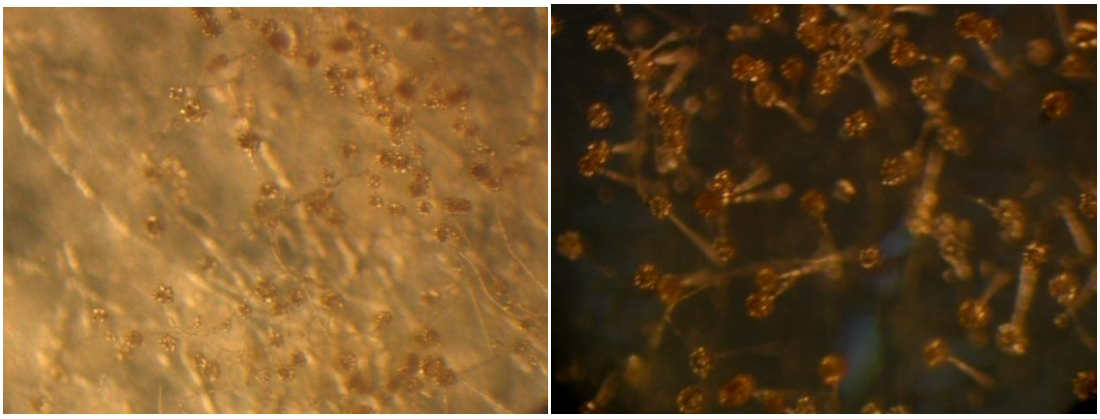


Fig. 2 şi 3 Cunninghamella spp. – aspecte stereomicroscopice

În preparatele efectuate pentru examenul micoscopic, au fost observate aspecte extrem de interesante şi spectaculoase; în primul rând a surprins prin prezenţa unor formaţiuni ce aminteau corola unei flori, situate la extremitatea unui filament gros, aparent nesegmentat. (fig 4, 5)

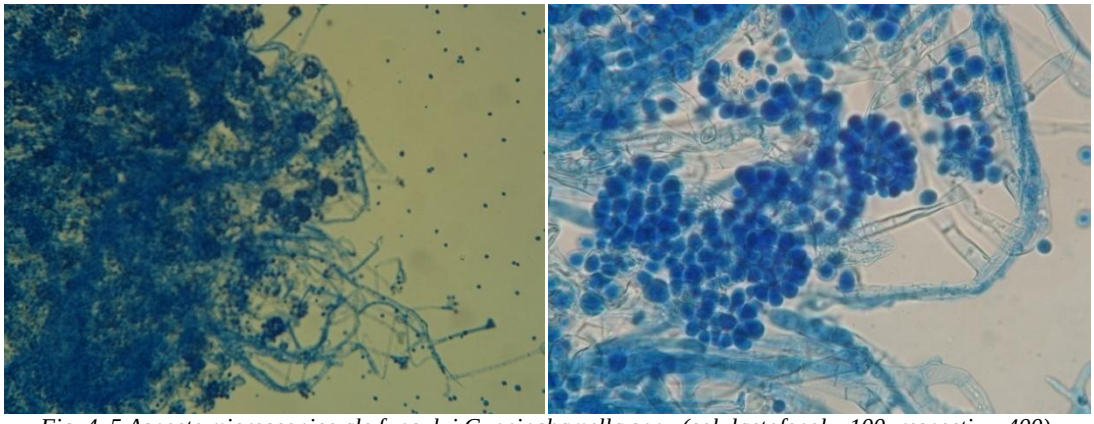
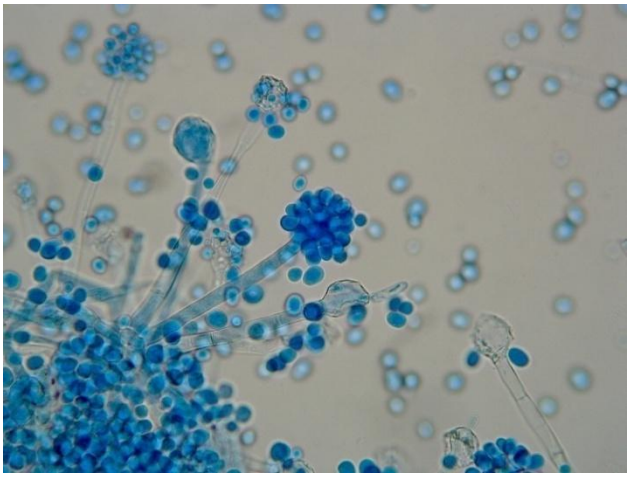


Fig. 4, 5 Aspecte microscopice ale fungului Cunninghamella spp. (col. lactofenol x 100, respectiv x 400)

Hifele sau filamentele sunt segmentate, şi colorate în nuanţe diferite de lactofenol. Printre ele se disting numeroase formaţiuni rotunde cu marginile uşor boselate precum şi sporangiofori surprinşi în diferite etape de formare.

Detaliile de structură observate cu obiectiv x40 (fig. 6), au fost mult mai generoase, pentru că ele au permis să se identifice, filamentele destul de groase, segmentate, precum şi prezenţa unor

formaţiuni rotunde, organizate simetric şi prinse pe un suport denticular, care s-au dovedit un sporangium cu aspect particular, asemănător sperangioforului de la Rhizopus (fig. 7), care include însă sporangiosporii în interiorul sporangiumului.



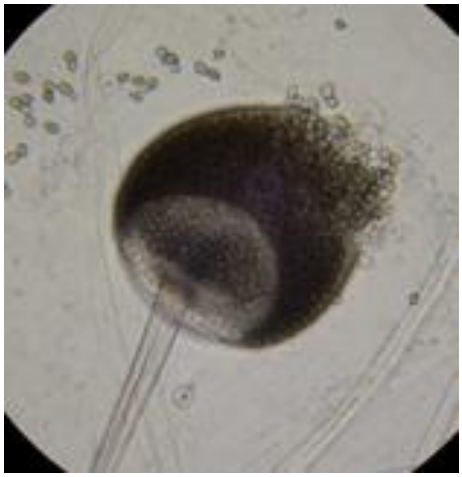


Fig. 6 Sporangiofori - Cunninghamella spp. Col. lactofenol x400

Fig. 7 Sporangiofor - Rhizopus spp. Col. lactofenol x400

Sforangioforii sunt forme de înmulţire vegetativă, asexuată, cu talul gros, septat, care prezintă la extremitate o dilataţie, asemănătoare unei columele, pe care se prind sporangiile care poartă un singur spor. Abundenţa sporangioforilor devine din ce în ce mai bine exprimată pe măsură ce colonia îmbătrâneşte astfel încât la 10 zile consecutiv acţiunii mecanice sporangioforii pierd mai uşor sporangiolele, care au membrană dublă, în locul lor rămânând columela sau vezicula cu cicatrici denticulare clare aşa cum se poate observa în fig. 8 şi 9.

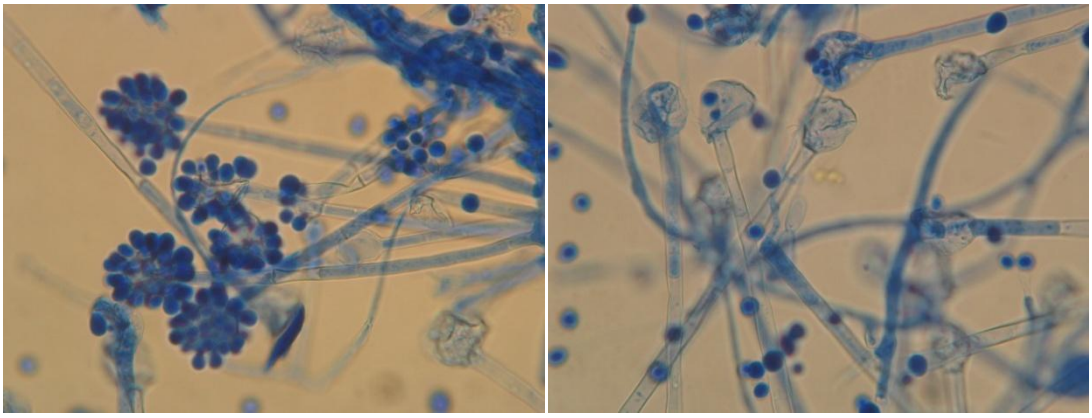
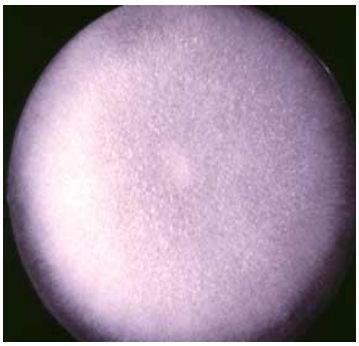


Fig. 8 şi 9 Sporangiofori cu ,,cicatrici'', Cunninghamella spp. col lactofenol x 400.

Confirmarea investigaţiilor noastre, că ne aflăm în faţa unei specii mai rar întâlnite, Cunninghamella spp., ne-a fost oferită de literatura de specialitate (după Hoog, 2000); în imaginile prezentate în fig. 11, 12 aspectul cultural şi mai ales cel morfologic al sporangioforului sunt identice cu cele descrise în preparatele executate din culturile tulpinei izolate.



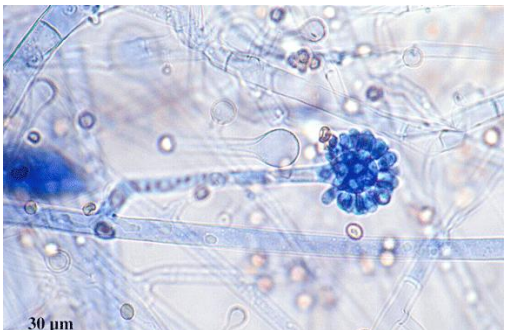
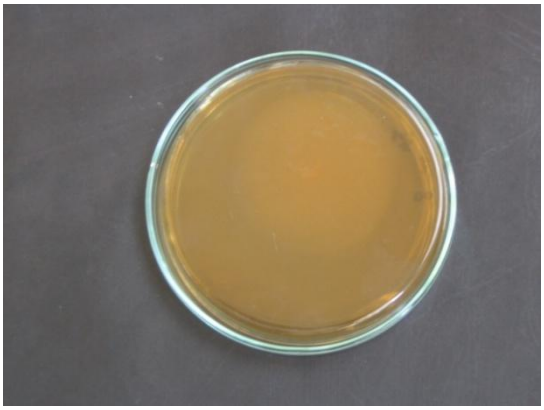


Fig. 11, 12 Cunninghamella bertholletiae aspect macroscopic şi microscopic (www.gefor.4t.com)

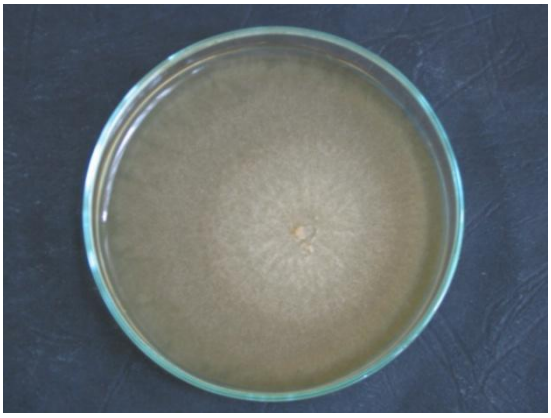
Pentru izolarea şi identificarea tulpinei s-a imaginat un expriment, în sensul că am cultivat Cunninghamella spp., în stare pură pe mediu PDA şi Sabouraud, la gradiente de temperatură diferită 25^0 C , respectiv 37^0 C. Pe mediu Sabouraud tulpina creşte foarte repede la 3 zile colonia este mare, de culoare roz-cenuşie, cu aspect floconos dar aplatizat, cu vădită putere de expansiune. (fig. 13, 14)



a *b*

Fig. 13, 14 Colonie de Cunninghamella spp. la 3 zile; a- avers, b- revers

Începând cu ziua a cincea, colonia a cuprins întreaga suprafaţă disponibilă a plăcii Petri, care funcţionează ca un element limitator în spaţiu, păstrează aceleaşi caractere culturale, mai închisă la culoare în centrul coloniei roz - cenuşiu, franjurată şi cu aspect floconos. Reversul insignifiant, crem. (fig. 15, 16)



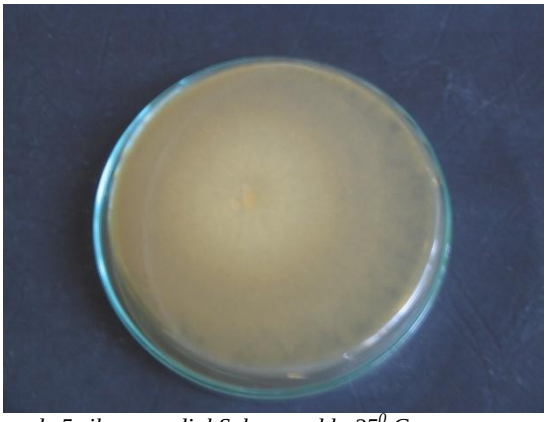


Fig. 15, 16 Colonie de Cunninghamella spp. de 5 zile pe mediul Sabouraud la 25^0 C

Pe mediul PDA, colonia are o forţă de creştere mai slabă, dar a 10 zi cuprinde întreaga placă, aspectul este mai degrabă purverulent decât floconos, mai diafan comparativ cu aspectul gros de pe mediul Sabouraud. (fig. 17, 18)

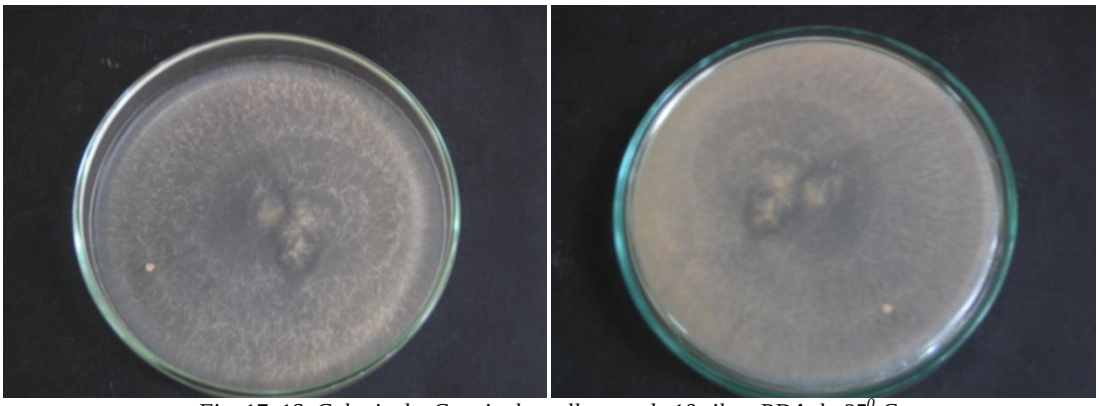


Fig. 17, 18 Colonie de Cunninghamella spp. de 10 zile – PDA la 25^0 C

La temperatura 37^{0}C colonia de *Cunninghamella spp.* a crescut foarte bine pe mediu Sabouraud, s-a dezvoltat fără diferenţe, poate mai expresivă fiind aceasta din urmă, neafectată fiind de gradientul de temperatură. (fig. 19, 20)

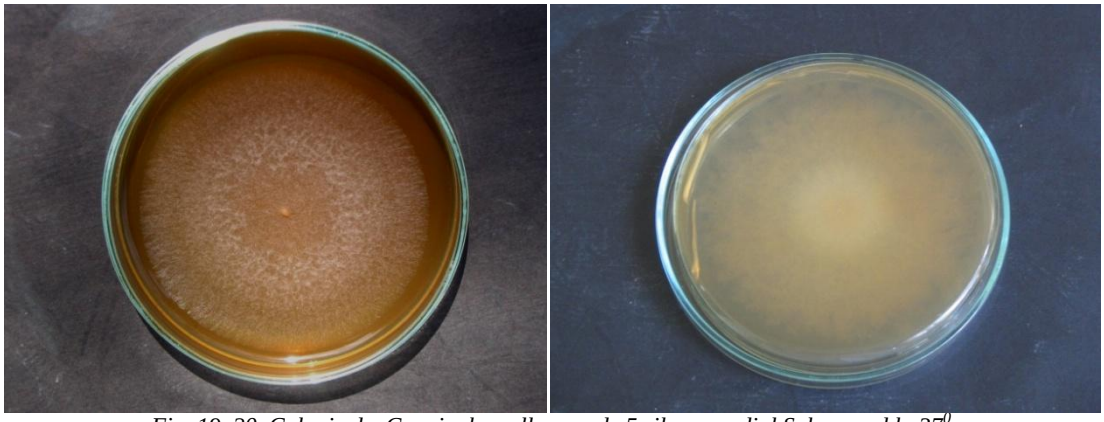


Fig. 19, 20 Colonie de Cunninghamella spp. de 5 zile pe mediul Sabouraud la 37^0

Pe mediul PDA la temperatura de incubare de 37^0 C colonia nu s-a dezvoltat decât în zona unde s-a depus materialul, fiind abia schiţată sub forma unor filamente fine, arborecente. Însă surprinzător, este foarte activă la microscop. (fig. 21, 22)

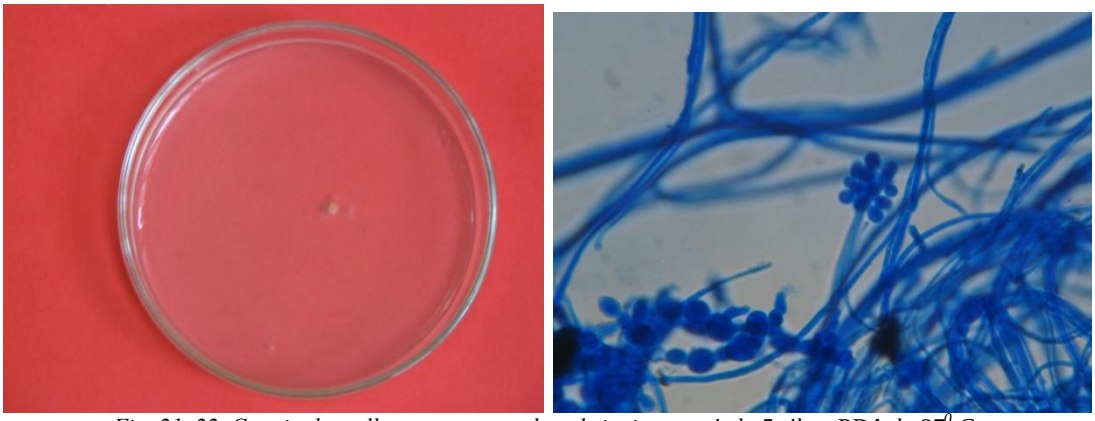


Fig. 21, 22 Cunninghamella spp. aspect cultural şi microscopic la 5 zile – PDA la 37^0 C

Am completat examenele culturale ale coloniilor de *Cunninghamella spp*. cu examene microscopice şi acestea efectuate în dinamică de la vârsta de 2 zile la 10 zile. În primele 3 zile aparatul micelian, analizat cu obiectivul 10, este uniform (fig. 23), ca un fuior cu filamente neseptate. Cu obiectivul 40 se observă că filamentele sunt septate şi cu uşoare îngroşări din loc în loc (fig. 24).

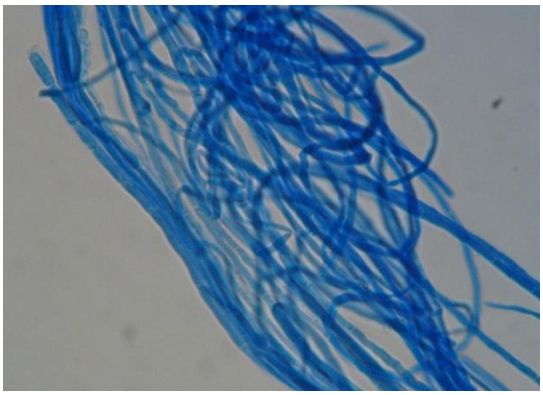


Fig. 23, 24 Cunninghamella spp. - aparat micelian – 3 zile. Col lactofenol x100, x 400

Demn de remarcat în câmpul microscopic prezenţa sporangioforilor, forme asemănătoare buchetelor de flori sau zmeurei care au aspect normal, caracteristic genului şi unele cu aspect degenerativ, care demonstrază disponibilităţile de fructificare şi de înmulţire asexuată prin intermediul sporilor mitotici dispuşi la exterior. (fig. 25, 26)

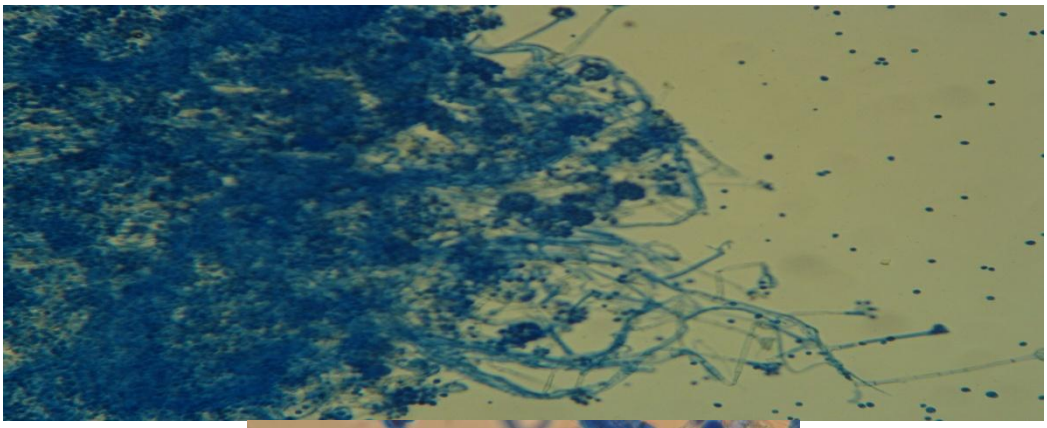
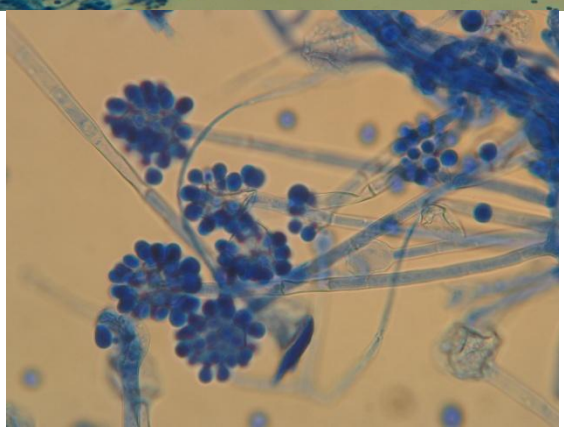



Fig. 25, 26 Cunninghamella spp. – Sporangiofori tipici. Col lactofenol x100, x 400

Concluzii

1. Pe mediul Sabouraud cultura este bine dezvoltată, abundentă, proieminentă pe suprafaţa mediului, viguroasă şi cu aspect uşor buretos. În timp ce pe mediul PDA, care oferă nutrienţi de slabă calitate, aparatul micelian este slab dezvoltat, nu proiemină pe suprafaţa mediului, aspectul este purverulent şi colonia creşte greu.
2. După 10 zile modificările culturale, în funcţie de mediu (PDA sau Sabouraud) sunt insignifiante.
3. Gradientul de temperatură (25^0 C, respectiv 37^0 C) nu influienţează dezvoltarea aparatului micelian, pe mediul Sabouraud.

4. Temperatura de 37^0 C afecteză dezvoltarea aparatului micelian, pe mediul PDA, miceliu rămânând cantonat doar la locul de însămânţare, cu slabe tendinţe de expansiune şi subliniem acest fapt, deoarece preparatele realizate din aceste culturi evidenţiază o cultură vie, cel puţin sub aspectul corpilor fructificanţi-sporangioforilor.
5. Sporangioforii sunt tipici şi caracterele culturale ale tulpinii izolate în laboratorul nostru sunt caracteristice genului Cunninghamella si este pe cale de a fi încadrată exact în specia din care aparţine.

BIBLIOGRAFIE:

1. COMAN, I., MAREŞ, M. (2000) – Micologie medicală aplicată. Ed. Junimea, Iaşi
2. EL-Sayed, M, El- Morsy (2004) - Cunninghamella echinulata a new biosorbent of metal ions from pollueted wather in Egipt. Mycologia, 96 (6): 1183
3. HOOG, G. S. , GUARRO, J., GENE, J. ŞI FIGUERAS, M., J. (2000) – Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, Netherlands
4. LARONE, D (2002) – Medically Important Fungi : A guide of identification, 4h ed. Washington DC: ASM Press
5. PASSOS, XS, SALES, WS, MACIEL, PJ (2006) – Nosocomial invasive infection caused by Cunninghamella bertholetiae. Case report. Mycopathologia, 161: 33
6. RICKERTS, V., BOHME, A., VIERTEL, A. (2007) – Cluster of pulmonary infections caused by Cunninghamella bertholetiae in immunocompromised patients. PMID: 11049769
7. RODEN, MM , THEOKLIS, TE, BUCHANAN, WL (2005) – Epidemiology and outcome of zygomycosis : A review of 929 reported cases. Clin Infect Dis. 41: 653
8. SIVAKUMAR, S., MATHEWS, MS., GEORGE, B (2007) – Cunninghamella pneumonia in postbone marrow transplant patient : first case report form India. PMID : 16115110.
9. www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/cunning1.html
10. www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/
11. www.mycolog.com/cunning.gif
12. www.gefor.4t.com/hongos/cunninghamellabertholletiae.html

PARTICULARITĂŢILE UNOR PROGRAME PRELIMINARE DINTR-O UNITATE DE PRELUCRARE A PEŞTELUI

FEATURES OF SOME PRELIMINARY PROGRAMMES IN A FISH PROCESSING UNIT

PETCU Carmen Daniela [1], SAVU C. [1], NEAGU Iuliana [1], TAPALOAGA Dana [1], MANTA Cristina [2]
[1] FMV Bucuresti
[2] DSVSA Bucuresti

In a fish and fish products processing unit it is necessary the establishing, gathering and implementing of some preliminary programmes which include the basic conditions and activities necessary to maintain a hygienic environment during the whole food chain, adequated to safety products production, handling and delivery to the consummers.

These preliminary programs are established and implementing for sustaining the proper applying of the food safety management system-HACCP by:

- *Checking and possible avoiding of dangerous stuffs into the product by an unadequate working environment;*
- *Avoiding of biologic, chemical and physical contamination and also of crossed contamination;*
- *Checking and maintening the dangers at low levels for food safety in the processingenvironment*

The preliminary programmes had in view constructive and technique aspects regarding the places, endowing, equipment and services, connected to the society buildings.

The responsability for the established measures implementation regarding the preliminary programmes comes to the HACCP team manager who will coordinate and check these aspects.

The established measures of the preliminary programmes reffers to:staff and clothes hygiene, staff facillities, raw material storing and handling, desinfection and deratisation programmes, preventing and checking control for damages, utilities(water, ventilation) and used waters and garbish treating.

By the carried out studies, it was noticed that the technologic features of fish and fish products processing influenced in a significant way the establishing modality of the preliminary programmes.

The preliminary programmes and the established procedures whithin the processing unit present some features linked to the infrastructure, the type of the products, the performance level of the used equipment and also the competence and training of the stuff.

The establishing and implementing of some detalied and adapted preliminary programmes for the fish processing unit decreased in a significant way the time for organizing the watching and checking activities by establishing the responsible functions with monitoring.

Key words: preliminary programmes, fish, hygienization

Programele preliminare vizează la nivelul organizaţiei aspecte legate de caracteristicile tehnice şi constructive ce fac referire la modul de amplasare, dotare cu utilaje, servicii conexe a clădirilor societăţii [1, 3, 4].

Responsabilitatea pentru implementarea măsurilor stabilite prin programele preliminare revine coordonatorului echipei HACCP, care va conduce şi verifica aceste aspecte [2, 4, 5].

1. MATERIAL ŞI METODE

Măsurile stabilite prin programele preliminare cuprind: igiena personalului şi a hainelor, facilităţile pentru personal, depozitarea şi manipularea materiilor prime, a semifabricatelor şi a produselor finite, programe de dezinfecţie şi deratizare, programe de prevenire şi control al dăunătorilor, utilităţi (apă, ventilaţie), tratarea deşeurilor şi a apelor uzate etc.

2. REZULTATE ŞI DISCUŢII

PROGRAME PRELIMINARE			Cod: PRP-01
CLĂDIREA, SPAŢIILE EXTERIOARE ŞI ANEXELE			Ediţia: 1 Revizia: 0
Zona	**Descrierea activităţii**	**Frecvenţa**	**Executant/ Responsabil**
Drumul de acces	-refacerea discontinuităţilor; -curăţarea, aspirarea; -stropirea cu apă.	-anual (primăvara) -la două săptămâni -zilnic (vara)	RCC-I RME-DMM
Curtea interioară	- refacerea discontinuităţilor; -curăţarea, aspirarea; -stropirea cu apă; -spălarea locului unde se depozitează gunoiul.	-anual (primavara) -la două săptămani -zilnic (vara)	RCC-I RME-DMM
Exteriorul clădirii	-repararea acoperişului; -repararea tencuielii sau a plăcilor sandwich; -astuparea găurilor şi a fisurilor din fundaţie; -desprăfuirea pereţilor -zugrăvirea pereţilor.	-anual -anual -anual şi ori de câte ori e nevoie -lunar -annual	OI RCC-I RME-DMM Firma externă
Rampa de recepţie	-repararea structurii de beton, dacă este fisurata; -curăţarea, eliminarea deşeurilor.	-anual şi ori de câte ori e nevoie -zilnic	OI RCC-I RME-DMM
Pavimentul Scările interioare	-refacerea pavimentului; -înlocuirea plăcilor de gresie sparte şi /sau aplicarea de răşină epoxidică în zonele zgâriate sau deteriorate.	-anual -ori de câte ori e nevoie	RCC-I RME-DMM OI Firma externă
Pereţii interiori	-desprăfuirea, înlăturarea pânzelor de păianjeni; -repararea placajelor interioare.	-săptămânal -annual	RCC-I RME-DMM OI Firma externă
Tavane	-desprăfuirea, înlăturarea pânzelor de păianjeni; -repararea, zugrăvirea tavanelor	-săptămânal -annual	RCC-I RME-DMM OI Firma externă
Ferestre şi celelalte spaţii de aerisire	-desprăfuirea, înlăturarea pânzelor de păianjeni; -spălarea ramelor şi geamurilor de sticlă; -repararea, înlocuirea geamurilor sparte; -curăţarea plaselor de protecţie împotriva pătrunderii indesctelor.	-săptămânal -lunar - ori de câte ori e nevoie -lunar	RCC-I RME-DMM OI
Uşile	-spălarea uşilor interioare şi exterioare; -repararea uşilor interioare şi exterioare.	- săptămânal -annual	RCC-I RME-DMM OI
Sistemul de iluminat	-curăţarea capacelor de protecţie; -înlocuirea becurilor arse; -revizia întregii instalaţii.	-lunar - ori de câte ori e nevoie -annual	RCC-I RME-DMM OI
Grupurile sanitare; Filtrul sanitar	-spălarea, dezinfectarea grupurilor sanitare şi a pardoselii; -spălarea faianţei; -desprăfuirea pereţilor şi tavanelor; -spălarea ferestrelor şi uşilor; -zugrăvirea pereţilor şi tavanelor; -repararea instalaţiilor.	-zilnic -săptămânal -lunar -săptămânal -anual -la nevoie	RCC-I RME-DMM OI
Chiuvetele pentru spălarea mâinilor	-spălarea, dezinfectarea; -repararea instalaţiilor.	-zilnic -la nevoie	RCC-I RME-DMM OI

Abrevieri:

- RCC-I → Responsabil Control Calitate şi Igienă
- RME-DMM → Responsabil Mentenanță Echipamente şi Dispozitive de măsurare şi monitorizare (DMM)
- OI → Operator Igienizare

PROGRAME PRELIMINARE			Cod: PRP-02
INSTALAŢII FURNIZARE UTILITĂŢI			Ediția: 1
			Revizia: 0
Zona	**Descrierea activității**	**Frecvenţa**	**Executant/ Responsabil**
Instalaţiile exterioare şi interioare de alimentare cu apa	-verificarea stării conductelor interioare şi exterioare utilizate pentru alimentare cu apă	-anual sau la nevoie	RCC-I RME-DMM
Conductele interioare de apă	-curăţarea interiorului conductelor	-anual sau la nevoie	RCC-I RME-DMM
Sistemul de ventilaţie	-curăţarea filtrelor de admisie a aerului; -curăţarea plaselor de protecţie împotriva pătrunderii insectelor; -revizia ventilatoarelor.	- săptămânal -anual	RCC-I RME-DMM OI
Instalaţia electrică	-revizia totală -înlocuirea unor piese defecte	-anual -la nevoie	RCC-I RME-DMM
Calitatea apei	-verificare vizuală, organoleptică; -buletine de analizeă fizico-chimice şi microbiologice	-zilnic -trimestrial	CESA RCC-I

Abrevieri:

- RCC-I → Responsabil Control Calitate şi Igienă
- RME-DMM → Responsabil Mentenanță Echipamente - DMM
- OI → Operator Igienizare

PROGRAME PRELIMINARE ECHIPAMENTE			Cod: PRP -03 Ediţia: 1 Revizia: 0	
Echipamente	**Ustensile Chimicale**	**Descrierea activităţii**	**Frecvenţa**	**Executant/ Responsabil**
-Malaxor - Vane pentru marinare şi sărare - Maşină spălat navete -Maşină tocat	Burete Apă Furtun cu apă Spumă dezinfectantă	1.Spălarea cu apă caldă a depunerilor grosiere; 2. Aplicare spumă; 3. Clătire; 4. Uscare; 5. Demontare, curăţare, lubrifiere.	-zilnic şi ori de cate ori este necesar -lunar	RCC-I RME-DMM
-Bazinul de sărare	Apă Detergent Dezinfectant	1. Golirea de apă; 2. Spălare cu detergent; 3. Clătire; 4. Aplicare dezinfectant; 5. Clătire; 6. Uscare.	-zilnic şi ori de cate ori este necesar	RCC-I RME-DMM
Celulele automate de afumare	Apă Detergent	1. Curăţarea pereţilor şi pardoselii; 2. Verificarea instalaţiei electrice şi de producere a fumului.	-zilnic, la sfârşitul schimbului -săptămânal	RCC-I RME-DMM
Cărucioarele	Perii Apă	1. Curăţarea; 2. Spălarea; 3. Lubrifiere roţi.	-zilnic, la sfârşitul schimbului săptămânal	RCC-I RME-DMM
-Recipientele pentru depozitarea peştelui -Lăzile pentru depozitarea produselor finite	Perii Apă Detergent Dezinfectant	1.Îndepărtarea particulelor grosiere; 2.Jet de apă; 3.Frecare cu perii cu apă şi detergent; 4. Aplicare dezinfectant; 5.Clătire; 6.Uscare; 7.Depozitare pe raft.	permanent	RCC-I RME-DMM
Hotele, sistemul de ventilaţie	Perii Lavete Apă Detergent	1.Curăţarea filtrelor cu peria; 2.Ştergere exterior şi interior cu lavete umede. 3.Curăţare cu apă şi detergent 4.Montare filtre	săptămânal	RCC-I RME-DMM
Camerele frigorifice; Frigidere; Lăzi frigorifice	Lavete; Apă; Bicarbonat.	1.Dezgheţare; 2.Curăţare cu laveta umedă; 3.Tratare cu soluţie de bicarbonat; 4.Verificarea instalaţiei frig.	săptămânal lunar	RCC-I RME-DMM
Mesele de lucru	Furtun cu apă; Spumă dezinfectantă.	1.Îndepartarea resturilor; 2. Aplicare de spumă; 3. Clătire; 4. Uscare.	-zilnic sau la nevoie	RCC-I RME-DMM
Ustensilele de lucru	Apă; Detergent; Dezinfectant	1.Spălare cu apă caldă a depunerilor grosiere; 2. Spălare cu detergent; 3. Clătire; 4. Dezinfectare; 5. Uscare.	-zilnic sau la nevoie	RCC-I RME-DMM
Cântare electronice şi bascule; Maşină de ambalat în folie	Lavete de şters; Alcool sanitar.	1.Îndepartarea resturilor; 2. Ştergere cu laveta umedă; 3. Dezinfectare cu alcool	-zilnic sau la nevoie	RCC-I RME-DMM

Abrevieri:

- RCC-I → Responsabil Control Calitate şi Igienă
- RME-DMM → Responsabil Mentenanţă Echipamente - DMM
- OI → Operator Igienizare

PROGRAME PRELIMINARE	Cod: PRP-04
IGIENIZARE SPAŢII INTERIOARE	Ediţia: 1
	Revizia: 0

Zona Echipament	Metoda	Ustensile Chimicale	Frecvenţa	Responsabil/ Executant
Pavimentul din secţiile de producţie	-îndepărtare resturi; -aplicare spumă dezinfectantă; -clătire; -uscare.	-mătură; -furtun cu apă; -spumă dezinfectantă.	-zilnic, la sfârşitul schimbului sau la nevoie	RCC-I OI
Pereţii din secţiile de producţie	- aplicare spumă dezinfectantă; -clătire; -uscare	-furtun cu apa -spumă dezinfect.	-zilnic sau la nevoie	RCC-I OI
Cameră de afumare	aplicare spumă dezinfectantă; -clătire; -uscare	-furtun cu spumă şi apă	- după fiecare lot	RCC-I OI
Tavanele	-desprăfuire; -spălare cu apă.	-perii	-lunar	RCC-I OI
Corpurile de iluminat	-ştergere; -spălare.	-lavete de şters; -detergenţi.	-lunar	RCC-I OI
Mesele din sala de ambalare	-îndepărtare resturi; - aplicare spumă dezinfectantă; -clătire; -uscare	-lavete umede; -furtun cu spumă şi apă;	-zilnic, la sfârşitul schimbului	RCC-I OI
Vestiarele şi grupurile sanitare	-măturare; -spălare cu detergent; -clătire; -dezinfectare.	-mături; -detergenţi; -dezinfectanţi.	-zilnic, la sfârşitul schimbului, la nevoie	RCC-I OI
Suprafeţele de contact cu mâinile (mânere uşi, sertare)	-îndepărtarea resturilor; -aplicarea detergentului; -ştergere cu lavete umede; -uscare cu hârtie absorbantă.	-lavete de şters; -detergenţi.	-zilnic	RCC-I OI

PROGRAME PRELIMINARE	Cod: PRP-05
CONTAINERE GUNOI; DEŞEURI ŞI APE REZIDUALE	Ediţia: 1 Revizia: 0

Zona	Ustensile Chimicale	Descrierea activităţii	Frecvenţa	Executant/ Responsabil
Containere exterioare pentru gunoi	Furtun cu apă rece Detergent	1. Golirea 2. Curăţarea depunerilor de pe pereţi 3. Spălare cu apă şi detergent	-la fiecare golire sau la nevoie	RCC-I OI Regia apă-canal conform contract încheiat
Locul de depozitare a gunoiului	Mătură Furtun cu apă Detergent	1. Măturarea spaţiului de depozitare containere 2. Spălare cu apă şi detergent	-la fiecare golire sau la nevoie	RCC-I OI
Containere interioare	Furtun cu apă Detergent	1. Legarea sacului de plastic plin; 2. Ducerea sacului cu gunoi la containerul exterior; 3. Spălarea containerului gol cu apa si detergent; 4. Punere sac gol; 5. Spălarea locului de depozitare.	-la sfârşitul schimbului; la nevoie -după încheierea operaţiunii de eliminare deşeuri organice (viscere, solzi etc.)	RCC-I OI
Containere pentru deşeuri reciclabile	Furtun cu apă Detergent	1. Sortarea pe tipuri de materiale reciclabile a deşeurilor; 2. Repartizarea lor pe containerele aferente; 3. Spălarea containerului gol cu apă şi detergent; 4. Spălarea locului de depozitare.	- periodic se livrează la unităţile care se ocupă cu reciclarea	RCC-I OI
Sifoanele de pardoseală	Furtun cu apă Dezinfectant	1. Îndepărtare capace 2. Introducerea unui jet puternic de apă; 3. Dezinfectarea gurii de canal şi a capacului.	-zilnic, la sfârşitul schimbului sau la nevoie	RCC-I OI
Gurile de canal exterioare		1. Verificare pentru prevenirea unei eventuale colmatări	-lunar	CESA RCC-I RME-DMM
Conductele de canalizare		1. Verificarea integrităţii 2. Decolmatarea	-lunar -la nevoie	CESA RCC-I RME-DMM
Instalaţiile de evacuare de la grupurile sanitare		1. Verificare pentru prevenirea unei eventuale colmatări	-lunar	CESA RCC-I RME-DMM

PROGRAME PRELIMINARE	Cod: PRP-06
PLAN DE COMBATERE A DĂUNĂTORILOR	Ediţia: 1
	Revizia: 0

Etapa	Pericol	Monitorizare		Resp.	Documente	Intervenţie	
		Acţiunea	Frecvenţa			Acţiunea	Frecvenţa
Recepţia materiilor prime	Prezenţa insectelor, rozătoarelor	Control vizual	La fiecare lot	GDA GDPP GMPC	PV de neconformitate PV de respingere lot	Respingere lot afectat	La fiecare lot
Depozitare	Prezenţa insectelor, rozătoarelor	Control vizual	Zilnic	GDA GDPP GMPC	-	Izolarea lotului afectat. Dezinsecţie. Deratizare	Când este cazul. Lunar
Spaţiu producţie	Prezenţa insectelor, rozătoarelor	Control vizual	Zilnic	OI	Fişa de verificare preoperaţională	Dezinsecţie. Deratizare	Lunar
Ambalare	Prezenţa insectelor, rozătoarelor	Control vizual	Zilnic	OI	Fişa de verificare preoperaţională	Dezinsecţie. Deratizare	Lunar
Depozitare produs finit	Prezenţa insectelor, rozătoarelor	Control vizual	Zilnic	GDFC GDFS	Fişa de verificare preoperaţională	Dezinsecţie. Deratizare	Lunar
Mijloace de transport	Prezenţa insectelor	Control vizual	Zilnic	OI	Fişa de verificare preoperaţională	Dezinsecţie. Dezinfecţie	După fiecare transport

Abrevieri:

a) GDA - Gestionar Depozit Produse Auxiliare
b) GDPP - Gestionar Depozit Peşte Proaspăt
c) GDFC - Gestionar Depozit Produse Finite Peşte Congelat
d) GDFS - Gestionar Depozit Produse Finite Semiconserve
e) OI - Operator Igienizare
f) GMPC - Gestionar Depozit Peşte Congelat Materie Primă

3. CONCLUZII

3.1. Programele preliminare şi procedurile stabilite în cadrul unității de prelucrare a peştelui prezintă particularităţi legate de infrastructură, tipul de produse obţinute, nivelul de performanţă a utilajelor disponibile, precum şi de gradul de instruire şi competenţă a personalului.

3.2 Din studiile efectuate s-a constatat că particularităţile tehnologice de obţinere a peştelui şi unor produse din peşte influenţează în mod semnificativ modalitatea de stabilire a programelor preliminare.

3.3. Stabilirea şi implementarea unor programe preliminare detaliate şi adaptate necesarului unității de prelucrare a peştelui reduce semnificativ timpul destinat organizării acţiunilor de urmărire şi control, prin stabilirea funcţiilor responsabile cu monitorizarea acestora.

3.4. Se stabilesc măsuri pentru monitorizarea, măsurarea şi analizarea proceselor în vederea îmbunătăţirii continue a acestora, fiind implementate acţiunile necesare pentru obţinerea rezultatelor planificate şi pentru îmbunătăţirea continuă a acestor procese.

4. BIBLIOGRAFIE

1. Nierentz, J., Stern, M.; (2000); *Ghid de igienă pentru industria peştelui,* translation and editing George Creangă şi Anca Nicolau, Universitatea Dunărea de Jos, Galaţi.
2. Petcu, Carmen; (2006); *Sistemul HACCP – garantul siguranţei alimentelor*, Ed. Idea Design, ISBN 973-624-415-6, ISBN 978-973-624-415-5, Bucureşti.
3. Savu, C şi col.; (2004); *Siguranţa alimentelor – riscuri şi beneficii*. Editura Semne, Bucureşti.
4. *** Codex Alimentarius CAC/RPC1-1969 rev.4:2003; Recommended international code of practice general principles of food hygiene
5. *** SR EN ISO 22000:2005; Sisteme de management al siguranţei alimentelor. Cerinţe pentru orice organizaţie din lanţul alimentar.

ASPECTE EPIDEMIOLOGICE PRIVIND BOALA EDEMELOR LA SUINE ÎN AREALUL JUDEŢULUI BISTRIŢA NĂSĂUD

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS REGARDING OEDEMA DISEASE IN PIGS IN THE AREA OF BISTRIŢA NĂSĂUD COUNTY

PĂVĂLEAN D., RĂPUNTEAN Gh., RĂPUNTEAN S.
USAMV Cluj-Napoca
grapuntean@usamvcluj.ro

The epidemiological study was performed during the 1990-2007 period, the analysis being made just for the cases that were confirmed by laboratory investigations. Regarding spatial dissemination the outbreaks were distributed in the entire territory of the county. From the 56 Veterinary Practices situated in the county of Bistriţa Năsăud, disease outbreaks were recorded in 39 (69,64%), with a variable number of outbreaks and cases, according with the density of swine population, small backyard breeders and geographical relief. During the study period a total number of 465 disease cases were investigated. Correlated with the total number of samples that were examined during the entire period (5261 samples) a prevalence of 8,83% was obtained. In terms of temporal distribution, the illness was recorded in each study year. The annual prevalence had values situated between 19,60% during 1998 (the higher recorded value) and 0,53% during 1993 (the lower recorded value). Analyzing the monthly distribution of the cases (monthly average values) we have seen that the cases were recorded in each month of the year, with an incidence that is variable from one month to another. The prevalence was higher during May (12,9%), June (13,5%) and October (13,1%) that underline the presence of two peaks, one aestival and the second one in the autumn. With regard to the age, the disease seems that is more frequent between 8-12 weeks (79,32%); the higher incidence was recorded in the first week after the weaning. Between 4 and 7 weeks of age the disease incidence is lower (9,25%) and over 13 weeks of age it was a little higher (11,82%). After this age the cases number is gradually decreasing so that after 20 week of age the cases were not recorded anymore. There was no difference in terms of race or sex. The disease affected especially the pigs in a very good body shape.

Boala edemelor este o boală toxiinfectioasă, întâlnită la purcei, cel mai frecvent la vârsta de 5 - 20 zile după înţărcare, având o evoluţie sporadică sau enzotică, care se manifestă clinic prin tulburări generale grave, edem palpebral, diaree şi manifestări nervoase, iar morfopatologic prin edem serogelatinos al peretelui stomacal, al mezoului colonului helicoidal şi/sau a altor organe şi ţesuturi.

În judeţul Bistriţa-Năsăud boala edemelor a devenit endemică, antrenând pierderi economice însemnate. Din considerentele mai sus enunţate ne-am propus ca prin observaţiile şi investigaţiile epidemiologice efectuate să încercăm să descifrăm intervenţia unor factori favorizanţi, care au contribuit la sporirea numărului de focare, respectiv cazuri, care să permită aplicarea unor măsuri eficiente de luptă antiepidemică.

În această lucrare sunt redate aspectele epidemiologice privind evoluţia bolii edemelor în arealul judeţului Bistriţa-Năsăud, studiu efectuat în perioada 1990-2007, urmărind, îndeosebi, implicaţiile factorilor intrinseci şi extrinseci care au favorizat apariţia şi evoluţia îmbolnăvirilor.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările epidemiologice efectuate au vizat analiza temporală şi spaţială a procesului epidemiologic, cât şi influenţa unor factori intrinseci şi extrinseci care pot interveni în apariţia şi evoluţia anatomoclinică a cazurilor. În efectuarea studiului s-au utilizat metodele de studiu epidemiologic, procedând la efectuarea unui studiu retrospectiv analizând evenimentele epidemiologice începând din anul 1990 şi studiu prospectiv efectuat pe perioada 2003-2007 cecetând populatiile de purcei existente în acest interval.

Aspectele epidemiologice în boala edemelor pe teritoriul judetului Bistrita–Năsăud au fost analizate prin metodele epidemiologiei descriptive studiind evoluția bolii, extensia acesteia, distribuția în teritoriu, gravitatea evoluției îmbolnavirilor şi frecvența cazurilor aparute in diferite areale geografice ale județului. Au fost studiate şi analizate aspecte de epidemiologie analitică urmărindu-se cu precădere detectarea agentului patogen, a factorilor ce intervin în procesul epidemiologic al bolii, a modului de transmitere şi studiul populatiei receptive la boală.

Pentru a se putea calcula unii indicatori de frecvență (incidența şi prevalența) s-au luat considerare numai cazurile care au fost confirmate de laborator, din care s-a putut deduce frecvența bolii edemelor atât față de total probelor analizate, cât şi față de totalul probelor provenite de la porcine.

REZULTATE OBŢINUTE

Populația receptivă la boala edemelor este reprezentată de purceii în vârstă de 8–12 săptamâni, vârstă la care sunt constatate cele mai multe cazuri de boală, apariția lor fiind în strânsă legatură cu sursa de infecție, modul de transmitere a bolii şi factorii favorizanti care pot contribui hotărâtor în declanşarea bolii. Mai frecvent îmbolnăvirile apar la vârsta de 5 – 20 zile după înțărcare, ca urmare a stresului cauzat de această acțiune şi a schimbarii bruşte a regimului alimentar, îmbolnăvindu-se purceii aflați într-o stare bună şi foarte bună de întreținere.

Factorii predispozanti care duc la declanşarea bolii sunt reprezentați de slaba putere de apărare a organismului purcelului față de tulpinile patogene de *E. coli* care, pe fondul schimbarii brusce a regimului alimentar, sunt în măsură să-şi pună în valoare elementele de patogenitate. Menționăm că toate tulpinile izolate au fost β-hemolitice şi producătoare de verotoxine (STEC) (12).

Alti factori care influențează apariția cazurilor de boala edemelor la purcei sunt deficiențele în alimentația scroafelor gestante, colostrul scroafelor care poate fi insuficient cantitativ şi calitativ, sărac în imunoglobuline, ca şi diferite deficiențe de microclimat în adăposturile purceilor din perioada înțărcării, cum ar fi temperatura scăzută, umiditatea ridicată şi curenții puternici de aer.

Principala sursa de infecție este reprezentată de animalele bolnave care elimină cantitati mari de colibacili patogeni începând din perioada de incubație şi pe tot parcursul bolii, eliminarea germenilor facându-se predominant prin materiile fecale. Mai prezintă importanță animalele trecute prin boală, cadavrele, ca şi unele surse secundare, reprezentate de furaje, lapte, apă, aşternut sau diverse obiecte, care au fost contaminate cu fecale de la animalele bolnave.

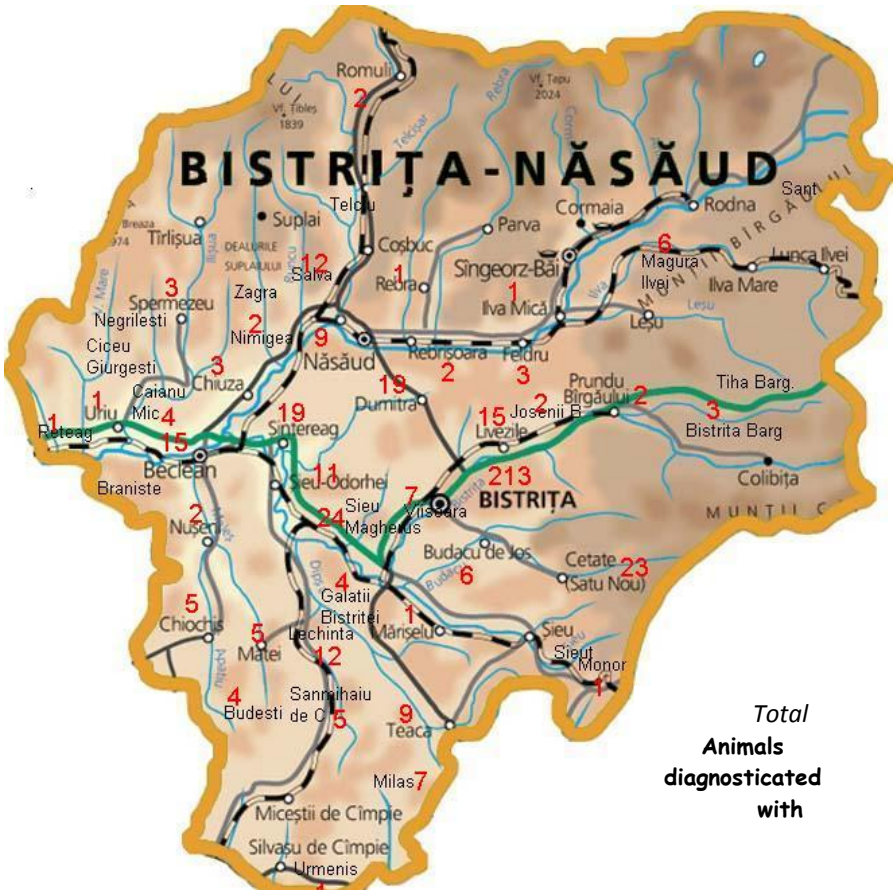
Calea de pătrundere în organism a colibacililor în cazul bolii edemelor este în marea majoritate a cazurilor cea digestivă, foarte rar fiind posibile şi alte căi (respiratorie şi/sau ombilicală).

Dinamica epidemică a prezentat o variabiliate pronunțată. Boala are în general o evoluție cel mai adesea sporadică, dar s-au semnalat şi izbucniri epidemice, în care morbiditatea a fost ridicată, ajungând la un procent cuprins între 20–100 % din numărul purceilor din cuib, iar mortalitatea poate să ajungă chiar la 100 % din cazurile de îmbolnăvire.

EVOLUŢIA SPAŢIALĂ A BOLII EDEMELOR

Pe teritoriul judetului Bistrita–Năsăud există un numar de 56 de Circumscripții Sanitare Veterinare (CSV), din care, în intervalul menționat, în 39 au fost diagnosticate cazuri pozitive cu boala edemelor (69,64%).

Analiza focarelor de boală pe fiecare CSV a permis să se constate existența unei variabilități destul de pronunțate a numărului de cazuri înregistrate. Luând ca bază existența a mai mult de 10 cazuri într-o circumscripție, s-a putut stabili următoarea prevalență: Bistrița 213 (45,80%), Şieu Măgheruş 24 (5,16%), Satu Nou 23 (4,94%), Şintireag 19 (4,08%), Dumitra 19 (4,08%), Livezile 15 (3,22%), Beclean 15 (3,22%), Lechința 12 (2,58%), Salva 12 (2,58%), Sieu Odorhei 11 (2,36%). În celelalte circumscripții numărul de cazuri a fost mai redus, valorile încadrându-se între 1 caz (0,21%) şi 9 cazuri (1,93%). Într-un număr de 17 CSV nu s-au înregistrat cazuri de boală. Distribuția teritorială (spațială) a cazurilor este redată în cartograma nr.1.



Evoluţia spaţială a focarelor şi a numărului de cazuri (cazuri diagnosticate pe circumscripţii)

Numărul de focare, respectiv de cazuri, a avut o concentrare mai mare în următoarele circumscripţii: Bistriţa, Şieu Măgheruş, Satu Nou, Şintireag, Dumitra, Livezile şi Beclean. In celelalte circumscripţii numărul de cazuri a fost mult mai scăzut.

Analizând distribuţia spaţială a focarelor de boala edemelor la nivelul arealului judeţului, putem preciza că acestea au o răspândire neuniformă, fiind corelate cu densitatea populaţiei de porcine, a gospodăriilor populaţiei şi a formelor de relief, constatându-se o rarefiere sau lipsă a cazurilor în zonele muntoase, după cum se poate observa pe cartogramă.

Evoluţia temporală a bolii edemelor

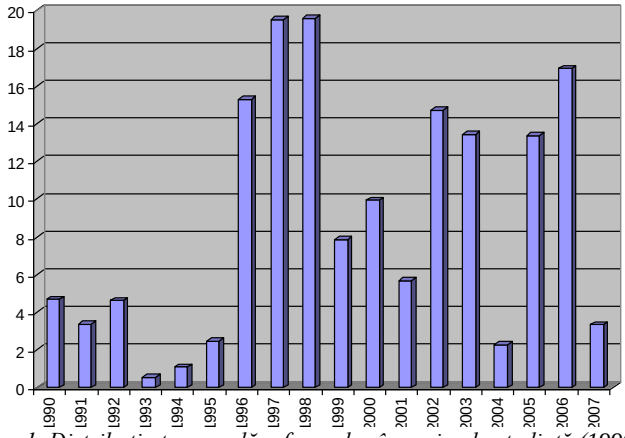
În cercetarea epidmiologică este foarte important a analiza distribuţia temporală a cazurilor, respectiv a focarelor, iar în baza concentrării acestora pe unitatea de timp, se pot trage concluzii privind intervenţia unor factori favorizanţi. În acest sens au fost analizate probele de diagnostic efectuate de Laboratorul sanitar veterinar judeţean Bistriţa, din care rezultă distribuţia temporală a cazurilor de boala edemelor în perioada studiată 1990 – 2008 (tabel nr. 2)

Tabel nr. 2Probe afluite pentru confirmare de diagnostic efectuate de laboratorul judeţean Bistriţa – Năsăud, în perioada 1990 – 2007

Nr. crt.	ANUL	Număr probe afluite la laborator				
		La toate speciile	La porcine	Probe pozitive la B. edem.	% din total probe	% din probe porci
1.	1990	9935	406	19	0.19	4.68
2.	1991	9589	325	11	0.11	3.38
3.	1992	9220	324	15	0.16	4.62
4.	1993	6857	375	2	0.03	0.53
5.	1994	3646	362	4	0.11	1.10
6.	1995	4077	321	8	0.19	2.49
7.	1996	6547	379	58	0.88	15.3
8.	1997	1045	271	53	5.07	19.5
9.	1998	596	204	40	6.71	19.60
10.	1999	741	191	15	2.02	7.85
11.	2000	636	161	16	2.51	9.93
12.	2001	495	176	10	2.02	5.68
13.	2002	1098	388	57	5.19	14.69
14.	2003	708	231	31	4.37	13.42
15.	2004	944	263	6	0.63	2.28
16.	2005	894	374	50	5.59	13.36
17.	2006	1926	390	66	3.42	16.92
18	2007	1249	120	4	0.32	3.33
	TOTAL	**60203**	**5261**	**465**	**0.77**	**8.83**

Analizand numărul cazurilor cu boala edemelor pe ani calendaristici (evoluţia temporală) a rezultat faptul că în fiecare an luat în studiu s-au înregistrat cazuri pozitive. Prevalanţa anuală a prezentat valori care s-au încadrat între 19,60% în anul 1998 (cea mai ridicată valoare) şi 0.53 % în anul 1993 (cea mai scăzută valoare).

Din analiza datelor din tabelul nr. 2 rezultă un aspect variabil a indicatorilor de frecvenţă. În perioada 1990 până în 1992 se constată o incidenţă relativ redusă a numărului de cazuri cu tendinţă de constanţă (3.38% – 4.64%), pentru ca în perioada următorilor trei ani (1993-1995) să asistăm la o uşoară creştere a numărului de cazuri, fără a depăşi valorile atinse în anul 1990 şi respectiv în 1992. Începând cu anul 1996 se constată o creşetere accentuată a numărului de cazuri, atingând următoarele valori: 58 în 1996 (15.3%), 53 în 1997 (19.56%) şi 40 în 1998 (19,60%). Urmează din nou o perioadă de scădere, până la un număr de 10 cazuri în 2001 (5.68%), pentru a asista din nou la o creştere semnificativă a numărului de cazuri în următorii doi ani, respectiv 57 în 2002 (14.69%) şi 31 în 2003 (13.42%). Urmează o nouă scădere semnificativă în anul 2004 la doar 6 cazuri (2.28%), pentru a asista la o nouă perioadă de creştere pentru următorii doi ani, respectiv de 50 în 2005 (13.36%) şi 66 în 2006 (16.92%). În anul 2007 din se asistă, din nou, la scăderea numărului de cazuri, fiind confirmate doar un număr de 4 (3.33%) (graficul nr. 1).



Grafic nr. 1 Distribuţia temporală a focarelor în perioada studiată (1990-2007)

Din imaginea grafică se poate observa existenţa a trei picuri. Primul, cu valorile cele mai ridicate, se înregistrează în anii 1997 şi 1998 (19.56% şi 19.60%), al doilea cu valori mai scăzute în anii 2002 şi 2003 (14.69% şi 13.42%) şi al treilea cu valori apropiate în anii 2005 şi 2006 (13.36% şi 16.92%).

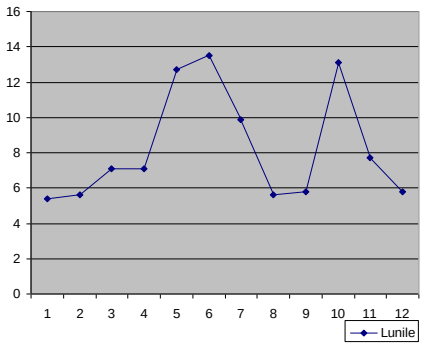
A fost urmărită şi distribuţia lunară a cazurilor (valori medii lunare) pentru a analiza concentraţia cazurilor pe unitatea de timp şi a se putea trage concluzii asupra influenţei sezonului privind apariţia cazurilor şi a caracteriza boala din punct de vedere sezonier (evoluţia sezonieră), aspecte redate în tabelul nr. 3 şi graficul nr. 2.

Analizând distribuţia lunară a cazurilor (valori medii lunare), s-a constatat că îmbolnăvirile s-au înregistrat în toate lunile anului, dar cu o incidenţă variabilă de la o lună la alta. Prevalenţa a fost ridicată în lunile mai (12.9%) şi iunie (13.5%), cât şi în luna octombrie (13.1%), ceea ce înseamnă prezenţa a două picuri, din care unul estival şi cel de al doilea autumnal (graficul nr. 2).

Tabel nr. 3 Boala edemelor diagnosticată în judeţul Bistrita – Năsăud in perioada 1990 - 2007, pe luni calendaristice

Nr. crt.	Anul	Luna												Total
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	
1	1990	-	2	5	-	3	2	2	3	-	1	-	1	**19**
2	1991	-	2	1	3	2	1	-	2	-	-	-	-	**11**
3	1992	-	-	1	1	2	6	2	-	1	-	2	-	**15**
4	1993	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	**2**
5	1994	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	**4**
6	1995	-	-	-	-	1	1	1	1	-	2	2	-	**8**
7	1996	3	1	8	5	4	6	9	3	3	9	2	5	**58**
8	1997	5	4	1	1	1	3	6	7	5	13	3	4	**53**
9	1998	4	1	2	5	4	10	-	2	5	5	-	2	**40**
10	1999	6	3	-	2	2	-	-	2	-	-	-	-	**15**
11	2000	-	1	1	-	6	-	-	1	2	-	3	2	**16**
12	2001	1	-	1	1	-	4	-	-	-	3	-	-	**10**
13	2002	-	4	4	7	16	10	2	1	3	8	2	-	**57**
14	2003	-	-	3	-	4	6	6	1	1	1	5	4	**31**
15	2004	-	-	1	-	-	1	-	-	-	1	3	-	**6**
16	2005	1	2	2	-	6	10	3	2	6	6	6	6	**50**
17	2006	5	5	3	7	8	3	11	1	1	12	8	2	**66**
18	2007	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	**4**
	Total	25	26	33	33	60	63	46	26	27	61	36	27	**465**
	%	**5.37**	**5.59**	**7.09**	**7.09**	**12.7**	**13.5**	**9.89**	**5.59**	**5.80**	**13.1**	**7.74**	**5.80**	

Acest mod de distribuţie poate fi corelat cu numărul mai ridicat de purcei în aceste perioade de timp, consecutiv fătărilor de primăvară şi respectiv de toamnă. Deasemenea considerăm că mai intervine hrănirea mai abundentă în perioadele respective, dar şi unele dezechilibre care pot să apară pe fondul unei hrăniri mai abundente cu furaje verzi sau suculente.



Graficul nr. 2 Distribuţia temporală pe luni calendaristice a cazurilor

Receptivitatea/sensibilitatea în funcţie de vârstă

Conform datelor din literatură, purceii în vârstă de 4-14 săptămâni prezintă receptivitate la boala edemelor. O sensibilitate mai pronunţată o au însă purceii imediat după înţărcare, boala apărând mai frecvent în primele 10-20 zile după ce purceii au fost supuşi acestei faze tehnologice.

Pentru a observa evoluţia bolii la populaţia de purceii din arealul judeţului Bistriţa Năsăud, s-a procedat la analiza cazurilor în raport cu vârsta. Observarea apariţiei cazurilor în raport cu vârsta s-a extins pe un interval de 17 saptămâni, începând din a 4-a săptămână până la a 20-a săptămână, interval divizat în trei intervale: perioada I (4-7 săptămâni); perioada a II-a (8-12 săptămâni) şi perioada a III-a (13-20 săptămâni), conform datelor din tabelul nr. 4.

Trebuie să menţionăm că numărul cazurilor de boală este mai mare decât cel prezentat, acesta din motivul că nu în toate situaţiile se trimit probe la laborator pentru confirmare. În multe cazuri diagnosticul se apreciază ca pozitiv în baza simptomelor şi a leziunilor care pot fi considerate, în cazul unei exprimări tipice, ca patognomonice, încât medicii practicieni supun astfel de cazuri tratamentului, bazaţi pe propria experienţă.

Tabel nr. 4 Evoluţia bolii în raport cu vârsta

Anul	**Perioadele (săptămâni)**														
	4	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**16**	**18**	**20**	**Total**
1990	-	-	-	-	9	1	1	-	4	1	2	-	-	1	**19**
1991	-	-	-	-	5	-	3	-	2	-	1	-	-	-	**11**
1992	-	5	-	-	5	-	2	-	3	-	-	-	-	-	**15**
1993	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	**2**
1994	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	2	-	-	-	**4**
1995	-	-	-	-	2	-	-	-	3	-	2	-	1	-	**8**
1996	-	-	5	1	21	-	11	-	18	-	1	-	-	1	**58**
1997	-	1	1	-	18	-	6	-	26	-	1	-	-	-	**53**
1998	-	-	1	1	11	1	4	-	16	-	-	2	-	4	**40**
1999	-	-	-	-	2	-	1	-	7	-	2	3	-	-	**15**
2000	-	-	-	2	1	-	5	1	5	-	-	2	-	-	**16**
2001	-	-	-	1	2	-	3	2	2	-	-	-	-	-	**10**
2002	3	-	1	1	10	1	18	-	15	-	6	-	-	2	**57**
2003	-	-	1	2	11	3	2	-	6	-	2	4	-	-	**31**
2004	1	-	-	-	1	-	-	-	4	-	-	-	-	-	**6**
2005	1	-	2	2	9	3	10	4	12	1	2	3	-	1	**50**
2006	-	-	6	5	19	4	5	-	21	-	5	-	-	1	**66**
2007	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	1	-	-	**4**
Total	**5**	**6**	**17**	**15**	**127**	**13**	**73**	**7**	**147**	**2**	**27**	**15**	**1**	**10**	**465**
%	**43 (9.25%)**				**367 (78.93%)**					**55 (11.82%)**					

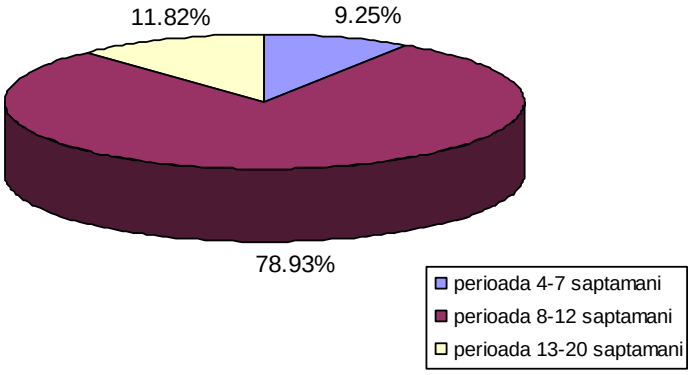
În intervalul 4-7 săptămâni numărul cazurilor este redus având următoarea incidenţă: 5 cazuri în săptămâna a 4-a, 6 cazuri în săptămâna a 5-a, 17 cazuri în săptămâna a 6-a şi 15 cazuri în săptămâna a 7-a. Prevalenţa bolii în acest interval a fost redusă, fiind înregistrat un număr de 43 de cazuri (9.25%).

În intervalul 8-12 săptămâni numărul cazurilor creşte brusc, având următoarea dinamică a incidenţei: 127 cazuri în săptămâna a 8-a, 13 cazuri în săptămâna a 9-a, 73 cazuri în săptămâna a 10-a, 7 cazuri în săptămâna a 11-a şi 147 cazuri în săptămâna a 12-a. Prevalenţa bolii pe acest interval a prezentat cea mai ridicată valoare de 367 de cazuri (78.93%) ce se corelează cu perioada imediată a înţărcării.

În intervalul 13-20 de săptămâni numărul cazurilor se reduce simţitor, fiind înregistrată următoarea incidenţă: 29 cazuri în săptămânile 13-14, 16 cazuri în săptămânile 16-18 şi 10 cazuri în săptămânile 19-20. Prevalenţa bolii în intervalul 13-20 săptămni a fost de 55 de cazuri (11.82%). După săptămâna 20-a până în săptămâna 32-a nu s-a mai înregistrat niciun caz, aceasta permiţându-ne să afirmăm că după a 20-a săptămână de viaţă purceii nu mai sunt receptivi la tulpinile hemolitice de *E. coli* (cel puţin la serovarurile care circulă în acest areal).

Analizând datele din tabelul nr. 4 se poate constata următoarea prevalenţă în corelaţie cu vârsta purceilor: în perioada I (4-7 săptămâni) 43 cazuri (9.25%), în perioada II (8-12 săptămâni) 367 cazuri (78.93%) şi în perioada III (13-20 săptămâni) 55 cazuri (18.82%) (graficul nr. 3).

Graficul nr. 3



Prevalenţa bolii în raport cu vârsta purceilor

Din studiile efectuate pe populaţia de purcei din arealul judeţului BN s-a putut constata că vârsta cea mai frecventă la care apare boala edemelor este cuprinsă între 8 - 12 săptămâni (79.32%). Intre 4 şi 7 săptămâni incidenţa bolii este mai redusă (9.25%), iar peste 13 săptămâni incidenţa bolii începe să scadă (11.82%), reducându-se treptat cu cât purceii înaintează în vârstă.

DISCUŢII

Conform unor date din literatură boala edemelor se află întro continuă extindere, iar factorii care determină emergenţa bolii nu sunt pe deplin cunoscuţi sau înţeleşi (3, 10, 11, 14). Unele date menţionează o creştere a numărului de cazuri de la 6,1% la 9% în intervalul 2000-2006 (14). Se apreciază că o contribuţie importantă la izbucnirile severe cu caracter emergent, o au unele clone de *E. coli* foarte virulente, cum sunt O149:LT:Sta:STb:ESAT1:F4ac, O157 STEC, O147, la care se asociază frecventele schimbări în tehnologia de creştere (5, 6, 7). Factorii de risc identificaţi cu izbucnirile epidemice sunt asociaţi cu vârsta, înţărcarea, mişcările de animale, sezonul, compoziţia hranei şi capacitatea bacteriei de a persiste în mediu. Se focusează pe respectarea managementul hrănirii şi a procedurilor de igienă, menţionându-se că reducerea presiunii de contaminare prin aplicarea corectă a măsurilor de curăţenie şi dezinfecţie contribuie semnificativ la reducerea riscului de îmbolnăvire (4, 12, 14).

Se are în vedere variate strategii de reducere a colonizării intestinale prin administrarea de probiotice, preparate cu bacteriofagi şi utilizarea unor mijloace de imunoprofilaxie. Unele date menţionează ca posibilitate de control a acestei boli, selecţia de indivizi sau populaţii rezistente în mod natural.

Cu toate acestea boala edemelor constituie la ora actuală una dintre bolile sporadico-enzootice, adesea cu aspect de boală emergentă, care antrenează pierderi economice însemnate prin mortalitatea ridicată şi care ridică probleme atât în privinţa terapiei, care adesea este ineficientă, cât şi a profilaxiei generale şi imunoprofilaxiei.

Din aceste considerente, interesul pentru această boală se menţine, precizându-se că pierderile economice sunt însemnate, fiind cauzate de mortalitatea ridicată (peste 90% din indivizii bolnavi), şi compromiterea sub raport productiv a celor trecuţi prin boală. Mai mult tratamentele efectuate sunt adesea ineficiente, iar încercările de prevenirea prin mijloace de imunoprofilaxie nu au devenit o alternativă care să permită controlul bolii în toate situaţiile epidemiologice, cu toate că sunt publicare şi rezultate încurajatoare (8, 9, 10, 11, 13).

Cercetările epidemiologice efectuate arată că boala edemelor la nivelul judeţului Bistriţa Năsăud are tendiţa unei boli emergente, evoluând cu forme clinice severe, în corelaţie cu factorii favorizanţi ridicând probleme îndeosebi privind aplicarea unei terapii eficace cât şi de profilaxie generală şi specifică.

CONCLUZII

1. Studiul epidemiologic a fost efectuat în perioada 1990-2007 în arealul judeţului Bistriţa Năsăud, rezultând că boala edemelor are un caracter sporadico-enzootic, fiind prezentă atât în gospodăriile particulare, cât şi în ferme.
2. Sub raportul răspândirii spaţiale s-a constatat că focarele de boală sunt răspândite pe aproape întreagul areal al judeţului, boala fiind diagnosticată în 39 CSV (69,64%) din cele 56 CSV componente ale judeţului.
3. În perioada studiată s-au înregistrat un număr total de 465 de cazuri de boala, care raportate la numărul de probe provenite de la porcine şi examinate în perioada respectivă (5261 probe), a rezultat o prevalenţă de 8,83% a bolii edemelor.
4. Sub raportul răspândirii temporale s-a constatat că îmbolnăviri s-au înregistrat în fiecare an luat în studiu. Prevalanţa anuală a prezentat valori care s-au încadrat între 19,60% în anul 1998 (cea mai ridicată valoare) şi 0,53 % în anul 1993 (cea mai scăzută valoare).
5. Analizând distribuţia lunară a cazurilor (valori medii lunare), s-a constatat că îmbolnăviri s-au înregistrat în toate lunile anului, cu o incidenţă variabilă de la o lună la alta. Prevalenţa a fost ridicată în lunile mai (12,9%) şi iunie (13,5%), cât şi în luna octombrie (13,1%), ceea ce înseamnă prezenţa a două picuri, din care unul estival şi cel de al doilea autumnal.
6. Sub raportul vârstei s-a putut constata că boala apare mai frecvent în perioada cuprinsă între 8-12 săptămâni (79,32%), incidenţa cea mai ridicată înregistrându-se în prima săptămână după înţărcare. Intre 4 şi 7 săptămâni incidenţa bolii este mai redusă (9,25%), iar peste 13 săptămâni aceasta a fost uşor mai crescută (11,82%). După această vârstă nu se mai constată cazuri de boală.

BIBLIOGRAFIE

1. Alexa P., Hamrik J., Stouracova K., Konstantinova L., Salajka E., - (2004) Passive immunoprophylaxis of edema disease in weaned piglets – Vet. Med., 49, (12), p. 447-452;
2. Aarestrup F. M., Jorsal S. E., Ahrens P., Jensen N. E., Meyling A., (1997) Molecular characterisation of Escherichia coli strains isolated from pigs with edema disease – J. Clin. Microbiol., 35, (1), p. 20-24;
3. Ding YoungLong, Sun YinHua, Ni JungBing, Cheng SuPing, Song LiuXue, Wang XiaoLong, (2005) Epidemiological investigation of edema disease of piglets in Hai'an County – Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 35, (1), p. 71-73;
4. Dritz Steve (2003) Nursery Management: Hygene and Feeding Management Practices to Ensure Healthy Pigs – Proceeding of 2003 Manitoba Seminar, Canada.
5. Fairbrother M. J., Nadeau E., Gyles L. Carlton, (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis and prevention strategies – Animal Health Research Reviews, 61, (1), p. 17-39;
6. Fairbrother M. J., Nadeau E., (2006) *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals – Rev. Sci. Tech., 25, (2), p. 555-569;
7. Halgerson A. F., Sharma V., Dow A. M., Schroeder R., Post K., Cornick N.A., (2006) Edema disease caused by a clone of *Escherichia coli* O147 – J. Clin. Microbiol., 44, (9) p. 3074-3077;
8. Illes J., - (1975) Protective oral immunization against enterotoxiemia in swine – Zentralbl. Bakteriol., 232, (4), p. 477-481;
9. Johansen M., Andersen L.O., Jorsal S.E., Thomasen L.K., Waddell L.K., Gyles C.L., (1997) Prevention of edema disease in pigs by vaccination with verotoxin 2e toxoid – Can. J. Vet. Res., 61, (4), p. 280-285;
10. Makino Sou-Ichi, Watarai Masahisa, Tabuchi Hiroyuki, Shirahata Toshikazu, Furuoka Hidefumi, Kobayashi Yoshiyasu, Takeda Yoshifumi, (2001) Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing *Escherichia coli* is a vaccine candidate for porcine edema disease – Microb. Pathol., 31, (1), 1-8;
11. Phu Huu Cu, Nquyen N. N., Do N.T., Nquyen X.H., Au X.T., Van T.H., Vu N.O., Dao T.H., (2006) A Study of Edema Disease in Pigs in Vietnam with Particular Reference to the Use of Autovaccine for the Prevention of Disease – Ann. NY Acad. Sci., 1081, (1), p. 531-533;
12. Răpuntean Gh., Răpuntean S., (2007) Epidemiologie veterinară generală – Editura Academic Pres, Cluj-Napoca.
13. Sarrazin E., Bertschinger H. U., (1997) Role of fimbriae F18 for actively acquired immunity against porcine enterotoxigenetic *Escherichia coli* – Vet. Microbiol., 54, (2), p. 133-144;
14. *** Disease in Nursery and Grower/Finisher Pigs in 2000 and 2006, and Vaccine and Antimicrobial Use in 2006 – Veterinary Services, Centres for Epidemiology and Animal Health, United States Department of Agriculture.
15. *** Edema disease: Introduction (*Escherichia coli* enterotoxiemia) Etiology and Pathogenesis, Clicincal Findings and Lesions, Diagnosis, Tratment and Control –
16. http://www. Merckvetmanual.com/mvm/htm/bc/53500.htm;

SENSIBILITATEA LA ANTIBIOTICE A UNOR TULPINI DE *E. COLI* IZOLATE DE LA PURCEI CU BOALA EDEMELOR

SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF SOME *E. COLI* STRAINS ISOLATED FROM PIGS WITH OEDEMA DISEASE

PĂVĂLEAN D., RĂPUNTEAN Gh.
USAMV Cluj-Napoca
grapuntean@usamvcluj.ro

40 strains of Escherichia coli isolated from pigs suffering from oedema disease were tested, using diffusion method in agar nutritive gel (Mueller Hinton), and one reference strain (ATCC 10536). The strain identification was performed based onto morphological, cultural, biochemical, hemolytic activity (β-hemolysis), and for some strains the productions of verotoxins (shiga toxin-like). The strains were tested for 16 different antibiotics, using standardized discs produced by specialized companies. The results were noted as followed: sensitivity to colistin sulfate (90%), flumequine (82,5%), gentamicine (75%) and amoxicillin clavulanate (67,5%); and resistance to erythromycin (97,5%), tetracycline (82,5%), streptomycin (77,5%), kanamycin (57,5%). To the other antibiotics the values were intermediary.

Boala edemelor evoluează în mod obişnuit supraacut şi acut, impunând efectuarea unui tratament intensiv şi susţinut, având ca obiective combaterea infecţiei colibacilare, eliminarea conţinutului intestinal, detoxifierea organismului şi rehidratarea organismului ca urmare a dezechilibrelor grave produse de acţiunea şi adsorbţia verotoxinelor. Tratamentul trebuie instituit cât mai precoce, orice întârziere sporind riscul sfârşitului prin moarte al animelelor bolnave. Chiar dacă din cauza evoluţiei rapide a bolii nu se poate apela la efectuarea unei antibiograme pentru cazurile individuale, este important pentru medicii veterinari de a cunoaşte sensibiliatatea sau rezistenţa tulpinilor care circulă într-un anumit areal, pentru a face uz de acele antibiotice care s-au dovedit eficiente faţă de cele mai multe tulpini. În baza acestor cunoştinţe se va putea interveni mai eficient, atât în cazul unor cazuri individuale, cât mai ales în cazul efectuării unor tratamente în episoade cu caracter endemic. Din aceste motive am considerat util să prezentăm observaţiile noastre privind sensibilitatea/rezistenţa tulpinilor de *E. coli* izolate de la porci bolnavi de boala edemelor din arealul judeţului Bistriţa Năsăud. În producerea bolii sunt incriminate tulpini de *E. coli* producătoare de verotoxine (STEC/VTEC).

MATERIAL ŞI METODĂ

Mediul de cultură folosit a fost agarul Mueller Hinton, care satisface cel mai bine condiţiile de cultivare pentru cele mai multe bacterii, fiind adecvat şi pentru colibacili. S-a acordat o atenţie deosebită preparării fiecărei şarje de mediu, pentru a corespunde standardelor de calitate. pH-ul mediului se va verifica obligatoriu în momentul preparării, care trebuie să aibă o valoare cuprinsă între 7,2 -7,4, iar grosimea stratului de agar să fie de 4 mm. În momentul însămânţării, suprafaţa mediului trebuie să fie umedă, fără picături de apă pe suprafaţă sau pe partea internă a capacului. Prepararea inoculului se face prin selectarea a 3-5 colonii de pe mediul solid, cu caracteristici morfologice tipice, care se vor transfera în 5 ml mediu lichid corespunzător necesităţilor bacteriei (bulion Mueller Hinton). Suspensia obţinută se incubează 2-6 ore la 35°C, timp necesar ca să ajungă la o turbiditate echivalentă cu 0,5 pe scara McFarland. Insămânţarea optimă a plăcilor trebuie realizată în decursul a 15 minute de la preparare, inoculul fiind dispersat pe suprafaţa agarului Mueller Hinton cu ajutorul unui tampon steril scufundat în tubul cu inocul. Pentru a permite eliminarea excesului de umiditate de pe suprafaţa mediului, placa se lăsă cu capacul întredeschis 10-15 minute la termostat, înainte de aplicarea microcomprimatelor. Distribuirea acestora se face individual pentru fiecare microcomprimat (disc) sau cu ajutorul unui dispenser, fiecare disc trebuie să fie uşor presat pentru a avea aderenţă completă la suprafaţa mediului, respectând o distanţa de 24 mm între ele.

După repartizarea discurilor, plăcile se vor incuba la 37°C în poziţie orizontală cu capacul în jos, în condiţii de aerobioză timp de 24 ore. După incubare se citeşte fiecare placă prin măsurarea şi notarea diametrului zonelor de inhibiţie, zone care trebuie să fie uniform circulare, delimitată de

colonii confluente. Măsurarea zonelor de inhibiție se face cu ajutorul unui linear special sau o riglă obişnuită, iar notarea se face în milimetrii. Încadrarea se face în trei categorii: germeni sensibili (S), germeni moderat sensibili sau intermediar (I) şi germeni rezistenți (R), ținându-se seama de valorile prezentate în tabele standardizate.

REZULTATE OBŢINUTE

Evoluția acută şi supraacută a bolii edemelor, cu simptome de o brutaliate deosebită, pune adesea medicul veterinar în situația dificilă de a nu putea institui un tratament eficace care să conducă la salvarea animalului. Tratamentul purceilor cu semne clinice deja exprimate se finalizează cu rezultate foarte slabe sau chiar nule, dar tratamentul colectiv a întregului grup susceptibil cu antibiotice sau chimioterapice, poate avea ca efect reducerea incidenței cazurilor nou apărute. Pentru a spori eficacitatea tratamentelor efectuate, este recomandat ca antibioticele utilizate (alături de medicația de susținere şi de restricționare a alimentației) trebuie să ofere mai multă siguranță în obținerea unui rezultat favorabil.

Tulpina de referință a prezentat următorul comportament: sensibilă la fenivex, flumequin, oxitetraciclină, lincospectin şi colistin; intermediar la neomicină, lincocin forte şi ceftiofur; rezistență la amoxiclilină clavulat.

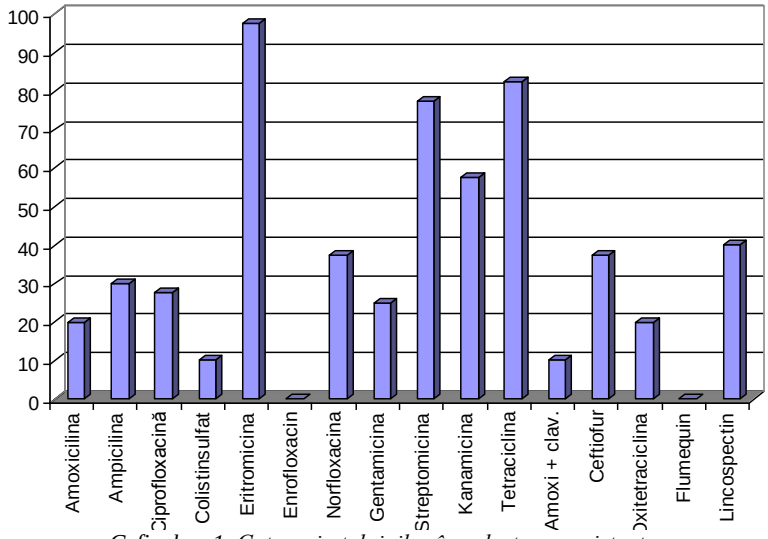
Efectul diferitelor antibiotice asupra tulpinilor testate şi încadrarea acestora în categoriile sensibil, intermedir şi rezistent, sunt prezentate în tabelul nr. 1.

Din analiza datelor se poate observa că există o variabilitate privind efectul antibacterian indus de către fiecare antibiotic, la fiecare înregistrându-se tulpini încadrate la categoria rezistent, intermediar şi sensibil.

Tabel nr. 1 Încadrarea tulpinilor la antibiogramă

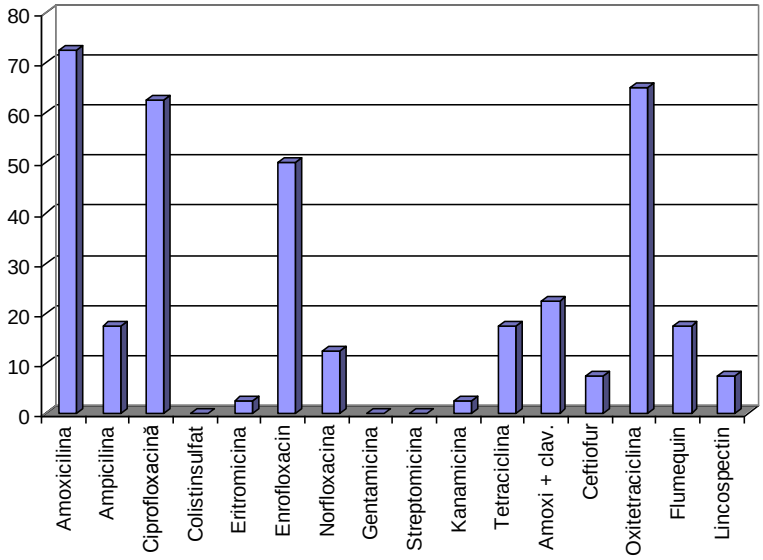
Nr. crt	Antibioticul	Cant/ comp	Nr. tulp.	Rezistent		Intermediar		Sensibil	
				Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
1	Amoxicilina	25 µg	40	8	20.0	29	72.5	3	7.5
2	Ampicilina	10 µg	40	12	30.0	7	17.5	21	52.5
3	Ciprofloxacină	5 µg	40	11	27.5	25	62.5	4	10.0
4	Colistinsulfat	50 µg	40	4	10.0	0	0.00	36	90.0
5	Eritromicina	15 UI	40	39	97.5	1	2.5	0	0.00
6	Enrofloxacin	5 µg	40	0	0.00	20	50.0	20	50.0
7	Norfloxacina	5 µg	40	15	37.5	5	12.5	20	50.0
8	Gentamicina	15 µg	40	10	25.0	0	0.00	30	75.0
9	Streptomicina	10 UI	40	31	77.5	0	0.00	9	22.5
10	Kanamicina	30 µg	40	23	57.5	1	2.5	16	40.0
11	Tetraciclina	30 µg	40	33	82.5	7	17.5	0	0.00
12	Amoxi + clav.	20+10	40	4	10.0	9	22.5	27	67.5
13	Ceftiofur	30 µg	40	15	37.5	3	7.5	22	55.0
14	Oxitetraciclina	30 µg	40	8	20.0	26	65.0	6	15.0
15	Flumequin	30 µg	40	0	0.00	7	17.5	33	82.5
16	Lincospectin	10 µg	40	16	40.0	3	7.5	21	52.5

Încadrarea la categoria rezistent relevă o variabilitate pronunțată cuprinsă între 0% (enrofloxacin şi flumequin) şi 97.5% (eritromicina). Deci față de două antibiotice nu s-au înregistrat tulpini rezistente, acestea fiind enrofloxacinul şi flumequinul. Antibioticele față de care s-a înregistrat rezistență cu valori de peste 50 % sunt următoarele: kanamicina (57.5%), streptomicina (77.5%), tetraciclina (82.5%) şi eritromicina (97,5%). La celelalte antibiotice s-au constatat valori mai reduse ale rezistenței, cuprinse între 0% şi 37,5% (grafic nr. 1).



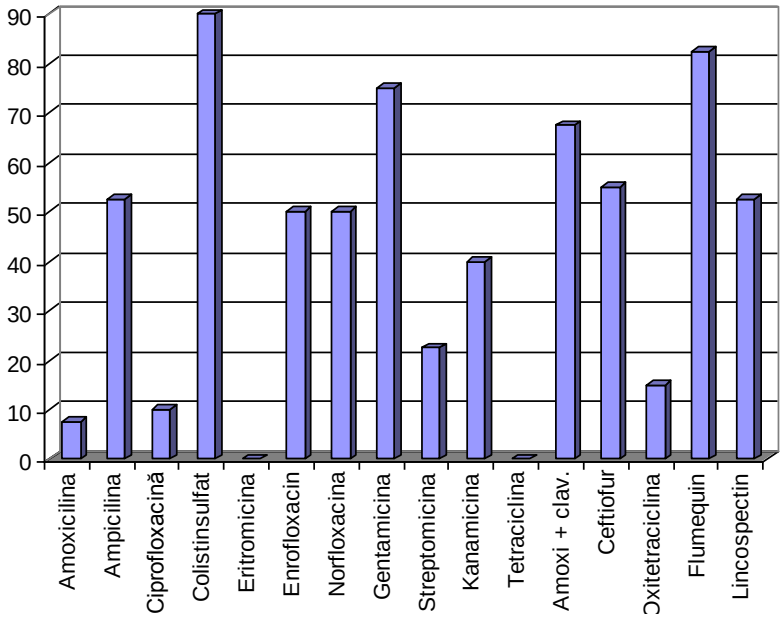
Grficul nr.1 Categoria tulpinilor încadrate ca rezistente

Încadrarea la categoria intermediar a prezentat de asemena o variabilitate pronunţată cuprinsă între 0% şi 72.5%. Faţă de trei antibiotice nu s-au înregistrat tulpini care să poată fi încadrate la categoria intermediar (colistin sulfat, gentamicină şi streptomicină). Eficacitate la categoria intermediar cu valori de 50% şi peste s-a înregistrat faţă de următoarele antibiotice: enrofloxacina (50%), ciprofloxacina (62.5%), oxitetraciclina (65.0%) şi amoxicilina (72.5%) (grafic nr. 2)



Graficul nr. 2 Categoria tulpinilor cu sensibilitate intermediară

Tulpinile încadrate la categoria sensibil au prezentat o variabilitate cuprinsă între 0% (tetraciclina) şi 90% (colistin sulfat). Cele mai eficiente antibiotice cu valori de 50% şi peste, s-a constatat la următoarele: enrofloxacin (50.0%), norfloxacina (50%), 52.5% (lincospectin, ampicilină), ceftiofur (55%), amoxicilina clavulat (67.5%), gentamicina (75%), flumequin (82.5%) şi colistin sulfat (90%) (grafic nr. 3).



Graficul nr. 3 Categoria tulpinilor încadrate ca sensibile

DISCUŢII

Escherichia coli producătoare de verotoxine (shiga like toxină), este considerată ca agent etiologic al bolii edemelor la purcei în perioda imediată post-înţărcare. Numeroase date epidemiologice menţionează o creştere a incidenţei bolii peste tot în lume, inclusiv în ţara noastră, cu forme evolutive şi anatomo-clinice foarte severe, care antrenează pierderi economice însemnate. Factorii ce contribuie la creşterea numărului de cazuri nu sunt pe deplin înţeleşi. Se consideră că între aceştia ar putea fi incluşi o emergenţă a clonelor mai virulente de *E. coli,* cum sunt O149:LT:Sta:Stb:EAST1:F4ac, care se regăsesc frecvent în serotipurile O138, O139 şi O141, şi care au capacitatea de a produce F18 şi verotoxina (VT2e) (8). Se mai incriminează schimbările frecvente în tehnologia de creştere a purceilor îndeosebi în perioada de înţărcare (5, 11).

Dezvoltarea rezistenţei multiple la un şir larg de antibiotice comune, cât şi creşterea prevalenţei şi severităţii sindroamelor postînţărcare necesită măsuri alternative pentru controlul acestora, întrucât nicio strategie nu s-a dovedit eficace în totalitate (5). Tulpinile de *E. coli* izolate dovedesc adesea multirezistenţă la trei sau mai multe antibiotice, incluzând aparamicina, trimethoprim sulfonamidele, spectinomicina şi neomicina. La apariţia acestui fenomen se apreciază că folosirea de antibiotice cu scop profilactic joacă probabil un rol important în favorizearea inducerii rezistenţei microbiene (4). Unele date menţionează că peste 78% din programele de control a diareii postînţărcare şi a bolii edemelor utilizează tratamente profilactice cu antibiotice (13). Mai mult se apreciază că tulpinile considerate primar responsabile de producerea acestei infecţii, respectiv F4 (K88) şi F18, nu sunt eficient controlate prin tratamente profilactice cu antibiotice. Din acest motiv se propune instituirea unei toleranţe zero faţă de utilizarea de antibiotice sau premixuri ce conţin antibiotice în hrana porcilor, chiar dacă acestea au unele efecte benefice privind valorificarea hranei, şi evitarea de moment a producerii unor infecţii. În timp cu siguranţă vor favorizeaza selectarea de tulpini rezistente (4, 13).

Utilizarea profilactică de antibiotice joacă cu siguranţă un rol important în inducerea rezistenţei tulpinilor de *E. coli* cât şi altor bacterii intestinale (4). Mai mult se menţionează şi faptul, că în timp, bacteriile vor dezvolta rezistenţă care poate să persiste timp îndelungat, în ciuda întreruperii utilizării acestor agenţi antimicrobieni, aşa cum s-a observat la cloramfenicol, care a fost interzis din 1985 (14).

Sensibiliatea tulpinilor de *E. coli* izolate de la porci cu boala edemelor a fost investigată de mai mulţi autori, subliniindu-se existenţa unei variabilităţi din acest punct de vedere. Han D. U., et al. (2002), testând sensibilitatea prin MIC_{90} a 128 de tulpini de *E. coli,* menţionează ca având mai bună

eficacitate tetraciclina, ceftiofur şi colistinul (6). Ly Thi Lien Khai et al., (2002) examinând 32 de tulpini arată că acestea au fost sensibile sau intermediar sensibile la colistin, cefalexin, florfenicol, enrofloxacin şi rezistente la ampicilină, dihidrostreptomicină, acid nalidixic şi oxitetraciclină. Cel mai activ s-a dovedit a fi colistinul pe care îl recomandă în efectuarea tratamentului în diareile colibacilare (9). Uemura R., et al., (2003) testând un număr de 57 de tulpini izolate de la porci cu boala edemelor arată că acestea s-au dovedit a avea o susceptibilitate ridicată la peptide şi bicozamicină (bicozamycin) de o manieră similară tulpinii de referinţă (*E. coli* ATCC 23546). Pe de altă parte arată că tulpinile aveau o susceptibilitate redusă la beta-lactami, tetracicline, novobiocin, fosfomicin, trimetoprim şi quinolonele vechi, subliniind că sensibilitatea tulpinilor la antimicrobiene este mult diminuată (15). Ngeleka M., et al., (2003) arată că patotipurile AIDA-I/STb/EAST1 şi AIDA-I/STb erau sensibile la enrofloxacin, gentamicină, neomicină şi trimethoprim-sulphamethoxazole (10). Alte date menţionează rezistenţă la tetracicline, sulfonamide, streptomicină, spectinomicină (3). O bună eficacitate este subliniată pentru antibioticul bicozamycin benzoat (17).

Din cercetările noastre rezultă că tulpinile de *E. coli* testate s-au dovedit sensibile la colistin sulfat (90,0%), flumequin (82,5%) şi gentamicină (75,0%) pe care le recomandăm în efectuarea tratamentelor. Cele mai puţin eficiente s-au dovedit eritromicina, tetraciclina şi streptomicina. Faţă de aceste antimicrobiene se raportează rezistenţă şi în lucrările altor autori. Dacă se însumează categoria valorilor tulpinilor sensibile cu cele cu sensibilitate intermediară, se constată că cea mai bună eficacitate se înregistrează la flumequin şi enrofloxacin (100% sensibilitate), colisin sulfat şi amoxicilină clavulat (90,0% sensibilitate).

Alternativele la utilizarea antibioticelor preocupă numeroase colective de cercetare, care vizează folosirea de probiotice, selectarea şi administrarea unor tulpini producătoare de colicine, folosirea unor mijloace de imunoprofilaxie prin prepararea de vaccinuri antishiga toxine sau seruri imune.

Preparatele probiotice se bazează pe utilizarea unor tulpini bacteriene din alte genuri, cum sunt *Streptococcus fecalis, Clostridium butiricum, Bacillus mesentericus* sau preparate fungice (16), dar se menţionează şi folosirea ca probiotice a unor tulpini de *E. coli* producătoare de colicine. În acest sens, în ţara noastră în unele microferme, s-a folosit cu succes în prevenirea infecţiilor colibacilare tulpina M-951 de *E. coli*, care avea capacitatea de colonizare şi producerea de colicine, împiedecând aderenţa şi colonizarea tulpinilor sălbatice de *E. coli* (12). Utilizarea de colicine (ColE1 şi ColN) ca alternativă la antibiotice pentru prevenirea şi tratmentul infecţiilor colibacilare la porcine şi îndeosebi boala edemelor, este raportată şi de alţi autori (13).

Antibiograma, executată conform standardelor de calitate, poate fi de un real folos în orientarea tratamentelor în boala edemelor, astfel încât antibioticul introdus în schema de tratament, alături de medicaţia de susţinere şi antitoxică, să-şi manifeste cât mai intens efectul antimicrobian (1, 7, 12).

CONCLUZII

1. S-a testat prin metoda difuzimetrică în gel de agar (Mueller Hinton) un număr de 40 de tulpini de *Escherichia coli* izolate de la porci cu boala edemelor, diagnosticul fiind confirmat prin examene de laborator.
2. Tulpinile s-au dovedit sensibile la colistin (90.0%), flumequin (82,5%) şi gentamicină (75,0%), iar rezistenţă s-a înregistrat îndeosebi la eritromicină (97.5%), tetraciclină (82,5%) şi streptomicină (77,5%).
3. Însumând valoarea înregistrată la categoria sensibil cu valoarea înregistrată la categoria intermediar, s-a stabilit următoarea eficacitate: flumequin, enrofloxacin (100%), colistin sulfat şi amoxiclină clavulat (90%).
4. Tulpinile s-au identificat pe baza caracterelor morfologice, culturale şi biochimice, fiind tulpini beta-hemolitice şi producătoare de verotoxine (shiga-like toxine).

BIBLIOGRAFIE

1. *Angelescu M.*, (1988) Ghid practic de antibioterapie – Editura Medicală, Bucureşti, p. 29-49; 219-224;
2. *Boldizsar E., Răpuntean S., Fiţ N.,* (2002) Practicum de Microbiologie Generală – Editura Genesis, Cluj-Napoca, p. 122-134;

3. *Boerlin P., Travis R., Gyles L. C., Reid-Smith R., Hearther Lim Nicol, Nicholson Vivian, McEwen A. Scott, Friendship R., Archambault Marie*, (2005) Antimicrobial Resistence and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario – Applied and Enviromental Microbiology, 71, (11), p. 6753-6761;
4. *Docic M., Bilkei G.,* (2003) Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli,* isolated from east-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics – Journal of Veterinary Medicine, B 50, p. 27-30;
5. *Fairbrother M. J., Nadeau E., Gyles L. Carlton,* (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis and prevention strategies – Animal Health Research Reviews, 61, (1), p. 17-39;
6. *Han D. U., Choi C., Kim J., Cho W. S., Chung H. K., Ha S. K., Jung K., Chae C.,* (2002) Anti-microbial Susceptibility for east1^{+} *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic Pigs in Korea – J. Vet. Med., Series B, 49, (7), p. 346-348;
7. *Hawkey P., Lewis D*., (2005) Medical Bacteriology: Antimicrobial susceptibility testing – Oxford University Press, Second Edition, p. 215-240;
8. *Johansen M., Callesen J.,* (2001) Non-antibiotic prevention of *E. coli* associated diseases in pigs at weaning – The National Committee for Pig Production, Danish Bacon & Meat Council;
9. *Ly Thi Lien Khai*. *Hideki Kobayashi, Tran Thi Phan, Tran Thi Thuy Duyen, Nguyen Anh Tuan, Seishi Yamasaki, Toshiaki Taniguchi*, (2002) Diagnosis of Post-Weaning Diarrhea and Edema Disease due to *Colibacilii* in Pigs in Mekomg Delta, Vietnam – www.ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas.
10. *Ngeleka M., Pritchard J., Appleeyard G., Middleton D. M., Fairbrother J. M.,* (2003) Isolation and association of *E. coli* AIDA-1STb, rather than EAST1 pathotype with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates – Journal Veterinary Diagnosis and Investigations, 15, p. 242-252;
11. *Răpuntean Gh., Răpuntean S.,* (2005) Bacteriologie Veterinară Specială – Editura Academic Pres, Cluj-Napoca, p. 134-137;
12. *Răpuntean Gh., Marica D., Boldizsar E., Răpuntean S.* (2000) – Caracterizarea tulpinii M-951 de *E. coli* utilizată ca probiotic în prevenirea diareei neonatale a purceilor – Lucr. Simp. Actual. Creşt. şi Patol. Anim. Domest., Cluj-Napoca, 24, p. 455-465;
13. *Stahl H. Chad., Callaway R. Todd., Lincoln M. Leslie., Lonergan M. Steven., Genovese J. Kenneth.,* (2004) Inhibitory Activities of Colicins against *Escherichia coli* Strains Responsabile for Postweaning Diarrhea and Edema Disease in Swine – Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48, (8), p. 3119-3121;
14. *Trevis M. Rebeccah, Gyles L. C., Reid-Smith R., Poppe C., McEwen A. S., Friendship R., Janecko Nicol, Boerlin P.,* (2006) Chloramphenicol and kanamicyin resistence among porcine *Escherichia coli* in Ontario – Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 58, p. 173-177
15. *Uemura Ryoko., Sueyoshi Masuo., Nagayoshi Miki., Nagatomo Hiroshi.,* (2003) Antimicrobial Susceptibilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Pigs with Edema Disease in Japan – Microbiology and Immunology, 47, (1), p. 57-61;
16. *Yuji Hiroyuki, Tsuji Atsushi,* (2000) Control Measure of Edema Disease in Pig with Probiotics and Antibiotics – Journal of Livestock Medicine, 444, p. 423-428;
17. *Yoshimi Matsumoto*, (2001) Activity of Bicozamycin against *Escherichia coli* O157:H7 Producing Vero Toxins – Japanse Journal of Bacteriology, 56, (2), p. 455-463.

ASPECTS REGARDING CLINICOPATHOLOGICAL INVESTIGATIONS OF PRIMARY MAEDI-VISNA VIRUS INFECTION

POPESCU Raluca[1], HORHOGEA Cristina[2], PERIANU T. [2]
[1]LSVSA Sf. Gheorghe, Covasna
[2]FMV Iaşi
popralu@yahoo.com

The aim of this study is to syntetise the clinical signs observed in 20 sheeps from different breeds, two to five years old, breeded in different conditions, from various regions of the 38 veterinary circumscriptions of Covasna County. The methods that were used included clinical exam of suspected animals, registration of animals constants (temperature, listening) and morphopathological exam. The presumtiv diagnosis was made on the clinical signs, but the confirmations was made through the serological exams related with results of morphopathological exam.

There were made suplimentary exams to exclude listeriosis, rabies, screpies and toxicosis owed to the forage.

It was prouved the bond between the presence of the progressive pneumonia virus (Maedi visna), the clinical signs more or less eloquent, the presence of specific antibodies and seropositivity of immunodiffusion test and ELISA.

Maedi (ovine progressive pneumonia) and visna are diseases of sheep caused by a retrovirus from *Lentiviridae* family. The causative virus is closely related to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) of goats (***Callan and Van Metre 2004***). Maedi-visna (MV) infection occurs in sheep worldwide, but only some infected sheep develop clinical disease. Maedi-visna is considered to be a multisystemic disease that can affect the lungs, the mammary glands, the central nervous system (CNS) or the joints manifested as dyspnoea, mastitis, lameness and nervous signs, usually affecting animals aged two to three years or older.

The respiratory form (maedi), and the mammary gland infection have been considered to be the most common forms of the disease. The clinical signs develop progressively, beginning with a gradual loss of weight, dyspnoea, induration of the mammary gland and a reduction in milk yield.

The nervous form (visna) affects sheep is characterised by non-suppurative demyelinating encephalitis that caused paraplegia in the hind legs and in some cases total paralysis.

The diseases is characterised by lymphoid proliferation and mononuclear interstitial infiltration in the affected organs.

Once sheep are infected they remain so for the rest of their life, although the reason why they are unable to eliminate the virus is poorly understood. The proportion of infected sheep that develops clinical disease is related to the flock seroprevalence. MV infection can be diagnosed serologically in infected animals using agar gel immunodiffusion (AGID) or ELISA, most readily on a flock basis, although serology is also used to support the presence of pathological lesions in diagnosing clinical cases. Health schemes in several countries rely on the routine monitoring of adult animals in flocks (*Peterhans and col. 2004*).

MATERIAL AND METHOD

There were investigated sheeps from different breeds, two to five years old, breeded in different conditions, from varios regions of the 38 veterinary circumscriptions of Covasna County. The methods that were used were inspection, clinical exam of suspected animals, registration of animals constants (temperature, listening on trachea) and morphopathological exam.

There were clinically examined 20 ovines.

For morphopathological exam brain fragments, taken from dead animals, suspected by maedi visna infection were fixed in 10% formaline isoton solution and sectioned. The slides were included in parafine and stained using HEA (hematoxiline/eosine/ methilen blue) and HE (hematoxiline/eosine) methods.

RESULTS AND DISCUTIONS

From the 20 examined animals 16 ovines (80%) presented nervous symptoms (visna form) and 4 (20%) respiratory signs (maedi). As it twas remined earlier, the sheeps came from entire Covasna County but the most afected area are described in table 1, besides diseases distribution on function of age and sex.

Table 1 Maedi and visna fors repartition in function of region, sex, age

Cases no.		Diseases form		Region	Age/ Sex					
		Maedi	Visna		2 years		3 years		4 years	
					F	M	F	M	F	M
6		-	yes	Chichis	1	-	2	1	2	-
2		-	yes	Ozun	-	-	2	-	-	-
3		-	yes	Aita Mare	-	-	1	-	1	1
1		-	yes	Întorsura Buzăului	-	-	1	-	-	-
2		-	yes	Cernat	1	-	1	-	-	-
2		-	yes	Ghelinţa	-	1	1	-	-	-
2		yes	-	Băţanii Mari	1	-	1	-	-	-
1		yes	-	Malnaş	-	-	-	1	-	-
1		yes	-	Turia	-	-	1	-	-	-
Total	**20**	**4**	**16**		**3**	**1**	**10**	**2**	**3**	**1**

The 16 ovines with nervous and respiratory symptoms come from privat farms from different regions of Covasna County, 6 and 3 respectivelly, as it's observed in table 1.

The clinical signs observed after investigations were represented by attentions loss, weight loss despite de normal apetite in some of them or good body shape in some others, abnormal position of the body, head (***fig. 1***) and legs (***fig.2, 3***), articular changes (***fig.4),*** respiratory clinical signs (***fig. 5***). Some animals presented fever (39,8^{0}C - 40,2^{0}C).

In speciality literature were described some other signs like lips trembling, paresis and paralisis, blindness, behaviour modifications (*Benavides and col. 2006, Callado, A.K.H. and col. 2001, Perea and col, 1999*).

In the next pictures can be observed various aspects of the maedi visna disease, visna form, the diagnostic being established finaly by the serological exams and differential doagnostic with screpie and listeriosis.

Figure 1 Abnormal position of the head (visna)

Figure 2 Abnormal position of the hind limbs (visna)

Figure 3 Abnormal position of the hind limbs (visna)

Clinical examination in animals suspected by maedi form of the disease revealed apathie, reduced weight loss, dyspnoea, abdominal type respiration, increased respiratory frequency in repaused animals, toughened vesicular murmur, tahicardia. Compare to those observations, speciality literature reveals seromucous jetaj, dry caugh, increased lung limphatic noduls (*Araujo and col., 2004, Benavides and col., 2006, Belknap, 2002, Christodoulopoulos, 2006, Perianu, 2005, Tănasă and col., 2004*).

Figure 4
Articular changes (maedi form)

Figure 5
Caugh acces (maedi form)

Respiratory frequency observed at the 4 maedi cases were between 33-70 respirations per minute, and heart frequency between 110-143 per minute.

Hygiene conditions influenced directly disease evolution. Shelters were wet, drab, dark, airless, disease advancing more rapidly. During 3 – 4 weeks, symptoms were emphasized and animals were slaughtered.

A presumtiv diseases dignosis was establish on clinical signs, related with seropositive tests of suspected animals. Virus identification is very helpful, because antibodies presence indicate only infection which is not equivalent with immunity (protection).

To exclude some other infectious diseases or other diseases with similar clinical signs, bacteriological test for listeriosis, screpie Westernblott test and rabies tests using direct immunofluorescence and bioproba on mice were performed. Results were negative in all cases. The forage toxicologic exam was also negativ.

In all cases with visna form, the disease developed progressive, finalised by animalelor slaughtering in slaughter houses. In necropsic exam weren't observed notable modifications.

In histopathological exam perivascular lymphocitar infiltrations were observed ***(fig. 6),*** perivascular oedema ***(fig. 7).***

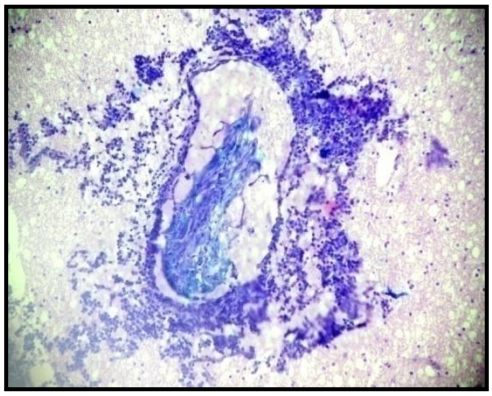


Figure 6 – Perivascular lymphocitar infiltrations. HE stain. Ob. 20x.

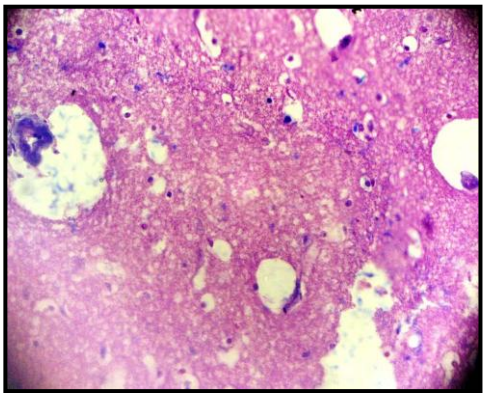


Figure 7 – Perivascular oedema HE stain. Ob. 20x.

Datas from the speciality literature reffering to morphopathological modfocations described cerebrospinal leptomeningitis lesions, nodulare focuses or perivascular muffes formed by macrophages, plasma cells, astrocytes and microglia. (*Biescas and col., 2005, Callan, R.J. and colab., 2004, Georgsson, G. 1994, Kennedy and col.,1992*).

Haematological and biochemical exams showed minor changes, without clinical importance.

CONCLUSIONS

1. There were investigated 20 sheepd from different breeds, two to five years old, breeded in different conditions, from varios regions of the 38 veterinary circumscriptions of Covasna County.
2. Te most affected areas were: Chichis, Ozun, Aita Mare, Întorsura Buzăului, Cernat, Ghelinţa (visna form) and Băţanii Mari, Malnaş, Turia (maedi form).
3. From the clinical point of view there were diagnosticated more cases (16) with nervous symptoms (visna) comparativ with the respiratory form (maedi).
4. In histopathological exam perivascular lymfocitar infiltrations and perivascular oedema were observed.
5. It was demonstrated the corelation between ovine progressive pneumonia virus presence (Maedi visna), clinical signs more or less eloquente, the presence of specific antibodies and seropozitivity of immunodiffuzie test and ELISA.

BIBLIOGRAPHY

1. **Ana K.C. Callado, Soares de Castro, R., Maria F. da Silva Teixeira (2001)** - *Lentivirus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi Visna) revisao e perspectivas*. Pesc. Vet. Bras. 21(3), 87-97.
2. **Araujo,S.A.C., Dantas,T.V.M., Silva, J.B.A., Ribeiro, A.L., Ricarte, A.R.F., Teixeira, M.F.S. (2004).** *Identificacao do maedi visna virus em pulmao de ovinos infectados naturalmente*.Arq.Inst.Biol. Sao Paulo 71, 431-436.
3. **Arenas, A., Maldonado, A., Tarradas, C., Gomez-Villamandos, IJ.C., Sanchez, P., Quezada, M., Carrasco, L. (1999) -** *Patología de los pequenos ruminantes en imágenes (II). Enfermedades de los adultos (enfermedades infectiosas)*. Departamento de Sanidad Animal (Patologia Infecciosa). Departamento de Anatomia y Anatomia Patológica Comparadas. Faculdad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.
4. **Belknap, E.B. (2002) -** *Diseases of the respiratiry system*. In: Pugh, D.G.(Ed), Sheep and goat medicine. Saunders, pp. 107-128.
5. **Benavides, J., Gomez, N., Gelmetti, D., Ferreras, M.C., Garcia-Pariente, C., Fuertes, M., Garcia-Marin, J.F., Perez, V. (2006) -** *Diagnosis of the nervous form of maedi-visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain*. Vet.Rec. 158:230.
6. **Benavides, J., Fuertes, M., Garcia-Pariente, C., Ferreras, M.C., Garcia-Marin, J.F. and Perez, V. (2006) -** *Natural cases of visna in sheep with myelitis as sole lesion in the central nervous system*. J. Comp. Path.134: 219 - 230.
7. **Biescas, E., Preziuso, S., Bulgin, M., DeMartini, J.C. (2005)** - *Ovine lentivirus associated leucomyelitis in naturally infected North American sheep*. Journal of Comparate Pathology. 132: 107 - 116.
8. **Bulgin, M.S. (1990) -** *Ovine progressive pneumonia, caprine arthritis-encephalitis, and related lentiviral diseases of sheep and goats*. Vet. Clin. North. America. Food. Anim. Pract. 6: 691 - 704.
9. **Callan, R.J. and Van Metre, D.C. (2004).** *Viral diseases of the ruminat nervous system*. Vet. Clin.of North Am. : Food animal practice. 20: 327 - 362.
10. **Christodoulopoulos, G. (2006).** *Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries*. Small Ruminat Research 62: 47 - 53.
11. **Cynthia B., Wolf (1998) -***Ovine progressive pneumonia in sheep*. Regents of the University of Minnesota.
12. **DeMartini, J.C., De la Concha Bermejillo, A. (1990) -** *Ovine lentivirus infection : manifestations and diagnostic on diseases of small ruminants*. Corvallis, OR, June 7 - 9. pp. 64 - 69.
13. **Dungu, B., Vorster, J., Bath, G.F., Verwoerd, D.W. (2000) -** *The effect of a natural maedi-visna virus infection on the productivity of South African sheep*, Onderstepoort. J. Vet. Res. 67: 87 - 96.
14. **Georgsson, G. (1994) -** *Neuropathologic aspects of lentiviral infections*. Annals of the New York Academi of Science. 724: 50 - 67.
15. **Kennedy, P.G.E. (1992) -** *Neurological aspectsof lentiviral infections in animals*. In:Bailliere's Clinical Neurology M.N. de Rossor, Ed. Balliere-Tindall London, 41-58.
16. **Perianu, T., Nicolae, S., Carp-Cărare, M., Elena Velescu, Nicolae, A ., Spataru, T., Irina – Oana Tănase (2005) -** *Boli infecţioase ale animalelor*. Viroze. Vol. II. Ed. Universitas XXI, Iasi.
17. **Tănasă, R., Bucur, E.O., Popovici,A., Bărboi, G., Ana Cişmileanu (2004) -** *Investigaţii clinice şi morfopatologice efectuate pe ovine seropozitive la infecţia cu virusul maedi visna*. Studii şi Cercetări de medicină veterinară 10, 67-82.

INVESTIGATIONS REGARDING SEROLOGICAL SURVEILLANCE FOR MAEDI-VISNA VIRUS IN SHEEPS

POPESCU Raluca [1], HORHOGEA Cristina[2], PERIANU T.[2]
[1] DSVSA Sf. Gheorghe, Covasna
[2] FMV Iaşi
popralu@yahoo.com

Maedi Visna virus infection was evaluated in sheeps from 38 veterinary circumscriptions in Covasna County, Romania, during 2003-2007. The aim of this work was to investigate whether an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) or AGID (agar gel immunodiffusion) tests were useful for early detection of maedi-visna virus (MVV) infection in sheep under field conditions.

Serological examinations were performed on a total of 7116 sheep serum samples, two to five years. ELISA results were compared with those of the agar gel immunodiffusion (AGID) test.

The tests revealed the fact that using one of the two mentioned methods for diagnostic and confirmation, 1742 serum samples were positives. In 2003 from 2019 serum samples 405 were positives, in 2004 from 830 samples 193 were positives, in 2005 from 1545 samples 390 were positives, in 2006 from 1140 serum samples, 297 were positives, in 2007 from 1582 samples 457 were positives.

Key words: sheep, Maedi-visna, ELISA, AGID, Covasna

Maedi-visna virus (MVV) or ovine progressive pneumonia virus is an ovine lentivirus widespread in many countries all over the world, and both clinical and subclinical infections cause substantial economic losses. The virus can causes a persistent infection that can be demonstrated in most infected sheep by serologic assays detecting specific antibodies. One of the most used diagnostic methods for detecting and controlling infection in sheeps is the agar gel immunodiffusion (AGID) test, highly specific but with low sensitivity and interpretation of results depends on the experience of the person performing the test. More sensitive and objective to detect seroconversion is enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Different ELISAs have been developed for detection of MVV infection

The researches were made on 7116 samples from Covasna County sheeps during 2003 – 2007. The samples came from two to five years old, different breeds (specially Tigaie and Spanc) sheeps, various geographic areas (predominant mountain with lower temperatures and hills), raised in different hygiene conditions.

The biologic material was represented by serum samples obtained from venous blood taken from the jugular vein in 9 ml steril tubes with cloth activator factor.

MATERIALS AND METHODS

In cases of preclinical disease, a wide array of tests is used to detect maedi visna infection. These tests have proved successful in practice, but even up to now there is no universally accepted gold standard to determine the sensitivity and specificity of the tests used. The tests are based on the detection of either antibodies or virus.

The most convenient way to diagnose maedi visna virus infections is to perform serology. A variety of laboratory techniques are available for this purpose, including the agar gel immunodiffusion (AGID) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

We used serological diagnosis testing for gp 135 antibodies in serum using the ***Agar – gel immunodiffusion method (Insitut Pourquire***, 2003) and ELISAs: indirect ELISA ***CHEKIT CAEV/MVV Screening, IDEXX Laboratories*** which detect antibodies against maedi visna virus, competition ELISA ***Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Antibody Test Kit, VMRD Inc.*** which detect antibodies against viral gp 135 in sheeps with maedi visna and goat with arthritis encephalitis, indirect ELISA ***MAEDI – VISNA/CAEV Serum, Pourquier Institut***, which detect transmembranar glycoproteins gp 44, cover glycoproteins gp 135 and recombined protein p 28, produced by the gag gene, that is in the componence of viral capsid in caprine arthritis encephalitis virus). ELISAs are suitable for screening large numbers of samples and are more sensitive than AGID.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The blood samples were obtained from animals which presented certain clinical signs, specially nervous, respiratory and joint problems, but from appearently healthy animals also.

For a better security of the results in case of a positive result using ELISA test or agar – gel immunodiffusion method, the tests were repeted, the positivity being confirmed in all cases. In a small number of cases with positive result the second serological test was executed on fresh serum samples obtained from the same animals, the results being confirmed.

The repartition of samples in function of year, sex, breed and age is synthetised in table 1.

Table 1 Samples repartition in function of year, sex, breed and age

Year	Samples number	Sex		Breed		Age			
		F	M	Tigaie	Spanc	2 years	3 years	4 years	5 years
2003	2019	1899	120	1999	20	330	1099	323	267
2004	830	687	143	778	52	227	275	270	58
2005	1545	1425	120	1495	50	540	590	342	73
2006	1140	1001	139	1092	48	325	470	210	135
2007	1582	1436	146	1532	50	430	498	387	267
Total	7116	6448	668	6896	220	1852	2932	1532	800

From a total number of 7116 samples obtained during 2003-2007, only 1742 samples revealed the presence of antibodies against maedi visna virus (24,48%), the serological result being positive.

The results obtained after the serological examination are syntetised in the following (table 2).

Table 2 Results obtained in serological examination

Year	Testng method	Positive		Negative		Number of tested serum samples	
2003	ELISA	189	405	271	1614	460	2019
	AGID	216		1343		1559	
2004	ELISA	105	193	125	637	230	830
	AGID	88		512		600	
2005	ELISA	94	390	136	1155	230	1545
	AGID	296		1019		1315	
2006	ELISA	214	297	566	843	780	1140
	AGID	83		277		360	
2007	ELISA	367	457	855	1125	1222	1582
	AGID	90		270		360	
TOTAL	ELISA	969	1742	1953	5374	2922	7116
	AGID	773		3421		4194	

In 2003 were tested 2019 serum samples (460 through ELISA and 1559 through immunodiffusion), 405 being positive. Using ELISA test 189 samples were positive (41%) and 271 negative (59%) (***fig. 1, 2***). Using AGID test 216 samples were positive (13,85%) and 1343 negative (86,15%). (***fig.4***)

To establish a sensibility between the two tests, from the 189 serum samples positive in ELISA, 89 were tested by AGID too, 80 being positive and 9 negative. So, the sensibility degree is approximatly 90% .

Comparing with the speciality literature, in various studies, a concordancy till 87,3% between ELISA and AGID test is mentioned . (***Varea and col., 2001***).

In 2004 830 serum samples (230 through ELISA and 600 through immunodiffusion) were tested, 193 being positive. Using ELISA test 105 samples were positive (51,72%) and 125 negative (48,28%). Using AGID test 88 samples were positive (14,66%) and 512 negative (85,34%).

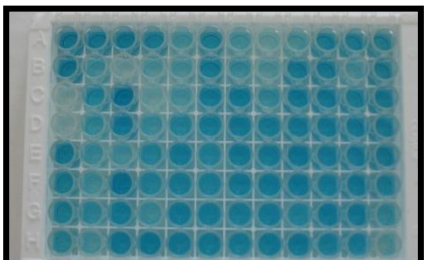


Figure 1 – Positive reaction in ELISA test

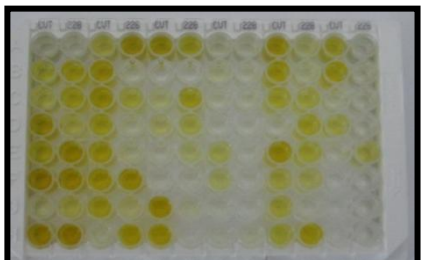


Figure 2 – Positive reaction in ELISA test

In 2005 1545 samples (230 through ELISA and 1315 through immunodiffusion) were tested, 390 being positive. Using ELISA test 94 samples were positive (40,86%) and 136 negative (59,14%). Using AGID test 296 samples were positive (22,5%) and 1019 negative (77,5%).

In 2006 1140 serum samples (780 through ELISA and 360 through immunodiffusion) were tested, 297 being positive. Using ELISA test 214 samples were positive (27,43%) and 566 negative (72,57%). Using AGID test 83 samples were positive (23,05%) and 277 negative (76,95%). The tests revealed the fact that in 2006 the disease was extended in all 38 circumscriptions of the Covasna County.

Following investigations it was observed that the extention of infection took place because of uncontroled animals movement and because sometimes infected animals weren't excluded from the effectives.

In 2007 the serological tests executed on 1582 samples (1222 through ELISA and 360 through immunodiffusion) showed that 457 samples were positive. Using ELISA test 367 samples were positive (30,03%) and 855 negative (69,97%). Using AGID test 90 samples were positive (25 %) and 270 negative (75%).

Because sheep identification and crotaliation started in Romania in 2005, serum samples examined for the detection of antibodies during 2003 – 2004 came from farms with a small number of animals (less then 5) or the animals were identified by name, breed, particular signs. The serum samples tested between 2005 – 2007 came from crotaliated animals.

If in 2003 serological tests developed the presence of maedi visna virus antibodies in sheep from 25 veterinary circumscriptions, the number of infected circumscriptions increased every year and in 2006, 2007 maedi visna virus antibodies were detected in all 38 county veterinary circumscriptions (***fig. 3***).

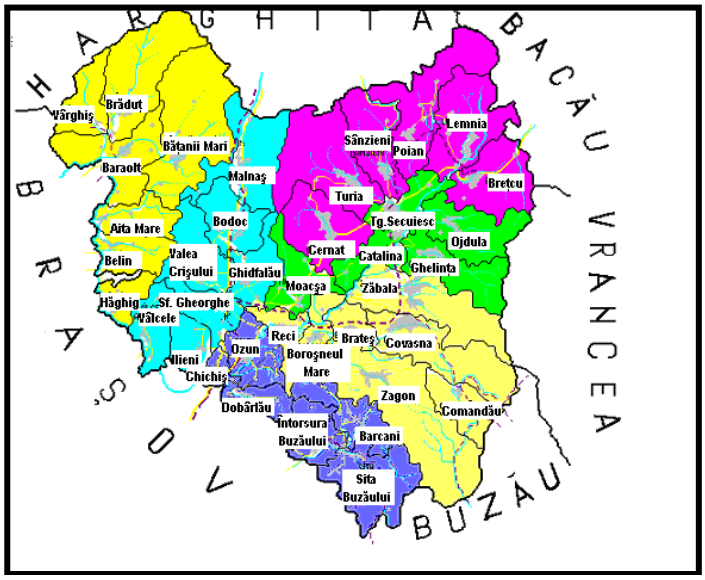


Figure 3 –Covasna County Map with all 38 veterinary circumscriptions

The extension of the disease was influenced by some factors like: animals circulation, animals selling and buying without serological exams, hygiene conditions, elimination of the infected animals from the flock.

For the serological examination were used ELISA kits, with a sensitivity and specificity depending of antigen quality and more specific diagnostic test (immunodiffusion). Various studies reveals datas reffering chaacteristics of the two tests, comparative studies using three or even five diagnostic kits. (***Brinkhof and col., 2007, Castro and col., 2000, Celer and col., 1998, Krassnig and col., 1998, Toft and col., 2007***).

For the same reason were used various ELISA comerciale tests, some of them with monoclonal antibodies, capsid protein p 25, or transmembranar protein. (***De Andrés and col., 2005, DeMartini and col., 1999, Fevereiro and col., 1999, Lynn and col., 2003, Saman and col., 1999***).

In the spaciality literature are also datas regarding some comparative studies between ELISA and AGID with PCR confirmations. (***Knowles and col., 1997, Wagter and col., 1998***).

In our study 30 samples were tested in paralel with the 3 ELISA kits and AGID method. After the tests were prformed, following results (syntethised in table 3) were obtained.

Table 3 Comparative results obtained in ELISA and AGID

ELISA / VMRD		ELISA / IDEXX		ELISA / Pourquier		AGID / Pourquier	
+	-	+	-	+	-	+	-
24	6	26	4	24	6	26	4

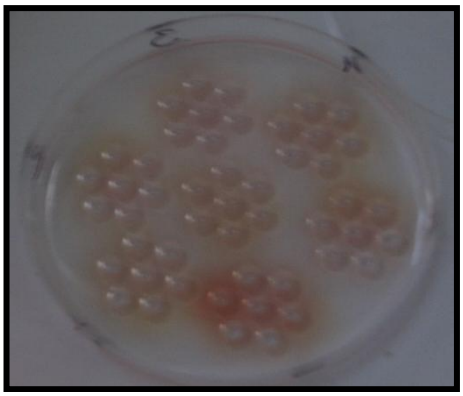


Figure 4 – Agar plate for AGID method after serum samples repartition

It was observed that the biggest sensitivity and specificity have it ELISA produced by IDEXX Laboratories, from the 30 tested samples obtaining a postive result for 26 samples (86,66%), result confirmed totaly using agar immunodiffuion test produced by Pourquier Institute. Between ELISA VMRD Inc. And ELISA Pourquier Institute and diagnostic test produced by Pourquier Institute it was observed a discrepancy of 2 samples, in ELISA test being obtainde 2 fals negative results.

CONCLUSIONS

1. Following researches during 2003 – 2007 variations of the maedi visna infections distribution were observed.
2. There were used 3 comercial kits ELISA tests (indirect, competition) and agar immunodiffusion (AGID).
3. In 2004 were detected 84 positive cases, in 2005 was an increasing of 194 positive cases, in 2006 was observed a decreasing till 166 positive cases, and in 2007 a new increasing till 275 cases.
4. If in 2003 serological tests developed the presence of maedi visna virus antibodies in sheep from 25 veterinary circumscriptions, the number of infected circumscriptions increased every year and in 2006, 2007 maedi visna virus antibodies were detected in all 38 county veterinary circumscriptions

5. It was observed that the biggest sensitivity and specificity have it ELISA produced by IDEXX Laboratories, from the 30 tested samples obtaining a postive result for 26 samples (86,66%), result confirmed totaly using agar immunodiffuion test produced by Pourquier Institute.

BIBLIOGRAPHY

1. **Brinkhof, J., Van Maanen, C. (2007) -** Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays an agar gel immunodiffusion tests for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. Clin. Vacc.Immunol. 14, 1210-1214.
2. **Castro, R.S., Leite, R.C., Azevedo, E.O., Tabosa, I., Nascimento, S.A., Oliveira, M.M.M., Costa, L.S.P., Alencar, C.A.S., Callado, A.K.C., Melo, L.E.H., Freitas, A.A. (2000) -** Anticorpos contra lentivirus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi Visna) em caprinos sem raca definida dos Estados Pernambuco e Paraiba.In: XXVII Congr.Bras.Vet. 84.
3. **Celer, V.Jr., Celer, V., Nemcova, H., Zanoni, R.G., Peterhans, E. (1998) -** Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. J.Vet.Med.B. 45, 183-188.
4. **De Andrés, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D. (2005) -** Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. Vet Microbiol.107 (1-2):49-62
5. **DeMartini, J.C., De la Concha Bermejillo, A. (1990)**. Ovine lentivirus infection: manifestations and diagnostic on diseases of small ruminants. Corvallis, OR, June 7 - 9. pp. 64 - 69.
6. **DeMartini, J.C., Halsey, W., Boshoff, C., York, D., Howell, M.D. (1999) -** Comparation of a maedi-visna virus CA –TM fusion protein ELISA with other assays for detecting sheep infected with North American ovine lentivirus strains. Vet. Immunopathol. 71, 29-40.
7. **Fevereiro, M., Barros, S., Fagulha, T. (1999) -** Development of a monoclonal antibody blocking ELISA detection of antibodies against maedi-visna virus. J.Virol.Methods 81, 101 – 108.
8. **Knowles, D.P. (1997) -** Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract., 13: 1 - 11.
9. **Krassnig, R., Schuller, W. (1998) -** Continuation of the observation and serological investigation of a maedi-visna virus infected sheep flock from January 1990 to June 1996. Dtsch. Tierartztl. Wochenschr .105, 50-53.
10. **Lynn, M., Hermann, Cheevers, W.P., Katherine L., Marshall, McGuire, T.C., Melinda M., Hutton, Lewis, G.S., Knowles, D. (2003) -** Detection of serum anitibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis encephalitis virus competitive Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 862-865
11. **Saman, E., Van Eynde, G., Lujan, L., Extramania, B., Harkiss, G., Tolari, F., Gonzales, L., Amorena, B., Watt, N.J., Badiola, J.J. (1999) -** A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infection in small ruminants. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6, 734-740.
12. **Toft, N., Akerstedt, J., Tharaldsen, J., Hopp, P. (2007) -** Evaluation of three serological tests for diagnosis of maedi visna virus infection using latent class analysis. Vet. Microbiol. 125, 77-86.
13. **Varea, R., Monleon, E., Pacheco, C., Lujan, L., Bolea, R., Vargas, M.A., Van Eynde, G., Saman, E., Dickson, L., Harkiss, G., Amorena, B., Badiola, J.J. (2001) -** Early detection of maedi visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. J. Vet. Diagn. Inv. 13, 301-307.
14. **Wagter, L.H., Jansen, A., Bleumink-Pluym, N.M., Lenstra, J.A., Houwers, D.J. (1998) -** PCR detection of lentiviral GAG segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. Vet. Commun. 22, 355-362.
15. **IDEXX Laboratories (2007)** CAEV/MVV Antibody test kit.
16. **Insitut Pourquire (2003). S**erologic diagnostic of Visna Maedi diseases using immunodiffusion.
17. **Insitut Pourquire (2005). S**erologic diagnostic of Visna Maedi diseases using ELISA.
18. **VMRD Inc. (2007).** Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Antibody Test Kit

CARACTERIZAREA MORFOLOGICĂ, CULTURALĂ ŞI BIOCHIMCĂ A UNOR TULPINI DE *NEISSERIA SP*., IZOLATE DE LA ANIMALE

RĂPUNTEAN S., RĂPUNTEAN Gh., CHIRILĂ F., FIŢ N., NADĂŞ G.
USAMV Cluj-Napoca
grapuntean@usamvcluj.ro

A number of 20 Neisseria sp. strains isolated from collected samples, from both affected and healthy animals were examined. For the strains identification, the inoculation loop was used to disperse and dilute the microorganisms on liquid and solid nutrient growth medium (blood, glucose and Muller-Hinton agar). The incubation was made at 37ºC in aerobic conditions, and the culture developed in 48 to 72 hours. Neisseria sp., colonies had 1-2 mm diameter, convex shaped, shiny, opaque, pigmented in yellow or grey-white colour. From the colonies with typical morphology, staining revealed diploid cells, of renal shape, Gram negative. Some of the strains manifested resistence to alcohol–aceton action. The biochemical characterization was made using the following tests: oxidase, catalase, TSI development capacity (glucose, lactose, saccharose, hydrogen sulfide), citrate utilization, KOH and the modification induced in API NH (Neisseria, Haemophylus) identification standardized system (BioMerieux

În clasificarea taxonomică actuală neisseriile sunt încadrate în familia *Neisseriaceae*, genul *Neisseria*, în care sunt incluse 29 de specii şi subspecii. Dintre acestea două specii sunt foarte cunoscute, respectiv *N. gonohorreae* şi *N. meningitidis*, care sunt patogene pentru om. Celelalte specii sunt considerate comensale şi se găsesc pe mucoasele omului şi animalelor (4, 17). Relaţia acestora cu tegumentele pare să fie tranzitorie şi superficială şi nu induc formarea de anticorpi specifici. Cu toate acestea în literatura de specialiate apar semnalări, tot mai frecvente, de implicare a speciilor de *Neisseria,* altele decât cele două recunoscute ca patogene, în producerea unor afecţiuni la om sau la animale, mai ales pe organisme cu diferite forme de imunosupresie. La om sunt descrise implicarea în producerea de endocardite, meningite, otite, artrite, septicemie, leziuni pulmonare, plăci dentare, complicarea unor plăgi (mai ales cele cauzate de muşcături de câine) şi altele, evoluând ca infecţii oportuniste la pacienţii cu imunodeficite (1, 4, 6, 9, 13, 16). La animale s-au descris cheratoconjunctivite la ovine şi caprine (*N. ovis*), mamite la vaci, rinite şi conjunctivite la câini şi pisici (*N. canis, N. lactamica, N. flavescens, N. sicca, N. animalorum, N. zoodegmatis*), îmbonăviri respiratorii la animale de laborator (*N. cuniculi, N. denitrificans, N. animalis, N. caviae*), afecţiuni dentare (*N. dentiae*). Pe de altă parte prezenţa neiserrilor comensale în mediile de cultură crează dificultăţi de diferenţiere faţă de neisserile patogene, cât şi faţă de alţi coci, (îndeosebi micrococi, stafilococi), cât şi faţă de specii ale unor bacili Gram negativi pigmentogeni în galben (*Flavobacterium, Alcaligenes*) sau care produc colonii mucogene (*Klebsiella, Acinetobacter*) (12).

MATERIAL ŞI METODĂ

Au fost prelucrate un număr de 30 probe recoltate de la animale clinic sănătoase provenite de la vaci, iepuri şi cobai, (câte 10 probe de la fiecare specie) şi 50 probe provenite de la alte specii (câini, pisici, viţei, vaci, oi) care au prezentat diferite afecţiuni (conjunctivită, rinită, otită, faringită, dermatită, mamită), iar unele tulpini s-au izolat din lapte mastitic şi din plăcile de cultură, care s-au contaminat în timp din aer.

Cultivarea s-a făcut pe următoarele medii de cultură: bulion glucozat, agar glucozat, agar cu sânge, mediul Mueller Hinton şi agarul MacConkey (pentru diferenţiere de Gram negativi). Proba recoltată se însămânţa iniţial în mediul lichid şi pe un mediu solid, efectuând dispersii cât mai ample pentru a obţine colonii izolate. Dacă pe mediul solid nu se obţineau colonii, se proceda la însămânţarea altor plăci cu mediu solid, pornind de la cultura primară obţinută în bulion. Tuburile şi plăcile de cultură s-au incubat la termostat la temperatura de 37°C şi se examinau zilnic, timp de până la o săptămână. La examinare se proceda la o apreciere generală a caracterelor culturale făcută cu ochiul liber, dar în cazul plăcilor cu mediu solid, pentru perceperea unor detalii de structură şi cromatică a coloniilor, se făcea o examinarea la lupa stereo.

Pentru caracterizarea morfologică a germenilor s-au efectuat frotiuri din ambele medii de cultură menţionând că, în cazul coloniilor, alegerea acestora s-a făcut sub lupă. Frotiurile s-au colorat

prin metoda Gram, fiind respectaţi cu strictețe timpii de colorare şi pregătirea reactivilor, cunoscând că neisseriile pot manifesta rezistență la decolorarea cu alcool-acetonă.

Caracterizarea biochimică s-a făcut în baza următoarelor teste: oxidază, catalază, dezvoltarea pe mediile politrope MIU (mobilitate, indol, urează), TSI (glucoză, lactoză, zaharoză, hidrogen sulfurat), Simmons (utilizare citrat), comportarea la KOH 3%, cât şi a modificărilor produse în sistemul standardizat de identificare API NH (Neisseria, Haemophylus) (BioMerieux).

REZULTATE OBŢINUTE

Caracterizarea culturală. Toate tulpinile s-au dezvoltat pe mediile de cultură utilizate, la temperatura de 37°C în condiţii de aerobioză. În mediile de cultură neisseriile se dezvoltă moderat sau abundent, încât caracterele culturale pot fi interpretate cu uşurinţă. În toate cazurile trebuie avut în atenţie diferenţierea de alţi coci (stafilococi, micrococi), cât şi faţă de bacterii Gram negative pigmentate în galben, (genurile *Flavobacterium, Alcaligenes*), cât şi de celel pigmentate în alb cenuşiu cu caracter mucogen (*Klebsiella, Acinetobacter*).

În *mediu lichid* cultura a devenit vizibilă după 24-36 de ore, constatându-se turbiditate moderată, şi formarea treptat a unui depozit dens şi consistent, de culoare galbenă sau cenuşie, care la agitare se omogenizează cu dificultate, rămânând aderent de fundul tubului. S-a constatat că dezvoltarea este mai abundentă în jumătatea superioară a mediului, fiind favorizată de contactul cu aerul.

Pe *mediile solide* s-a constatat formarea de colonii, într-un interval de 36-48 de ore care, la examinarea cu ochiul liber, aveau dimensiuni de aproximativ 1-2 mm diametru, bombate, opace, pigmentate în galben sau alb cenuşiu, lucioase sau mate, cu marginile regulate (fig. 1). Examinate la lupă coloniile prezentau diferenţe în ceea ce priveşte nunaţa cromatică (galben, galben crem, galben cenuşiu), marginile bine circumscrise sau uşor lobate, erau crescute în înălţime de aspect conic sau mamelonat, suprafaţa netedă lucioasă sau mată (fig. 2). Menţionăm că s-au observat frecvent colonii grupate câte două, probabil acestea s-au dezvoltat din cele două celule care rămân ataşate una de alta pe mediul de cultură, rezultând două colonii, care imită aspectul microscopic al grupării diplo (fig. 3). Coloniile nu sunt aderente de mediu, se fragmentează uşor la atigerea cu ansa şi se omogenizează uniform în picătura de lichid atunci când se fac frotiurile. O singură tulpină a produs pe toate mediile de cultură solide colonii mucoase, opace, neregulate, de 2-3 mm diametru, cu tendinţă de confluare. Acest aspect caracterizează specia *N. mucosa.*

Menţionăm că cele mai multe din tulpinile izolate prezentau pigment de culoare galbenă. S-au izolat însă şi tulpini a căror colonii erau de culoare albă cenuşie, opace sau semiopace, cu dimensiuni de 1-1,5 mm, netede, lucioase, mucogene, fiind posibilă confundarea cu coloniile altor germeni Gram negativi, mai ales mucogeni (*Klebsiella, Acinetobacter*). În astfel de cazuri s-a procedat la efectuarea testului cu KOH şi însămânţarea pe mediul MacConkey.

Pe geloză sânge neisserile se dezvoltă bine şi formează colonii care au în general caracterele descrise mai sus, cu menţiunea că la unele tulpini era mai intens exprimată culoarea galbenă sau albă cenuşie şi aspectul lucios sau mat. Cultivarea pe acest mediu urmăreşte evidenţierea producerii de hemolizine (fig. 4). Din cele 20 tulpini examinate 9 au produs hemoliză pe agar cu sânge de oaie. Zonele de hemoliză erau înguste de cca 1-2 mm şi în cele mai multe cazuri a fost completă.

Pe agarul MacConkey însămânţatrea s-a făcut cu scopul de a diferenţia neisseriile de germenii Gram negativi pigmentogeni şi/sau mucogeni. Tulpiniile de *Neisseria* nu s-au dezvoltat pe acest mediu, în schimb tulpinile bacteriilor Gram negative prezentau colonii de 1-1,5 mm, rotunde, netede, convexe, lucioase, pigmentate în galben strălucitor, înconjurate de o bordură translucidă sau aveau un aspect mucos. Efectuarea unui frotiu, colorat Gram, permite cu siguranţă diferenţierea de neisserii, punându-se în evidenţă bacili Gram negativi.

Pentru diferenţiere se poate face şi proba cu KOH 3%. Pe o lamă se depune o picătură din soluţia de KOH, în care se realizează o suspensie densă de germeni recoltaţi din colonii. Se omogenizează cu ansa făcând mişcări circulare. În cazul germenilor Gram negativi, în 1- 2 minute suspensia de pe lamă devine vâscoasă, iar la ridicarea ansei amestecul se întinde sub forma unui fir. În cazul neisseriilor, chiar dacă sunt Gram negative, suspensia de pe lamă se menţine omogenă şi nu se produc modificări de vâscozitate.

Pe mediul Mueller Hinton tulpinile de *Neisseria* se dezvoltă bine, dar caracterele coloniilor nu diferă ca dimensiuni şi aspecte cromatice de cele constatate pe geloza glucozată sau pe mediul cu sânge. Considerăm că favorizează o dezvoltare mai rapidă în 24-36 de ore.

Caracterizarea morfologică şi tinctorială. Aspectul morfologic al neisseriilor constituie un element important în baza cărora se pot identifica uşor şi stabilirea apartenenţei la genul *Neisseeria*, cu condiţia ca frotiurile să fie subţiri şi să se respecte timpii de colorare şi concentraţia soluţiilor folosite. O atenţie sporită trebuie acordată timpului de decolorare care trebuie să fie uşor prelungit. Neisseriile au aspectul unor coci asimetrici, grupaţi diplo, de forma boabelor de cafea, cu părţile aplatizate faţă în faţă. Mai rar apar grupări în tetrade, dar şi în aceste cazuri gruparea diplo se distige uşor, cât şi aspectul reniform. La unele tulpini s-a constatat rezistenţă la decolorare, celulele având o nuanţă violetă, dar se putea distige clar gruparea diplo şi aspectul caracteristic al boabelor de cafea. În unele preparate s-a putut evidenţia prezenţa unei formaţiuni de culoare roz ce includea cele două elemente, având aspectul unei capsule subţiri.

S-a procedat la efectuarea de măsurători micrometrice, în urma cărora s-au stabilit dimensiunile. Cele mai multe tulpini s-au încadrat între 1-1,2 µm, două tulpini au avut dimensiuni mai mici de 0,6-0,8 µm şi un număr de 5 au avut dimensiuni de 1,2-1,4 µm. În frotiurile făcute din cultura dezvoltată în mediul lichid, neisserile au avut dimensiuni mai mari, comparativ cu cele constatate în frotiurile făcute din colonii.

Caracterizarea biochimică. Caracterizarea biochimică s-a făcut în baza următoarelor teste: oxidază, catalază, dezvoltarea pe mediile politrope TSI (glucoză, lactoză, zaharoză, hidrogen sulfurat), MIU (mobilitate, indol, urează), utilizare citrat, comportarea la KOH, cât şi a modificărilor produse în sistemul standardizat de identificare API - NH (BioMerieux) (18).

Testul oxidazei este unul din cele mai semnificative pentru identificarea neisseriilor. Reacţia s-a efectuat pe benzi de hârtie de filtru îmbibate cu soluţie proaspăt preparată cu dimethyl-p-phenylenediamine hydrochloride. Toate tulpinile au dat reacţie pozitivă (spot de culoare violetă) care s-a produs în 10-15 secunde, la unele tulpini chiar instantaneu. La 2 tulpini reacţia s-a produs mai lent în 30 secunde.

Testul catalazei are scopul de evidenţiere a producţiei de catalază. Pe lame pentru frotiuri s-a depus câte o picătură de apă oxigenată, în care s-a efectuat o suspensie din germenii prelevaţi dintr-o colonie. Reacţia pozitivă se caracterizează prin producerea unei efervescente în amestecul făcut pe lamă, manifestat prin producerea unor bule de gaz care se sparg rapid. S-au constatat diferenţe în intensitatea reacţiei, notarea fiind apreciată cu 4+ până la 1+. Reacţia s-a notat cu 4+ în cazul în care aceasta s-a produs instantaneu, cu foramarea de bule mari, care se sparg rapid degajând oxigen, aspectul fiind de efervescenţă accentuată (caracter exploziv). Acest tip de reacţie s-a constatat la 13 tulpini (65%), la celelalte reacţia fiind mai puţin intensă, fiind notată cu 2+ şi 3+, aspect observat la 7 tulpini (35%).

Insămânţarea pe unele mediile politrope a relevat caractere variabile. Pe mediul TSI s-a constatat că toate cele 20 de tulpini testate au fermentat glucoza (culoare galbenă în porţiunea dreaptă) şi 6 au fermentat şi lactoza (culoare galbenă în porţiunea înclinată), ceea ce a permis încadrarea lor ca *N. lactamica,* menţionând că este singura specie ce fermentează lactoza. Nici o tulpină nu a produs hidrogen sulfurat. Pe mediul MIU s-a constatat că neisseriile sunt imobile, nu produc indol, iar în privinţa ureazei reacţia a fost negativă.

Galeria API NH este constituită din 10 microtuburi conţinând substraturi sub formă deshidratată, care permit realizarea a 12 teste de identificare (reacţii enzimatice sau de fermentare a zaharurilor). În timpul incubării ca urmare a activităţii metabolice se produc modificări de culoare, care pot fi spontane sau după adăugarea unor reactivi (JAMES şi ZIM B). Galeria API NH permite identificarea următoarelor specii: *N. cinera, N. gonorrhoea, N. lactamica, N. meningitidis, N. polisaccharea.* Testul ne-a permis identificarea a 6 tulpini din specia *N. lactamica* şi 4 din specia *N. polysaccharea.* Celelalte tulpini au fost netipabile.

DISCUTII

Neisseriile au la ora actuală următoarea încadrare taxonomică: regnul *Bacteria,* încrengătura (filum) *Protobacteria*, clasa *Betaprotobacteria*, ordinul *Neisseriales*, genul *Neisseria*, în care sunt incluse mai multe specii întâlnite atât la om cât şi la animale. Speciile componente ale genului sunt

foarte numeroase, fiind incluse un număr de 29, unele având subspecii. Se menţionează însă producerea unor reaşezări taxonomice, amintind în acest sens că unele specii sunt considerate "false neisserii" (*N. caviae, N. ovis, N. cuniculi*), care au fost încadrate în alte genuri (3, 15). Amintim şi identificarea de noi specii, cum sunt *N. animaloris* şi *N. zoodegmatis* (14).

Habitatul neisseriilor este reprezentat din mediul exterior, dar îndeosebi mucoasele bucale şi faringiene ale omului şi animalelor, inclusiv de la unele mamifere marine cum sunt delfinii (11). Frecvent neisseriile apar alături de alţi germeni în mamite, faringite, otite, dermatite, plăgi accidentale, afecţiuni respiratorii (4, 12).

Din numeroasele specii identificate, două au o importanţă deosebită pentru om, care sunt bine cunoscute şi studiate, anume *N. gonorrhoea* (gonococul) şi *N. meningitis* (meningococul), care produc boli foarte bine definite. La animale, deşi au fost izolate şi caracterizate mai multe specii, la puţine s-a putut stabili o relaţie de cauzalitate în producerea unor îmbolnăviri. Relaţia lor cu epiteliul pare a fi tranzitorie şi superficială, întrucât nu induc formarea de anticorpi specifici. Unele specii pot juca un rol în desfăşurarea unor procese patogenetice influenţând evoluţia acestora în cazul relaţiilor complexe dintre microorganisme (5). Din aceste considerente importanţa speciilor de *Neisseria* în participarea la diferite procese patogenetice trebuie reconsiderată (12).

În literatura de specialitate apar tot mai frecvent semnalări ale unor infecţii, mai ales la om, în care aceşti germeni par a fi implicaţi. La animale sunt amintite cheratoconjunctivite la ovine şi caprine (*N. ovis*), rinite şi conjunctivite la câini şi pisici (*N. canis, N. lactamica, N. flavescens, N. sicca, N. animaloris, N. zoodegmatis*), îmbonăviri respiratorii la animale de laborator (*N. cuniculi, N. denitrificans, N. animalis*), plăci dentare la vaci (*N. dentiae*). Mai mult există date care menţionează că *N. canis* este patogenă pentru om, ceea ce aduce în atenţie riscul zoonotic reprezentat de animalele purtătoare, amintind că neisseriile se izolează frecvent din leziuni de muşcătură provocate de câini şi pisici (1, 8, 17). Deasemenea, neisseriile se izolează din unele produse alimentare sau elemente ale mediului ambiant. În consecinţă prezenţa lor trebuie cunoscută, atât pentru a se stabili patogenitatea şi eventuala impicare patogenetică, cât şi pentru diferenţierea de alţi coci (stafilococi, micrococi, levuri), ca şi faţă de unele specii de bacterii Gram negative pigmentogene (*Flavobacterium, Alcaligenes* sau altele), cât şi faţă de bacterii Gram negative ce produc colonii mucoase (*Klebsiella, Acinetobacter*). Din aceste considerente identificarea speciilor comensale este problematică şi se caută găsirea unor teste biochimice cu o înaltă sensibilitate şi specificitate, care să diferenţieze rapid şi sigur, speciile patogene de cele nepatogene (2, 6, 7, 10, 15, 17).

Din cercetările noastre rezultă că neisserile se evidenţiază şi se izolează atât de la animale sănătoase, cât şi de la cele care prezintă diferite afecţiuni, îndeosebi oculoconjunctivale, bucofaringiene, cutanate şi mamare.

Examenul bacterioscopic efectuat pe frotiuri colorate prin metoda Gram, permite identificarea şi încadrarea de gen, în baza caracterelor morfologice şi a afinităţii tinctoriale. Morfologic celulele au aspectul de coci asimetrici, asemănător bobului de cafea, aşezate întotdeauna în grupări diplo (mai rar tetrade), cu părţile aplatizate faţă în faţă, având dimensiuni de 1,0-1,2 µm, mai rar cu dimensiuni mai mici sau mai mari. Tinctorial, precizăm că neisseriile se colorează în roşu (Gram negative), dar au fost şi situaţii când celulele apăreau colorate în nuanţe de violet (Gram pozitive), când se crează confuzii cu stafilococii şi micrococii. Pentru a evita acest lucru, frotiurile trebuie efectuate cât mai subţiri, respectând riguros tehnica de colorare, cunoscând că unele specii sau tulpini pot prezenta un grad de rezistenţă la decolorarea cu alocool-acetonă. Acest aspect se poate datora unor diferenţe în structura peretelui celular, aşa cum s-a evidenţiat între *N. gonorrhoea, N. cinerra* şi *N. menigitidis*.

Examenul bacteriologic permite izolarea neisserilor pe medii de cultură atât lichide cât şi solide. În condiţiile noastre de lucru izolarea s-a realizat în bulion glucozat şi medii solide (agar glucozat, agar cu sânge, mediul Mueller Hinton). Dezvoltarea în cultură are loc în condiţii aerobe, la temperatura de 37°C, într-un interval de 24-72 de ore. Prezintă importanţă aspectul coloniilor (dimensiuni, formă, aspectul de suprafaţă, culoarea), care pot fi bine caracterizate din acest punct de vedere dacă examinarea se face la lupă. Acestea se vor corela cu aspectul morfologic al celulelor în urma efectuării frotiurilor din culturi. Coloniile pigmentate ale unor bacili Gram negativi, se diferenţiază prin efectuarea testului cu KOH. La acest test neisserile dau reacţie negativă, iar bacilii gram negativi dau reacţie pozitivă. De asemenea se diferenţiază şi pe baza aspectului morfologic

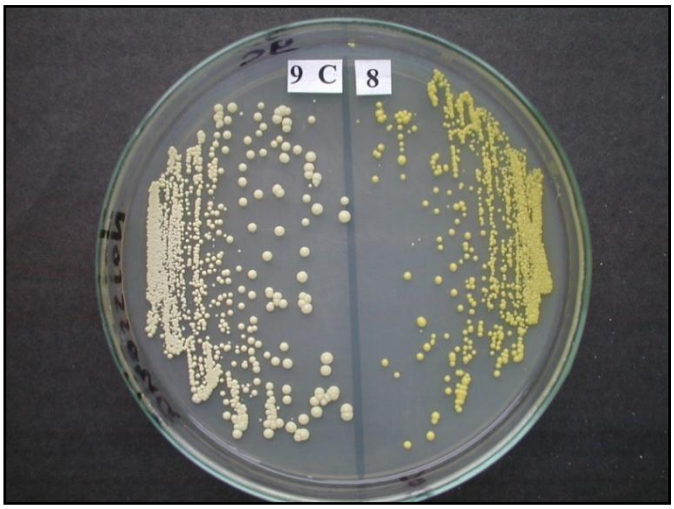
constatat în frotiurile efectuate şi colorate prin metoda Gram. Cele două celule care alcătuiesc gruparea diplo este foarte stabilă şi nu se desprind la manopera obişnuită de peparare a unui frotiu, astfel că morfologia cu aspect de bob de cafea consituie un element definitoriu pentru încadrarea de gen a tulpinilor izolate.

Încadrarea de specie poate fi făcută numai în urma efectuării examenului biochimic. Din testele clasice un rol important îl prezintă testele oxidazei şi catalazei care trebuie să fie pozitive, teste luate în considerare şi în cercetările noastre. La celelalte teste s-a constatat variabilitate. În acest contex se menţionează că identificarea speciilor de *Neisseria* este dificilă din cauză faptului că reacţiile de diferenţiere adesea se suprapun, chiar şi în situaţia folosirii unor kitt-uri de identificare (5, 7). Mai mult între unele specii sunt descrise reacţii încrucişate, cum sunt între *N. catharalis, N. cinera* şi *N. lactamica* (10). Se mai poate lua în considerare faptul că sunt negative la testele: indol, hidrogen sulfurat, urează şi sunt imobile. Aceste caractere se pot evidenţia procedând la efectuarea de însămânţări pe mediile politrope (TSI şi MIU).

CONCLUZII

1. Au fost caracterizate morfologic, cultural şi biochimic un număr de 20 de tulpini din genul *Neisseria*, izolate de animale sănătoase clinic (vaci, iepuri şi cobai) ca şi de la animale cu diferite manifestări clinice (conjunctivite, otite, faringite, mamite, dermatite, plăgi accidentale).
2. Morfologic, neisseriile se caracterizează prin forma de coci asimetrici, cu aspect de bob de cafea, grupate diplo, cu părţile aplatizate faţă în faţă, cu dimensiuni de 1,0-1,2µm, Gram negative sau Gram variabil (unele tulpini sunt rezistente la decolorare), dar cu evidenţierea netă a formei tipice.
3. Cultivarea s-a făcut pe medii lichide şi solide, în condiţii aerobe la temperatura de 37°C, dezvoltarea în cultură având loc în 24-72 de ore. Pentru a observa particularităţile cromatice, forma marginilor şi aspectul de suprafeţă, examinarea trebuie făcută la lupă. Pe mediu cu sânge unele tulpini au produs hemoliză.
4. Diferenţierea faţă de cocii Gram pozitivi şi diverse specii de bacili Gram negativi pigmentaţi în galben sau care produc colonii mucogene opace, se face prin însămânţări pe agar MacConkey şi testul cu KOH.
5. Neisseriile sunt pozitive la testele oxidazei şi catalazei care sunt foarte importante pentru stabilirea apartenenţei de gen. Pentru încadrarea de specie se impune efectuarea altor teste biochimice (însămânţări pe mediile politrope TSI, MIU, şi pe sistemul standardizat API NH (BioMerieux).
6. În urma cercetărilor efectuate au putut fi identificate tulpini ce s-a încadrat în speciile: *N. mucosa, N. lactamica, N. polysacharea, N. canis,* dar s-au izolat şi tulpini ce nu au putut fi tipizate.

Explicaţia figurilor



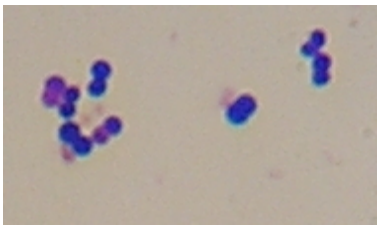


Fig. 1 - Colonii pigmentate pe agar glucoză (imagine de ansamblu)

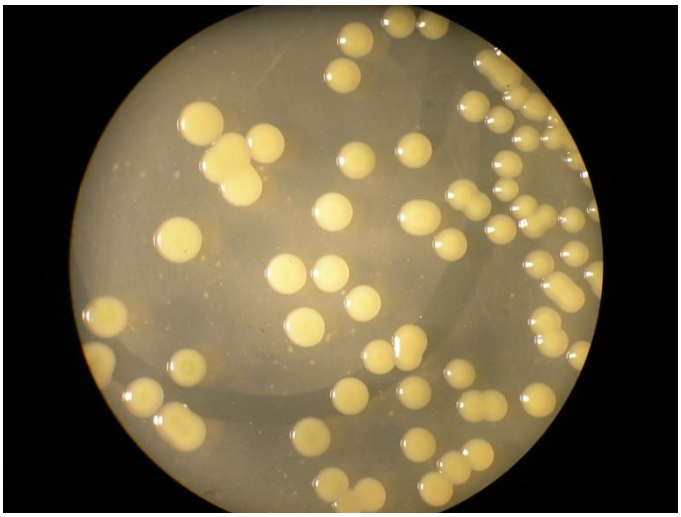


Fig. 2 - Colonii pigmentate netede lucioase (lupă x 1.6)

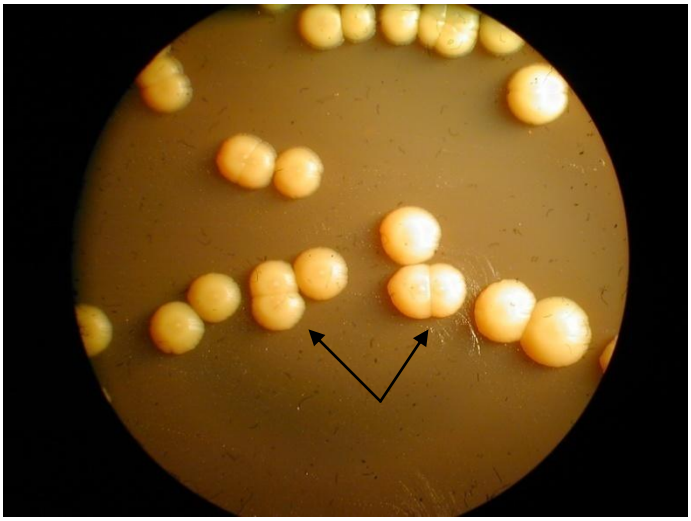


Fig. 4 – Colonii pigmentate pe mediu cu sânge (imagine de ansamblu)

BIBLIOGRAFIE

1. Andersen B. M., Steigerwalt A. G., O'Connor S. P., Hollis D. G., Weyant R. S., Weaver R. E., Brenner D. J., (1993) *Neisseria weaveri* sp. nov., formerly CDC group M-5, a gram negative bacterium associated with dog bite wounds – J. Clin. Microbiol., 31, (9), p. 2456-2466;
2. D'Amato R. F., Eriquez L. A., Tomfohrde K. M., Singerman E., (1978) Rapid Identification of *Neisseria gonorrhoea* and *Neisseria meningitidis* by using enzymatic profiles - J. Clin. Microbiol., 7, (1), p. 77-81;
3. Barrett S. J., Sneath P. H., (1994) A numerical phenothypic taxonomic study of the genus *Neisseria* – Microbiology, 140, p. 2867-2891;
4. Buiuc D., Neguţ M., (2008) Tratat de Microbiologie clinică – Editura Medicală, ediţia 2-a, p. 608-618;
5. Dent V. E., (1982) Identification of oral *Neisseria* species of animals – Journal of Applied Microbiology, 52, (1), p. 21-30;
6. Dewhirst F. E., Chen C. K., Paster B. J., Zambon J. J., (1993) Phylogeny of species in the family *Neisseriacae* isolated from human dental plaque and description of *Kingella oralis* sp. nov. – Int. J. Syst. Bacteriol., 43, (3), p. 490-499;
7. Dillon J. R., Carballo M., Pausé M., (1988) Evaluation of eight methods for identification of pathogenetic *Neisseria* sp.: Neisseria-Kwik, RIM-N, Gonobio-Test, Minitek, Gonochek II, GonoGen, Phadebact Monoclonal GO OMNI Test, and Syva MicroTrak Test – J. Clin. Microbiol., 26, (3), p. 493-497;
8. Guibourdenche M., Lambert T., Riou Y., (1989) Isolation of *Neisseria canis* in mixed culture from a cate bite – J. Clin. Microbiol., 27, (7), p. 1673-1674;
9. Michaux-Charachon Sylvie, Lavigne Jean-Philipe, Anne Le Flèche, Bouziges Nicolle, Sotto A. D., Grimont A. P., (2005) Edndocarditis Due to a New Rod-Shaped Neisseria – J. Clin. Microbiol., 43, (2), 886-889;
10. Moyes A., Chronas G., Young H., (1994) Rapid identification of pathogenetic neisserias using the Identicult-Neisseria test – Letters in Applied Microbiology, 19, (4), p. 232-236;
11. Neylan A. Verdos, Johnson D. G., Warren I. Phillis, (1973) *Neisseria sp.,* isolated from dolphins – Journal of Wildlife Diseases, 9, p. 241-244.
12. Răpuntean Gh., Răpuntean S., (2005) Bacteriologie veterinară specială – Editura Academic Pres, Cluj-Napoca, p. 33-36;
13. Sneath P.H., Barrett S. J., (1996) A new species of *Neisseria* from the dental plaque of the domestic cow, *N. dentiae* sp. nov., - Lett Appl. Microbiol., 23, (5), 355-358;
14. Vandamme P., Holmes B., Bercovir H., Coenye T., (2006) Classification of Centres for Disease Control Group Eugonic Fermenter EF-4a and EF-4b as *Neisseria animaloris* sp. nov., and *Neisseria zoodegmatis* sp. nov., respectively – Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, p. 1801-1805;
15. Veron M., Lenvoise-Furet A., C., Coustere C., Ged C., Grimont F., (1993) Relatedness of three species of "false neisseriae", *N. caviae, N. cuniculi* and *N. ovis,* by DNA-DNA hybridizations and fatty acid analisysis – Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 43, p. 210-220;
16. Zavascki A. P., Fritscher L., Superti S., Dias C., Kroth L., Trasel M. A., Antonello I. C., Saitovitch D., (2006) First case of *Neisseria lactamica* causing cavitary lung disease in a adult organ transplant recipient – J. Clin. Microbiol., 44, (7), p. 2666-2668;
17. *** Identification of *N. gonorrhoea* and Related Species –
18. http://www.cdc.gov/STD/Gonorrhea/lab/ident.htm
19. *** API NH System d'identification des *Neisseria* et *Haemophilus* – Biomerieux, S.A. Franţa – Instrucţinui de folosire.

RESEARCHES REGARDING THE INFLUENCE OF SOME FACTORS, INVOLVED IN THE EMERGENCE OF DOGS AND CATS BACTERIAL STOMATITIS

RÎMBU Cristina, GUGUIANU Eleonora, REBEGEA Cristina, CREŢU Carmen, CARP-CĂRARE C., CARP-CĂRARE M.
FMV Iaşi

Oral cavity health in animals (dogs and cats) reveals the health of their entire organism. The predisposing factors are multiples and, generally, reduce the organism resistence. Researches performed on dogs and cats, try to establish the implications of age, food and saliva pH in the appearance of stomatitis.

From all the consulted animals, 50% dogs and 66% cats diagnosticated with bacterian nature oral affections, were under 3 years old. Anamnesis realized on all the cases reveals the fact that aliments, because of their consistency and nutritive qualities, inadequate to some fundamental criteria of administration (age, size, etc), predispose to the appearance of stomatitis. The predominant food consumption with soft consistency, favorises the appearance of dental affections in 56% of dogs and 66,6% cats. It was observed that from the individuals that eat predominantly dry commercial food, 64% dogs and 60% cats never developed dental plate or taphy. Saliva pH has wad role in oral chemical variations, that appears following ingested food. In dogs and cats stomatitis it was observed that saliva pH was modified toward basic values.

Because of the anatomical position and it's physiological role, oral cavity is exposed to a variety of factors that can act predisposing, occasionally or determinant (*1,5,6*). Any of those can determine oral disfunctions and, in consequence, occur stench, pain, discomfort, digestive troubles with subnutrition and modification of physiological parametres (*4,5*). Those factors can controle oral cavity microbiological state, favouring various microorganism entrance, retention and multiplication (*3*). Ingested food capacity to favour oral microbiota development is influenced by 3 esential factors: composition, consistency and ingestion frequency. Saliva, by it's physiological role, continuously bathes microorganisms fixed on teeth and mucous surfaces and supply growth factors (*1,6*). Saliva pH value is very important from the perspective of oral health also, it's variations favouring selective multiplication of some potential pahogen microorganisms (*2,4*).

MATERIAL AND METHOD

Two animal species were examined, 30 dogs and 15 cats clinical and bacteriological diagnosticated with stomatitis. *For a comparativ study a lot with 10 animals clinical healthy were examined, too*.

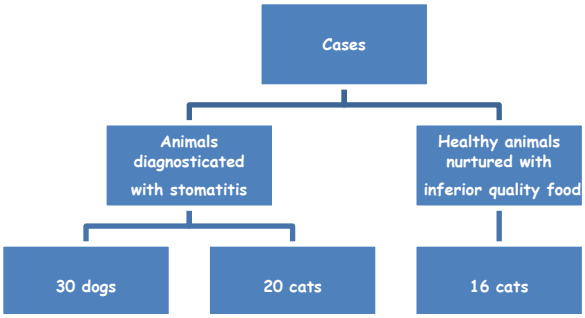
The animals were brought by the owners for a medical check and represented a small a part of privat veterinary clinics cases.

Parallel we try to observe some possibly favouring aspects on a group of 16 coomon breed cats, healthy from clinical point of view, interned in specially arranged spaces. (***Scheme 1***)

Examination of dogs and cats with owners, diagnosticated with stomatitis, was realised during their presentation at the veterinarian „*general observation chart*" being fill up:

- *General datas over the animals*: breed, age, sex, provenience (with or without owner);
- *Anamnetic datas* that include:
  - **Food history,** diet being evaluated from quantitativ and qualitativ point of view. **Quantitativ** evaluation consist in appreciation of ingested food quantity by dogs and cats as well. **Qualitative** evaluation was appreciated on a base *of aliment type*: special prepared food for dogs and cats or/and meals cooked by the owners, *food consistency:* dry, semidry and wet, appreciations regarding *nutritents (from diet) quality*.
  - **Dental hygiene**: dental plate, tophus, dental decays, etc.

Obtained datas regarding diet history represent food 3-6 months before oral lesions appearence.



Scheme 1 Cases schematic representation

Another factor that can be determined, is saliva pH, in dogs, normal values varying between 7 and 8 (weak basic reaction), and in cats between 6 and 7 (weak acid reaction).

To evaluate pH Merk pH indicator paper was used.

Method principle consists in colour changing in a medium pH modification: acid transforms blue paper in red and basic the red one in blue.

Aspects were observed in the 16 healthy cats during 21 days period. Cats were from 1 to 2 years old, with unknown owners, so the anamnesis was incomplete. They were nurtured with special prepared food - croquet, which were used also by the owners whose cats with stomatitis represented the object of our study. In first 3 days of food administration, because of the adaptation stress a small part of the cats refused to eat.

PH evaluation was realised before and after food ingestion.

RESULTS AND DISSCUTIONS

Analyzing registration datas from the general observation charts, synthesized in tables 1 and 2, it was observed that, in both animal species, alimentation, pH, dental troubles can favour the appearance of stomatitis with bacteriological etiology.

Table 1 General observations regarding nutritional and medical aspects of dogs diagnosticated with stomatitis

Crt. No.	Breed	Sex	Age	Animals diet (declared by the owners)					Saliva pH *Normal pH is 7-8*	Dental troubles
				Quantity	Predominant food type					
					Coocked food	Commercial food				
						Box	Dry	Semi-wet		
1	Cocker	F	7 months	N			√		8-9	-
2	Pechinez	F	9 months	N				√	7-8	-
3	Cocker	F	1 year	N			√		8-9	Partial edentition
4	Caniche	M	1,5 years	N	√	√			6-7	-
5	Bichon maltez	M	1,5 years	N		√	√			Tophus
6	Pechinez	M	2 years	N				√	6-7	Tophus
7	Cocker	F	2 years	N			√		8-9	Dental plate
8	Common breed metis	M	2 years	N			√		8-9	-
9	Irish Setter	M	2,3 years	N		√	√		6-7	-
10	Cocker	F	2,5 years	N				√	7-8	Tophus
11	Caniche metis	M	2,5 years	N				√	6-7	Tophus
12	Bichon	F	3 years	N				√	6-7	Tophus
13	Cocker	M	3years	N			√		7-8	Dental plate
14	Pechinez	M	3 years	N	√				7-8	Tophus and dental decays
15	German Shepard	M	3 years	N			√		8-9	Dental plate
16	Mastiff Neapolitan	F	4 years	N			√		8-9	Dental plate
17	Caniche	M	4 years	N	√				7-8	-
18	Cocker	F	4,5 years	N	√				6-7	Tophus
19	Boxer	F	4,7 years	N	√		√		7-8	Tophus
20	German Shepard	M	5 years	N	√		√		7-8	Tophus and dental decays
21	Cocker metis	M	6 years	N	√	√			8-9	Tophus and dental decays
22	Bullmastiff	F	6 years	N			√	√	8-9	-
23	Metis common breed	M	7 years	N	√				6-7	-
24	Caniche	M	7 years	N			√		8-9	Tophus
25	Fox Terrier	F	7 years	N	√				7-8	Dental traumatism
26	Cocker	F	8 years	N	√				7-9	Tophus
27	Bichon maltez	M	8 years	N	√				7-8	Tophus, Partial edentition
28	Cocker	M	9 years	N		√			8-9	Tophus, Partial edentition
29	German Shepard	M	9 years	N	√				8	Tophus and dental decays
30	German Shepard	M	9 years	N			√		8	Tophus and dental decays

Table 2 General observations regarding nutritional and medical aspects of cats diagnosticated with stomatitis

Crt. No.	Breed	Sex	Age	Animals diet (declared by the owners)					Dental pH	Dental troubles
				Quantity	Predominant food type					
					Coocked food	Commercial food				
						Box	Dry	Semi-wet	*Normal pH is 6-7*	
1	Schottish Fold	F	3 months	N				√	6-7	-
2	Common breed	F	6 months	N				√	9-10	Dental traumatism
3	Common breed	F	6 months	N				√	8-9	Dental plate
4	Birmaneza	F	1 year	N			√		8-9	Dental plate
5	Birmaneza	M	1 years	N		√			6-7	-
6	Common breed	F	1,5 years	N	√				8-9	Tophus
7	Burmaneza	F	2 years	N	√		√		7-8	Dental plate
8	Common breed	F	2 years	N			√		6-7	
9	Siameza	M	3 years	N			√		7-8	
10	Birmaneza	M	3 years	N				√	7-8	Tophus
11	Persana	M	4 years	N	√				8-9	Dental traumatism, tophus
12	Persana	F	4 years	N	√				7-8	Tophus
13	Common breed	F	7 years	N			√		8-9	
14	Metis Common breed	F	12 years	N	√				9-10	tophus
15	Common breed	F	17 years	N	√				7-8	tophus

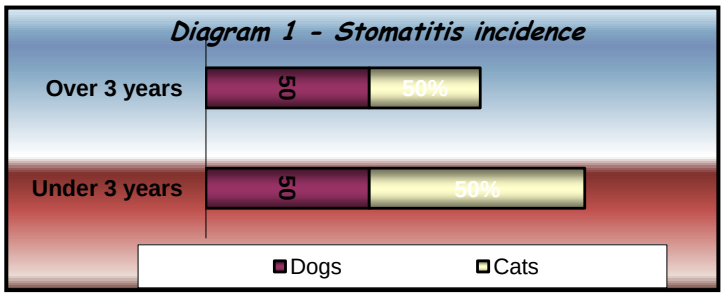
Legend
N-noncorresponding

Although it's recognized the fact that the age (old animals) predisposes in the development of stomatitis, this fact it's not confirmed in the case of examined animals. So, it was observed that 50% of dogs and 66% from cats with orale affections, were under 3 years old. (***Diagram 1***)

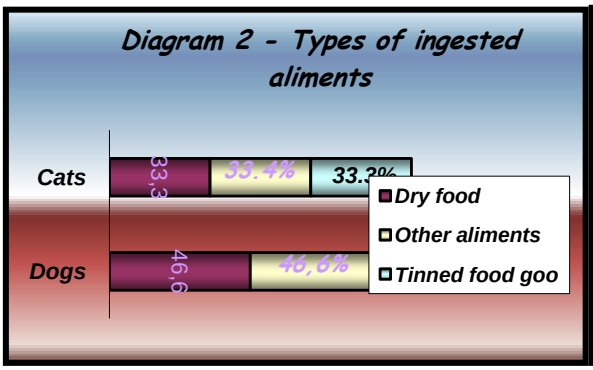
An explanation can be the fact that, administration of dry aliments without respect age category, can easily create microlesions which are able, in the base of decreases immunity, to develop local infections produced by autohton microflora potential pathogen.

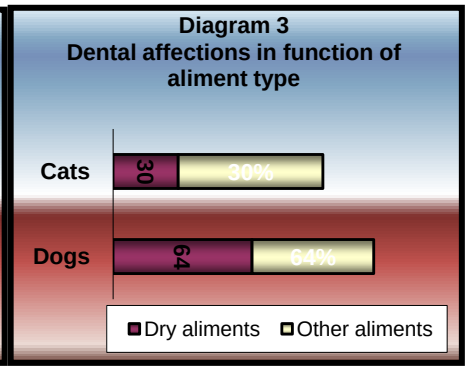
Analysing culinary aspects, can reveal the fact that, in dogs alimentation predominates dry special food (46,6%) and cooked aliments: alimentary scrap or special culinary prepared for dogs (40%). Preserved and semi-wet food is more rarely used (13,4%).

Dry food has an abrasive effect, so 64% of the dogs with stomatitis that ingested dry aliments didn't present dental plate and tophus. In 56,5% of the dogs with stomatitis, others aliment types with softer consistency which attach better on dental surface are responsible for the presence of dental plate, tophus or dental decays.



In cats, dry aliments were administrated only in 5 (33,3%) animals and 3 (60%) of them never developed dental plate and tophus. From the 11 (73,3%) cats which consume cumulate other aliment types, 7(63,6%) presented dental plate or tophus.





Dental plate occurring is a consequence of alimentary scrap deposits on teeth, optimum medium for bacteria multiplication. Dental plate became the support for another microorganisms that favours the appearance of tophus with gingivale paintfull inflammations which, untreated, develops parodontitis, dental decays and, finaly, partial or complete edentations.

Analyzing pH values, big enough variations were observed. So, in dogs, prevailed values that determine saliva alcalinity, between 8 and 9 respectively, and in cats, athough normal saliva pH is weak acid, it looks like in stomatitis, this is much more basic, values reaching till 9-10 on etalon scale.

Observations gathered on the 16 healthy cats, helped in identification of posible modifications from oral mucous surfaces level. Exclusive dry food ingestion (croquet) determined that after 7 days, 2 (12,5%) from the 16 cats, to present a gingival inflammation. After 21 days, 4 (25%) cats were clinical diagnosticated with gingivitis. There weren't registrated special pH variations during investigations. The appearance of local inflammation at the 4 cats could be explained by the fact that, dry food wasn'n in the current alimentation, fast ingestion and abrasive character of this food type developed gingivale mucous surface irritation.

CONCLUSIONS

1. Stomatitis appearence can be influenced by alimentation, saliva pH, dental hygiene and age.
2. From the studied cases 50% dogs and 66% cats were under 3 years old.
3. Because of the abrasive effect of the dry food, 64% dogs and 60% cats with stomatitis, never developed dental plate or tophus.
4. Semi-wet, encased and cooked food, because of the soft consistency, favoured the appearance of dental plate in 56% dogs and 66,6% cats diagnosticated with stomatitis.
5. In dogs, as well as in cats with stomatitis, saliva pH was basic, with increased values (pH 9-10 intense basic) in cats much older than 12 years.

BIBLIOGRAPHY

1. **Buiuc D. And col.** - *Microbiologie orală*, Editura Apollonia, Iaşi, 1999
2. **Carp-Cărare M., Guguianu Eleonora, Timofte Dorina** – *Lucrări practice de microbiologie veterinară*, UŞAMV Iaşi, 1997
3. **Guguianu Eleonora** - *Bacteriologie generală*, Casa de Editura Venus, Iasi, 2002
4. **Harvey C.E.** - *Feline oral pathology, diagnosis and management*. In: Crossley DA and Penman S. (eds) Manual of Small Yearsmal Dentistry, British Small Yearsmal Veterinary Association, Gloucestershire, UK, pp.129, 1990
5. **Solcan Gh., Boghian V., Rollin F.** - *Patologie si clinica medicala veterinara*, Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iasi, 2005
6. **Watson A.D.J.** - *Diet and periodontal disease in dogs and cats*. Australian Vet.Journal, 71, 313-318, 1994

RESEARCHES REGARDING THE MILKING SYSTEM INFLUENCE UPON COW MILK QUALITY

ROTARU Elena[1], MITRĂNESCU Elena[1], TAPALOAGA Dana[1], TUDOR L.[1], FURNARIS F.[1], DINIŢĂ I.[2], IONESCU G.[3]

[1]FMV Bucuresti

[2] DSVSA Calarasi

[3] DSVSA Dolj

The present study aims to assess the milk quality parameters in a diary cow farm placed around Bucharest in comparison with the applied milking systems: automatic bucket system and parlour system.

There were analyzed the following parameters: temperature, acidity, density, antibiotics content, total number of germs and somatic cells count in the two analyzed milking systems.

It may conclude the following:

1. The microbial load of milk (total number of germs - TNG) is significant decreased for the milk obtained in herringbone parlours.

2. The average values of somatic cells recorded a decreasing for the milk obtained by automatic bucket system.

3. The obtained results revealed the bacteriological quality of milk in the unit and proved the herringbone parlours system efficiency.

Key words: milking system, milk, cow

Mulsul mecanic reprezintă o modalitate eficientă de a controla calitatea laptelui şi de a reduce considerabil efortului fizic al fermierului. Unul din motivele pentru care se optează pentru utilizarea unei staţii de muls într-o exploataţie de vaci, alături de numărul mare de animale, este necesitatea obţinerii unui lapte igienic şi cu un număr cât mai mic de celule somatice (ceea ce asigură o incidenţă scăzută a infecţiilor intramamare).

Lucrarea a urmărit şase parametri de calitate a laptelui în raport cu metoda de recoltare a acestuia, respectiv: muls mecanizat la bidon şi muls mecanizat cu instalaţia de tip brăduleţ, cu accent pe numărul total de germeni (NTG) şi numărul de celule somatice (NCS).

MATERIALE ŞI METODE

Studiul a fost realizat pe lapte amestec prelevat de la 350 vaci rasa Holstein din cadrul SC Agroindustriala SA. Protocolul de pregătire a glandei mamare pentru muls a fost acelaşi pentru ambele sisteme de recoltare a laptelui. Acesta a constat în spălare, imersie în soluţie antiseptică, uscare cu ajutorul lavetelor de unică folosinţă şi eliminarea primelor jeturi de lapte (considerate a avea o încărcătură microbiană ridicată). Din probele de lapte prelevate au fost determinaţi următorii parametrii de calitate: temperatură, aciditate, densitate, antibiotice, numărul total de germeni, celulele somatice. Metodele utilizate au fost cele utilizate uzual în laboratoarele de profil din unităţile de producţie şi colectare a laptelui.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Dintre cei şase parametri studiaţi, diferenţe semnificative între cele două modalităţi de recoltare a laptelui (muls mecanizat la bidon şi cu ajutorul instalaţiei tip brăduleţ) s-au înregistrat doar pentru numărul total de germeni şi numărul de celule somatice.

În tabelul 1 sunt prezentate valorile medii ale acestor parametri de calitate pentru laptele recoltat la bidon, iar în figura 1 reprezentarea grafică a acestora.

Tabel nr. 1 Valorile medii ale parametrilor de calitate pentru laptele recoltat la bidon

Parametru lapte	**Valoare medie**	**Valori de referinţă pentru categoria premium**
Temperatură	3,7	4
Aciditate	16	14-17
Densitate	1,0274	1,029
Antibiotice	Absent	absent
Germeni totali: nr./ml	1.000.000	Sub 50000
Celule somatic	550.000	Sub 200000

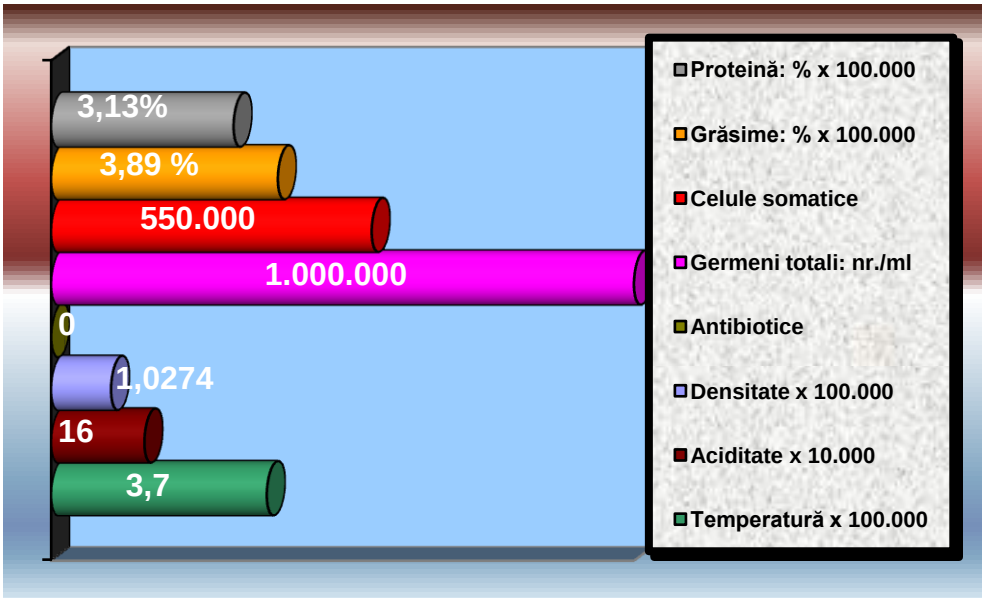


Figura nr. 1. Valorile medii ale parametrilor de calitate a laptelui recoltat la bidon

Analizând datele din tabel se constată că:

- celulele somatice au înregistrat valori crescute, cu o medie de 550000, cu mult peste valorile de referinţă specifice categoriei premium;
- numărul total de germeni prezintă o valoare medie semnificativ crescută, care depăşea de 20 de ori valoarea normală.

Tabelul nr. 2 şi figura nr. 2 ilustrează valorile medii ale parametrilor de calitate pentru laptele recoltat prin muls mecanizat cu instalația tip brăduleț.

Tabel nr.2 Valorile medii lunare şi media generală pentru parametrii de calitate a laptelui obţinut în instalaţia de muls de tip brăduleţ

Valori medii lunare	Tempe-ratura	Aciditate	Densitate	Antibio-tice	NTG	CCS	Grăsime	Proteină
Iul.	3,871	15,194	1,029	Absent	134484	49000	3,715	3,087
Aug.	3,968	15,613	1,029	Absent	293226	49000	3,882	3,319
Sept.	3,967	15,267	1,029	Absent	36600	49000	3,718	3,090
Oct.	4,000	15,581	1,029	Absent	68387	290000	4,108	3,405
Nov.	3,966	14,724	1,029	Absent	17310	290000	4,119	3,402
Dec.	4,000	15,710	1,029	Absent	45935	260000	4,277	3,318
Valori medii generale	**3,962**	**15,348**	**1,029**	**Absent**	**99324**	**164500**	**3,970**	**3,270**

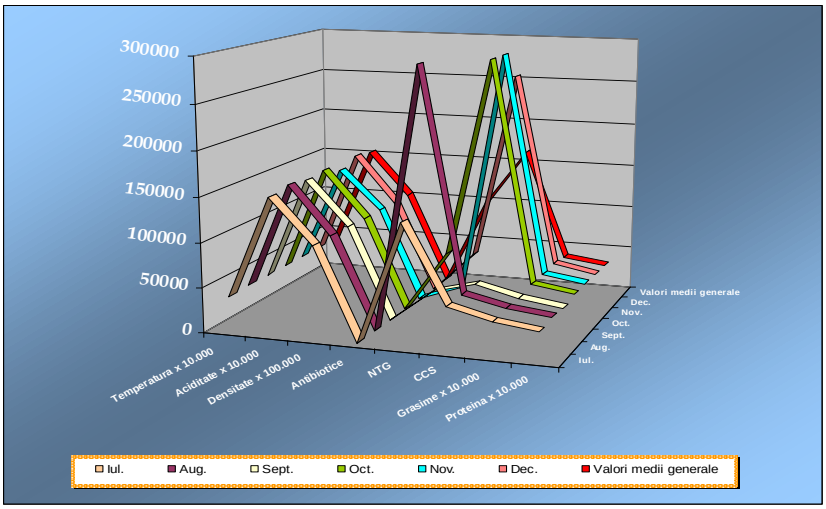


Figura nr. 2. Valorile medii ale parametrilor de calitate a laptelui recoltat cu instalaţie de tip brăduleţ

Analizând datele din tabel se constată că:

- celulele somatice au înregistrat o valoare medie de 164500, ceea ce permite încadrarea laptelui în categoria de calitate premium (sub 200000);
- numărul total de germeni prezintă o valoare medie de 99324.

Variaţia parametrilor de calitate a laptelui muls la bidon comparativ cu cel obţinut în staţia de muls tip brăduleţ este reprezentată în figura nr.3.

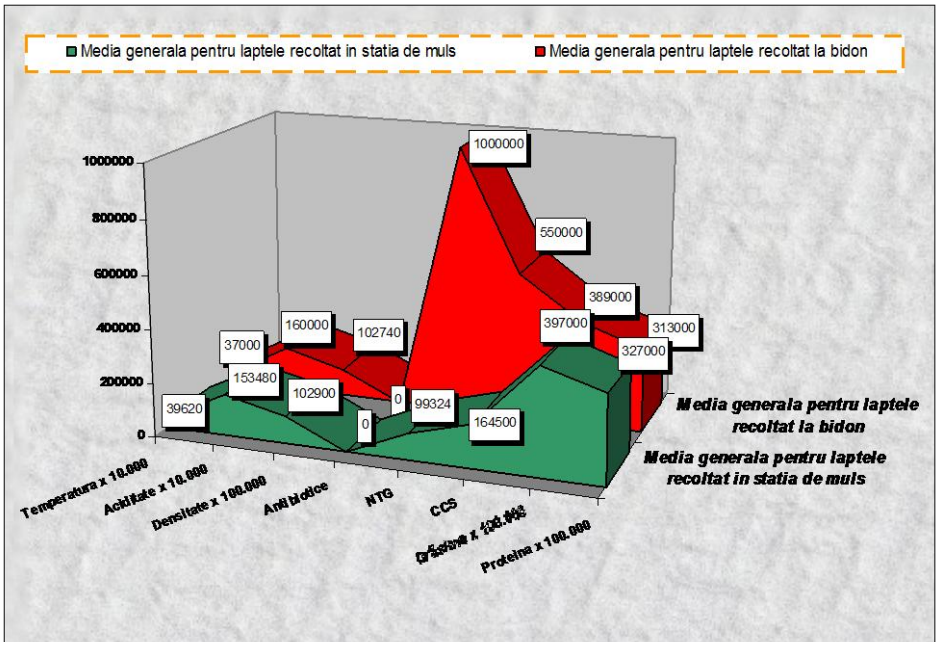


Figura nr. 3. Modificările parametrilor de calitate a laptelui în urma utilizării staţiei de muls, comparativ cu mulsul la bidon în grajd

Se constată o reducere semnificativă a celulelor somatice în funcţie de sistemul de recoltare al laptelui: de la o medie de 550000 în cazul mulsului direct la bidon la 164500 în cazul instalaţiei de muls tip brăduleţ. Numărul total de germeni înregistrează de asemenea o scădere evidentă în cazul utilizării instalaţiei de tip brăduleţ, de la 1000000 la 99324.

CONCLUZII

1. În unitatea luată în studiu se constată o diferenţă semnificativă a calităţii laptelui în funcţie de sistemul de muls mecanizat: la bidon sau cu instalaţie de tip brăduleţ.
2. Celulele somatice prezintă valori diferite în funcţie de sistemul de recoltare a laptelui: de la o medie de 550000 în cazul mulsului direct la bidon, la 164500 în cazul instalaţiei de muls tip brăduleţ.
3. Numărul total de germeni prezintă de asemenea valori medii diferite: de la 1000000 în cazul recoltării laptelui la bidon la 99324 în cazul instalaţiei de tip brăduleţ.
4. Studiul a evidenţiat avantajele privind calitatea laptelui în cazul utilizării instalaţiei de muls mecanic tip brăduleţ.

BIBLIOGRAFIE

1. Bedoulet, J. – Le suvi de troupeau laitier – critere d'alert: quelques examples de mise en practique Bull. Group. Tech. Vet., 2B, 361, 25-31, 1990
2. Brouillet, P. – Longement et environnement de vaches laitiers et qualite du lait Bull. Group. Tech. Vet., 4B, 357, 13-35, 1990
3. Chassagne, M. et al. – Expert assessment study of milking and hygiene practices characterizing very low somatic cell score herds in France, J. Diary. Sci. 88.5 1909-1916, 2005
4. Frederic, M. C. et al. – La machine de traire: fonctionnement, incidence sur le santé des mamelles, Journees nationales des GTV, Tours, France, 369-394, 2002
5. Paape, M. J.; Tucker, H. A. – Somatic cell content variation in fraction-collected milk, J. Diarz Sci., Vol. 49, pp. 265-267, 1966
6. Rotaru, O.; Ognean, L. – Morfologia si fiziologia populatiei celulare din lapte, Ed. Casa Cartii de Stiinta, Cluj, 1998

OBSERVAŢII PRIVIND INCIDENŢA ANEMIEI INFECŢIOASE ECVINE ÎN JUDEŢUL IAŞI

SĂLCEANU Ionela[1], PERIANU T.[2], JELEA Cătălina[1]
[1]DSVSA Iaşi
[2]FMV Iaşi

The epidemiological investigations were made between 2003 – 31.03.2008 in Iassy district – based on statistics and laboratory examinations.

It is observed the existence of positive serological reactions at EIA (the imunnoenzymatic ELISA test confirmed by the Coggns Test) – from 48 in 2003 to 269 cases in 2007.

The high frequency of positive reactions at EIA in Iassy district, can be explained by the inadequate application, with a partial financial suppoting, coherent of the whole stage of sanitation program.

Key words: anemia, equine, incidence, prevalence, serological

Anemia infecţioasă ecvină, denumită în continuare AIE, este o boală specifică solipedelor.

Virusul AIE este un lentivirus, care reprezintă o subfamilie a retroviridelor, incluzând şi virusul Maedi Visna, virusul artritei encefalitei caprine, virusul imunodeficienţei bovine şi virusurile imunodeficienţelor umane. Compararea secvenţelor de acizi nucleici a demonstrat înrudirea acestor virusuri.

Boala se caracterizează prin episoade de febră recurentă, trombocitopenie, anemie, pierderi rapide în greutate şi edeme ale părţilor declive ale corpului; tinde să evolueze ca infecţie inaparentă dacă animalele nu mor ca urmare a acutizării bolii.

Sângele unui cal contaminat cu virusul AIE rămâne infecţios pentru tot restul vieţii. Aceasta înseamnă că animalul este purtător de virus şi poate transmite infecţia şi la alţi cai.

Prezenta lucrare cuprinde o analiză a situaţiei epidemiologice a AIE, în perioada 2003 – 31.03.2008, pe teritoriul judeţului Iaşi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Datele statistice prezentate în lucrare au fost preluate din situaţiile trimestriale şi anuale care se transmit la AUTORITATEA NAŢIONALĂ SANITARĂ VETERINARĂ şi pentru SIGURANŢA ALIMENTELOR şi INSTITUTUL DE DIAGNOSTIC şi SĂNĂTATE ANIMALĂ – BUCUREŞTI.

Interpretarea rezultatelor obţinute s-a făcut în baza analizei incidenţei bolii pe teritoriul judeţului Iaşi în urma diagnosticului de laborator care s-a executat pe probe de sânge, prelevate de la cabaline.

Metodele utilizate au fost:

- testul de imunodifuzie în gel de agar (test Coggins);
- ELISA - competitiv – CELISA
- - cu antigen sintetic – SA – ELISA II.

Boala încă produce pierderi insemnate în efectivele de ecvine, fiind o posibilă şi continuă ameninţare la viaţa oamenilor şi animalelor.

Lucrarea se doreşte a fi un semnal de alarmă pentru practicienii veterinari în vederea menţinerii vigilenţei acestora, ori de câte ori apar noi cazuri de AIE.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabelul nr. 1 şi fig. nr. 1 este prezentată incidenţa AIE pe teritoriul judeţului Iaşi în perioada 2003 – 31.03.2008.

Analiza acestor date arată că pe perioada luată în studiu, incidenţa a crescut de la an la an – astfel: în anul 2003 – 41 de cazuri; 2004 – 116 cazuri; 2005 – 128 cazuri; 2006 – 248 cazuri; 2007 – 269 cazuri.

În ultimii patru ani numărul acestor cazuri de AIE a crescut îngrijorător, ceea ce reclamă în continuare o atenţie sporită privind măsurile pentru combaterea bolii.

Din analiza rezultatelor obţinute pe baza examenului serologic prin ID (testul Coggins) sau ELISA cu confirmare prin ID a ecvideelor în vârstă de peste 6 luni – se observă că ponderea cea mai mare o au cazurile de AIE la armăsari (de la 23 la 160 de cazuri).

De asemenea – se poate spune – că din totalul cazurilor de animale bolnave, pe întreaga perioadă luată în studiu, o parte sunt anemo – pozitive moarte (de la 34 la 58 ecvine moarte) şi o parte anemo – pozitive ucise (de la 83 în 2005 la 399 ecvine ucise din total pozitive în 31.03.2008).

În funcţie de rezultatul examenului de laborator şi al numărului de animale serologic pozitive – în anul 2003, judeţul Iaşi se încadra în zona de risc epidemiologic slab, iar la 31.03.2008 am trecut în zona de risc epidemiologic înalt.

Deci prevalenţa este mai mare de 2% iar numărul de reagenţi pozitivi este > 300 animale şi anume 368 animale anemo - pozitive în stoc faţă de 36 în anul 2003, unde prevalenţa este < de 2%.

Investigaţiile epidemiologice efectuate în perioada menţionată, au evidenţiat că îmbolnăvirile sunt distribuite pe întreg teritoriul judeţului, dar cu o incidenţă crescută la 31.03.2008 în localităţile aflate pe raza CSVZ PAŞCANI (Al. I. Cuza, Lespezi, Ruginoasa, Sireţel, Tătăruşi, Vânători), CSVZ TÂRGU FRUMOS (Ceplenița, Cotnari, Cucuteni, Deleni, Hârlău, Lungani, Scobinţi, Târgu Frumos) şi cu o incidenţă redusă în: Andrieşeni, Belceşti, Bivolari, Cozmeşti, Dagâţa, Grajduri, Miroslava, Plugari, Şipote, Şcheia, Ţibăneşti, Vlădeni, Voineşti şi Horleşti .

Tabel nr. 1 Situaţia efectivelor de ecvine şi evoluţia reacţiilor serologice în AIE în judeţul Iaşi – perioada 2003 – 31.03.2008

SPECIFICARE		2003	2004	2005	2006	2007	01.01–31.03.2008
I. Efectiv ecvine	Total	50137	49361	47582	49412	44319	43842
	Iepe	18682	14205	13662	11676	12287	12468
	Armăsari	1641	1197	1071	1014	899	943
	Asini	-	26	27	33	29	28
II. Efectiv controlat	Total	48608	50978	50101	51468	49561	16407
	Iepe	18649	14185	13645	11654	12271	12453
	Armăsari	1637	1190	1059	995	890	5907
	Asini	-	-	-	-	-	-
III.Ecvine pozitive (diagnosticate în anul curent)	Total	48	116	128	248	269	25
	Iepe	25	52	56	97	109	11
	Armăsari	23	64	72	151	160	14
	Asini	-	-	-	-	-	-
IV. Ecvine moarte (din total pozitive)	Total	34	-	85	235	44	58
	Iepe	22	-	44	149	11	15
	Armăsari	12	-	41	86	33	43
	Asini	-	-	-	-	-	-
V. Ecvine ucise (din total pozitive)	Total	-	-	83	44	396	399
	Iepe	-	-	66	34	195	197
	Armăsari	-	-	17	10	201	202
	Asini	-	-	-	-	-	-
VI. Ecvine pozitive (în stoc)	Total	36	152	119	258	360	368
	Iepe	21	71	85	137	173	175
	Armăsari	15	81	34	121	187	193
	Asini	-	-	-	-	-	-

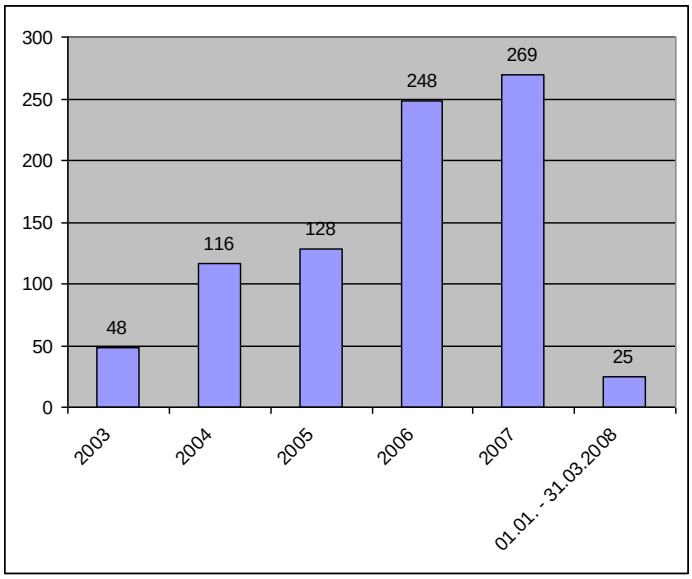


Fig. nr. 1 Incidenţa cazurilor de AIE din perioada 2003 – 31.03.2008

CONCLUZII

Analiza incidenţei AIE pe teritoriul judeţului Iaşi, arată că în perioada luată în studiu, numărul cazurilor de îmbolnăvire a crescut de la an la an (de la 48 în 2003 la 269 cazuri în 2007 cuprinzând 28 de localităţi din 85 CSV - uri).

Prevederilor ordinului MAPAM nr. 686/18.09.2003 privind aprobarea Planului pentru eradicarea accelerată a anemiei infecţioase ecvine pe teritoriul României - vor trebui aplicate cu mai multă responsabilitate şi măsurile de prevenire şi combatere să devină prioritare.

Pentru a împiedica difuzarea AIE din focarul de boală şi reapariţia cazurilor de boală în localităţile indemne trebuie să se respecte şi să se realizeze: identificarea şi înregistrarea tuturor ecvinelor de pe teritoriul judeţului, controlul sever al mişcărilor de ecvine, etc.

BIBLIOGRAFIE

1. Barna, I.; Pârvu, Ghe.; Iuga, Constantin,1995 – Leucozele şi bolile de imunosupresie SIDA/AIDS – LIKE la animale, Editura Ceres, Bucureşti;
2. Perianu, T.,1997 – Bolile infecţioase ale animalelor. Viroze, vol. II, Editura Chemarea – Iaşi;
3. Chelemen, N.; Martin, Pop; Emil Boldizsar; Irina Plămădeală, 2005 – Anemia infecţioasă ecvină, ediţia II; Editura AGRIS – Bucureşti.
4. Ordinul MAPAM nr. 686/18.09.2003 privind aprobarea Planului pentru eradicarea accelerată a anemiei infecţioase ecvine pe teritoriul României.
5. Manualul OIE, ediţia 2004, Cap.2.5.4 – Anemia Infecţioasă Ecvină.

IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA SPECIEI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* DE PE CARCASELE DE BOVINE, OVINE, SUINE ŞI PĂSĂRI

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ON CATTLE, SHEEP, SWINE AND POULTRY CARCASSES

SIBECHE Gabriela[1], CREŢU Carmen[2], RÎMBU Cristina[2], CARP-CĂRARE M.[2]
[1]D.S.V. Botoşani
[2]FMV Iaşi

The researches was conducted in slaughter units for cattle, swine, sheep and poultry.

During 2007-2008 there were prevelated 240 samples, respectively cattle, sheep, swine and poultry carcasses, microbiological examinations being undertaken onto the surface of the carcasses.The purpose of the study was the identification of Clostridium perfringens in the samples.

There were examined 240 samples, each consisting of 100 cm^2 from the surface of cattle, sheep and swine carcasses and of the neck skin and cecal samples in poultry.

The samples in the study were prelevated within the National Strategic Plan as well as in the HACCP Program.

Key words: Clostridium perfringens, cattle, sheep, swine, poultry carcasses

Cele 6 biotipuri ale speciei *Clostridium perfringens* sunt implicate în producerea a numeroase entităţi infecţioase la animale şi om.

Clostridium. perfringens este o bacterie anaerobă, se prezintă sub formă de bacilli Gram-pozitivi, dar se pot întâlni şi bacilli sporulaţi, sporul fiind oval şi aşezat subterminal

Clostridium. perfringens este prezentă în mod obişnuit în sol, furaje, apă şi în intestinul animalelor, dar şi al omului ca parte constitutivă a microbiotei digestive Poate contamina carnea în timpul sacrificării animalelor. Există mai multe tipuri de *Clostridium.perfringens* care produc enterotoxine diferite. Biotipul A este implicat cel mai frecvent în producerea toxiinfecţiei alimentare.printr-o enterotoxină proteică termorezistentă care este parte componentă a sporului şi care este eliberată o dată cu germinarea.

Contaminarea cărnii se face cu spori de *Clostridium perfringens* prezenţi în

intestinul bovinelor, ovinelor, suinelor şi păsărilor.

La ora actuală există o preocupare continuă pentru a se asigură calitatea cărnii atât prin îmbunătăţirea metodelor de control a stării de igienă în abatoare (implementarea HACCP) cât şi prin controlul stării de sănătate a animalelor destinate sacrificării.

Carnea suferă pe parcursul procesării manipulări multiple, contaminarea fiind posibilă pe tot fluxul tehnologic. Sursele microorganismelor contaminante sunt numeroase, cea mai importantă fiind animalele însăşi, care pot purta în masa gastro-intestinală o microfloră bogată şi diversificată, dar şi alte surse.

Prezenţa unor microorganisme în număr mare pe carcase indică lipsa de igienă pe parcursul procesării în timpul prelucrării primare sau o serie de deficienţe legate de transport şi/sau depozitare.

Prezentul studiu îşi propune să evalueze, prin intermediul speciei *Clostridium perfringens* starea de igienă a carcaselor de bovine, ovine porcine şi păsări destinate consumului uman

MATERIAL ŞI METODA

Cercetările au fost efectuate în cadrul unor unităţi de sacrificare a bovinelor porcinelor, ovinelor şi păsărilor.

În perioada 2007-2008 au fost recoltate un număr de 240 probe, respectiv carcase de bovine, ovine, porcine şi carcase de pui broiler, la care au fost efectuate examene microbiologice calitative şi cantiative de pe suprafaţa carcaselor. S-a urmărit prezenţa speciei Clostridium perfringens.

S-au examinat 240 probe, recoltate de pe 100cm^2 la carcasele de bovine, ovine şi porcine, iar în cazul puilor broiler de pe pielea de la gât şi din conţinutul cecal.

Recoltarea probelor s-a făcut cu ajutorul şabloanelor de 100cm^2 sterile din diferite zone ale carcasei respectiv: a pieptului şi partea externă a coapsei la suine şi din regiunea pieptului, şi partea internă a coapsei la bovine şi ovine.

Probele s-au recoltat cu ajutorul unor tampoane de vată sterile umezite cu apă peptonată sterilă, prin ştergerea repetată (timp de 15-30 sec.) a unei suprafețe de aprox. 100 cm^2 din diferite zone ale carcasei.

Tuburile au fost agitate 30 sec. cu ajutorul unui Vortex după care din serul fiziologic peptonat s-au preparat diluții seriate până la 10^{-6}.

Pentru identifiarea speciei Clostridium perfringens a fost utilizat Standardul European EN 13401:1999. Conform acestui standard am transferat cu pipeta sterilă, 1 ml de probă de analizat, respectiv din diluțiile 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} , în câte două cutii Pertri, în centru lor, apoi am turnat 10ml agar TSC (triptoză sulfit cicloserină), menținut la 45^{0}C şi am amestecat bine cu inoculul rotind uşor fiecare cutie.Când mediul s-a solidificat am turnat încă un strat de 10ml din acelaşi agar şi am lasat să se solidifice.Incubarea s-a facut la 37^{0}C / 24h în anaerostat.S-a numărat pe fiecare cutie coloniile negre de tulpini prezumtive de *Clostridium perfringens.*

Confirmarea biochimică s-a facut luând 5 colonii caracteristice din mediul TSC şi trecând pe mediul LS (lactoză – sulfit). S-a însămânțat fiecare colonie selectată în mediu lichid cu tioglicolat, incubarea făcându-se în anaerostat la 37^{0}C pentru 24h. După incubare au fost transferate 5 picături de cultură în eprubete cu tubuleț Durham şi mediul LS. Citirea s-a facut după alte 24h, eprubetele care au prezentat producție de gaz în mai puțin ¼ din înălțime şi a fost prezentă culoarea neagră le-am considerat pozitive.

Numărarea coloniilor de Clostridium perfringens s-a făcut calculând fiecare cutie şi utilizând următoarea ecuație: $N=\sum a/(n_1+0,1n_2)d$ [în care $\sum a$ reprezintă $\sum$ coloniilor de Clostridium perfringens numărate din 2 diluții successive; $n_1$este numărul de cutii Petri reținute la prima diluție; $n_2$este numărul de cutii Petri reținute la a doua diluție; d este factorul de diluție corespunzător al primei diluții reținute.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prezența speciei *Clostridium perfringens* pe carcasele de bovine, ovine, porcine şi păsări poate fi în anumite condiții periculoasă pentru consumator. Evaluarea microflorei cărnii, calitativ şi cantitativ, precum şi identificarea etapelor fluxului tehnologic care prin specificul acestora pot contribui la modificarea acesteia este importantă în stabilirea măsurilor preventive şi corective prin intermediul cărora evoluția microflorei poate fi controlată.

Clostridium perfringens se găseşte frecvent în intestinul omului şi animalelor, unii specialişti considerând-o ca o bacterie care face parte din microflora intestinală normală, din această cauză este considerată şi indicator sanitar microbiologic.

În literatura de specialitate prezența speciei *Clostridium perfringens* în carnea animalelor de măcelărie şi în aceea a păsărilor se aproximează la 50%. După cum se ştie aceste animale sunt aproape în totalitate purtătoare intestinale. În perioada stresului de abator sau când timpul între tăiere şi eviscerare se prelungeşte, o parte din bacteriile intestinale printre care şi *Clostridium perfringens* pot ajunge pe carcasele animalelor.

Bărzoi D. în 1985 a stabilit că, chiar în cazurile respectării stricte a igienei în timpul tăierii, carnea poate fi contaminată cu un număr mic de spori de Clostridium perfringens de la 1 spor până la 10. De aceea, după obținere, carcasele trebuie aduse în 7-9 ore la temperatura de refrigerare, pentru a stopa germinarea şi multiplicarea sporilor.

Studiul efectuat asupra carcaselor de bovine a furnizat prezența speciei *Clostridium perfingens* la eviscerare cu o medie de 10,8%, iar la spălare o medie de 5,8%.(Tabelul nr.1.)

În cazul carcaselor de ovine media prezenței speciei *Clostridium perfringens* la eviscerare a fost de 8,3%, iar la spălare de 2,4%.(Tabelul nr.2.)

Tabel nr. 1 Valorile speciei Cl.perfringens /100cm^2 pe diferite regiuni ale carcaselor de bovine

Etapa tehnologică	Regiunea carcasei	Nr. probe	Probe pozitive		Probe negative		Media*
			Nr.	%	Nr.	%	
Eviscerare	Reg. pieptului	60	5	8,3	55	91,6	0,69
	Partea internă a coapsei	60	8	13,3	52	86,6	0,90
Spălare	Reg. pieptului	60	3	5	57	94,9	0,47
	Partea internă a coapsei	60	4	6,6	56	93,3	0,60

* $\log_{10}$ UFC/cm^2

Tabel nr. 2 Valorile speciei Cl.perfringens /100cm^2 pe diferite regiuni ale carcaselor de ovine

Etapa tehnologică	Regiunea carcasei	Nr. probe	Probe pozitive		Probe negative		Media*
			Nr.	%	Nr.	%	
Eviscerare	Reg. pieptului	60	4	6,6	56	93,6	0,60
	Partea internă a coapsei	60	6	10	54	89,9	0,77
Spălare	Reg. pieptului	60	1	1,6	59	98,3	0
	Partea internă a coapsei	60	2	3,3	58	96,6	0,30

* $\log_{10}$ UFC/cm^2

Clostridium perfringens pe carcasele de porc s-a situat la eviscerare la o medie de 14,9%, iar la spălare la o medie de 4,9%. (Tabelul nr.3.)

Tabel nr. 3 Valorile speciei Cl.perfringens /100cm^2 pe diferite regiuni ale carcaselor de porcine

Etapa tehnologică	Regiunea carcasei	Nr. probe	Probe pozitive		Probe negative		Media*
			Nr.	%	Nr.	%	
Eviscerare	Reg. pieptului	60	7	11,6	53	88,3	0,84
	Partea internă a coapsei	60	11	18,3	49	81,6	1,04
Spălare	Reg. pieptului	60	2	3,3	58	96,6	0,30
	Partea internă a coapsei	60	4	6,6	56	93,6	0,60

* $\log_{10}$ UFC/cm^2

Smart J.L. şi col în 1999 utilizând aceeaşi metodă de recoltare/100 cm2 cu şablonul steril a demonstrat prezenţa speciei *Clostridium perfringens* în regiunea anusului la carcasele de vită în raport de 29% (din 100 probe examinate – 29 au fost pozitive), la carcasele de porc 66% (din 100 examinate - 66 au fost pozitive) şi la carcasele de oaie un procent de 85%.

Comparativ cu literatura de specialitate din ţara noastră rezultatele obţinute au fost asemănătoare cu cele făcute în alte studii pe carcasele animalelor de măcelărie.

În 2003 în ţara noastră prezenţa speciei *Clostridium perfringens* se menţinea la un raport < de 3% la carcasele de bovine şi porcine.

Prezenţa speciei *Clostridium perfringens* în conţinutul cecal la puii broiler examinaţi a fost de 31,6% , pe carcasele de pasăre la eviscerare raportul a fost de 8,3%, iar la spălare a scăzut până la 3,3%.(Tabelul nr.4.)

Tabel nr. 4 Valorile speciei Cl.perfringens din conţinutul cecal şi de pe carcasele de pasăre

Etapa tehnologică	Regiunea carcasei	Nr. probe	Probe pozitive		Probe negative		Media*
			Nr.	%	Nr.	%	
Eviscerare	Pielea de la gât	60	5	8,3	55	91,6	0,69
	Conţinut cecal	60	18	31,6	42	68,3	1,25
Spălare	Pielea de la gât	60	2	3,3	58	96,6	0,30

* $\log_{10}$ UFC/cm^2

În România studiile făcute de Carp Cărare M. în 2003 arată un procentaj scăzut de până la 1,28%, a speciei *Clostridium perfringens* pe carcasele de pasăre.

Concluzii

1. Studiul a relevat că din punct de vedere microbiologic etapa care contribuie cel mai mult la contaminarea carcaselor în abator este eviscerarea, etapă care necesită o atenție deosebită pentru a reduce gradul de contaminare a carcaselor în abatoare.
2. Dintre regiunile corporale analizate, atăt regiunea pieptului cât şi cea a internă şi externă a coapselor, furnizează cel mai des rezultate pozitive la parametrii examinați.
3. Refrigerarea carcaselor într-un timp cât mai scurt de la obținere poate preveni dezvoltarea şi multiplicarea pe carcase.
4. Stabilirea unor măsuri, pornind de la instruirea permanentă a personalului din abatoare privind punctele critice, aplicarea unor tehnologii performante şi întreținerea în stare bună de igienă şi de funcționare a instalațiilor şi a spațiilor sunt absolut necesare pentru reducerea contaminării carcasei şi îmbunătățirea calității microbiologice a cărnii.

BIBLIOGRAFIE

1. 1.Bărzoi D. (1985) – Microbiologia produselor alimentare de origine animală. Ed. Ceres, Bucureşti.
2. Bărzoi, D., Apostu, S. (2002) Microbiologia produselor alimentare Ed. Risoprint, Cluj-Napoca,.
3. Carp Cărare M. şi col.(2003) - Cercetări privind incidenţa *Clostridiilor sulfito-reducătoare* şi a speciei *Clostridium perfringens* în carne , Laborator de biosecuritate alimentară, Iaşi
4. Craven S.E., Stern N. J. , Bailey J.S., Cox N.A.,(2001) – Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during productic and processing, Avian diseases, vol. 45.
5. Immerseel F.V., De Buck J., Pasmans F.,(2004) - *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health, Avian Pathology , vol. 33,
6. Labbe R.G., (2000), - *Clostridium perfringens*, The Microbiological safety and Quality of Food, vol.II, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
7. Rhodehamel E. J. , Harmon S.,(1998) - Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, *Clostridium perfringens,* Chapter 16
8. Smart J. L, Robert T. A., Stringe M. F. (1999) – The incidence and serotypes of *Clostridium perfringens* on beef, pork and lamb carcasses, Meat Research Institute, England
9. Trakulchang S P., Kraft A. A.(1996) –Survival of *Clostridium perfringens* in refrigerates and frozen meat and poultry items, Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, Anaheim, June 6–9.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ON RAW MILK AND PROCESSING MILK DESTINED TO HUMAN CONSUMED

SIBECHE Gabriela[1], CIOBANU G.[2], CREŢU Carmen[3], RÎMBU Cristina[3], CARP-CĂRARE M.[3]

[1]DSVSA. Botoşani
[2]DSVSA Iaşi
[3]FMV Iaşi

Researches were initiated in a dairy farm and process unit of milk.

During 2007-2008 there were prevelated 120 samples, respectively raw milk and pasteurized milk destined to human consumed, in which microbiological exams quantitatives and qualitatives.

The purpose of the study was the identification of Clostridium perfringens in the samples.

It is also a good medium for the growth of microorganisms. It is therefore importantto know the types of microorganisms present in milk, their control and use for beneficial purposes.

Key words: Clostridium perfringens, raw milk , pasteurized milk.

Speciile bacteriene aparţinând genului *Clostridium* sunt larg răspândite în natură şi contaminează frecvent diferite sortimente de produse alimentare, care deseori sunt incriminate în episoade de toxiinfecţii alimentare la om. În acest context este pe deplin justificată atenţia deosebită acordată de specialişti pe de o parte pentru supravegherea proceselor tehnologice, a echipamentelor şi personalului muncitor care lucrează în industria laptelui.

La ieşirea din mamelă se obţine greu un lapte steril. Aproape întotdeauna există în mamelă germeni banali care contaminează laptele în timpul mulsului. Există animale cu mamela perfect sănătoasă, care totuşi au deschiderile largi şi permanente ale mamelelor, sfincterele acestora fiind relaxate tot timpul.

Speciile din genul *Clostridium* fiind microorganisme telurice, ajung în lapte în timpul mulgerii şi manipulării odată cu praful atmosferic, murdăria de pe corpul animalelor, sau prin contactul cu vasele de muls, cu mâinile operatorilor sau cu diferite ustensile neigienizate.Clostridiile se întâlnesc în lapte în tot cursul anului, dar sunt mai frecvente şi mai numeroase în cel provenit de la animalele în stabulaţie.

În lapte *Clostridium perfringens* formează peste 90% dintre clostriidiile sulfito-reducătoare şi indică o contaminare veche.

MATERIAL ŞI METODA

Cercetările au fost efectuate în cadrul unor ferme de vaci pentru lapte şi a unei unităţi de procesare a laptelui.În perioada 2007-2008 au fost recoltate un număr de 120 probe, respectiv probe de lapte de la vaci sănătoase, vaci cu mamită şi lapte pasteurizat, la care au fost efectuate examene microbiologice calitative şi cantiative. S-a urmărit prezenţa speciei Clostridium perfringens.

S-au examinat 120 probe, recoltate prin muls de la vacile cu glanda mamară sănătoasă şi de la cele cu mamită, şi probe de lapte pasteurizat şi ambalat.

Recoltarea probelor s-a făcut în recipiente sterile, de la vacile din fermă şi pentru laptele pasteurizat s-a luat laptele ambalat în pungi de 1 l, apoi din fiecare probă am trecut câte 10 ml lapte în tuburi.

Tuburile au fost agitate 30 sec. cu ajutorul unui Vortex după care din lapte s-au preparat diluţii seriate până la 10^{-6}.

Pentru identifiarea speciei Clostridium perfringens a fost utilizat Standardul European EN 13401:1999. Conform acestui standard am transferat cu pipeta sterilă, 1 ml de probă de analizat, respectiv din diluţiile 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} , în câte două cutii Pertri, în centru lor, apoi am turnat 10ml agar TSC (triptoză sulfit cicloserină), menţinut la 45^{0}C şi am amestecat bine cu inoculul rotind uşor fiecare cutie.Când mediul s-a solidificat am turnat încă un strat de 10ml din acelaşi agar şi am lasat să se solidifice.Incubarea s-a facut la 37^{0}C / 24h în anaerostat.S-a numărat pe fiecare cutie coloniile negre de tulpini prezumtive de *Clostridium perfringens.*

Confirmarea biochimică s-a facut luând 5 colonii caracteristice din mediul TSC şi trecând pe mediul LS (lactoză – sulfit). S-a însămânţat fiecare colonie selectată în mediu lichid cu tioglicolat, incubarea făcându-se în anaerostat la 37^0C pentru 24h. După incubare au fost transferate 5 picături de cultură în eprubete cu tubuleţ Durham şi mediul LS. Citirea s-a facut după alte 24h, eprubetele care au prezentat producţie de gaz în mai puţin ¼ din înălţime şi a fost prezentă culoarea neagră le-am considerat pozitive.

Numărarea coloniilor de *Clostridium perfringens* s-a făcut calculând fiecare cutie şi utilizând următoarea ecuaţie: $N=\sum a/(n_1+0,1n_2)d$ [în care ∑a reprezintă ∑ coloniilor de Clostridium perfringens numărate din 2 diluţii successive; $n_1$este numărul de cutii Petri reţinute la prima diluţie; $n_2$este numărul de cutii Petri reţinute la a doua diluţie; d este factorul de diluţie corespunzător al primei diluţii reţinute.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Sporii de *Clostridium perfringens* pot rezista foarte mult timp în sol, praf şi sunt frecvenţi în adăposturile animalelor şi în lăptării.

Bărzoi D. şi col. în 2002 în urma cercetărilor efectuate constată că aproximativ 16- 18 % din probele de lapte pasteurizat sunt contaminate cu *Clostridium perfringens.* În anumite condiţii se poate înmulţi în laptele contaminat şi provoacă gastro-enterite.

Laptele pasteurizat nu mai posedă capacitatea bactericidă şi bacteriostatică, deoarece în timpul tratamentului termic substanţele responsabile de această activitate sunt inactivate. De aici rezultă şi faptul că laptele pasteurizat este un mediu mai bun de dezvoltare pentru microbi decât laptele crud.

Laptele care provine de la animale cu diferite infecţii mamare, de la animalele exploatate în condiţii nesatisfăcătoare de igienă sau mulse în condiţii neigienice, conţine chiar din momentul mulgerii un număr mare de clostridii.

Pentru studiul efectuat asupra prezenţei speciei *Clostridium perfringens* în laptele crud am efectuat examenele microbiologice pe 2 loturi de vaci a câte 40 de capete. Primul lot a fost reprezentat de vaci cu glanda mamară sănătoasă şi exploatate în condiţii igienice, iar cel de al doilea lot a fost format din vaci cu mamită.

Examenul probelor de lapte a relevat un nivel de contaminare ridicat de 62,5% la vacile cu glanda mamară sănătoasă cât şi la cele cu mamită de 70%.(Tabelul nr. 1)

Rîmbu C. şi col în 2005 în urma examinării făcute pentru determinarea speciei *Clostridium perfringens* pe probe de lapte provenite de la vaci cu mamite a stabilit o incidenţă de 72,7%.

Tabel nr. 1 Valorile speciei Cl.perfringens la laptele crud provenit de la vaci sănătoase şi de la cele cu mamită

	Nr. probe	Probe pozitive		Probe negative		Media*
		Nr.	%	Nr.	%	
Lot 1 Lapte crud de la vaci cu glanda mamară sănătoasă	40	25	62,5%	15	37,5%	1,07
Lot 2 Lapte crud de la vaci cu mamită	40	28	70%	12	30%	1,20

* $\log_{10}$ UFC/cm^2

În privinţa laptelui pasteurizat destinat consumului uman examenele efectuate pentru identificarea speciei *Clostridium perfrigens* au arătat un nivel destul de scăzut de contaminare. Din totalul probelor examinate doar 7,5% au fost pozitive, ceea ce demonstrează că pasteurizarea fost făcută corespunzător, chiar dacă au fost găsite bacterii sporogene.(Tabelul nr. 2)

Tabel nr. 2 Valorile speciei Cl.perfringens la laptele pasteurizat destinat consumului uman

	Nr. probe	Probe pozitive		Probe negative		Media*
		Nr.	%	Nr.	%	
Lapte pasteurizat	40	3	7,5%	37	92,5%	0,47

* $\log_{10}$ UFC/cm^2

Datorită compoziţiei sale chimice şi a reacţiei aproape neutre laptele constituie un mediu de cultură pentru o parte din microorganismele existente în lapte.

CONCLUZII

1. Laptele crud este contaminat într-o proporţie foarte mare din două surse: mamela şi mediul extern în care se obţine.
2. Se poate spune că Clostridium perfringens este prezent în laptele proaspăt în special în timpul recoltării şi în unele afecţiuni ale glandei mamare (mamite).
3. Marea majoritate a bacteriilor prezente în laptele de consum imediat după pasteurizare sunt reprezentate de bacili sporogeni.
4. Pentru a evita înmulţirea speciei *Clostridium perfringens* în laptele pasteurizat este necesar ca acesta să se păstreze la temperaturi mai mici de 15^0C.

BIBLIOGRAFIE

1. Bărzoi, D., Apostu, S. (2002) Microbiologia produselor alimentare Ed. Risoprint, Cluj-Napoca,.
2. Carp-Cărare M. (2000) - Microbiologie veterinară. Voi. 1, 2. Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
3. California Department of Food and Agriculture. (2005). Milk and Dairy Food Safety: California Milk Standards.
4. Labbe R.G., (2000), - *Clostridium perfringens*, The Microbiological safety and Quality of Food, vol.II, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
5. Mitsostergios K.T., Skiadas C.H. (1994) - Attitudes and Perceptions of Fresh Pasteurized Milk Consumers: A Qualitative and Quantitative Survey British Food Journal, Vol. 96 No. 7, , pp. 4-10
6. Rîmbu Cristina, Guguianu Eleonora, (2005) – Diagnosticul etiologic în mamita sublinică a vacilor într-un efectiv din rasa Holstein, Lucrări ştiinţifice, U.S.A.M.V. Iaşi, voi. 49
7. Rhodehamel E. J. , Harmon S.,(1998) - Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, *Clostridium perfringens,* Chapter 16
8. Şindilar E., Chidon A. D., Nacu Cerasela, Şindilar E.V., Bondoc I. (2001) - Observaţii privind unele aspecte bacteriologice ale laptelui materie primă şi de consum provenit din unităţi de industrializare a laptelui. Lucrări ştiinţifice, U.S

CERCETĂRI PRIVIND HRĂNIREA BROILERILOR DE GĂINĂ CU NUŢREŢURI COMBINATE FĂRĂ BIOSTIMULATORI ŞI EXPERIMENTAREA UNOR DENSITĂŢI DIFERITE LA POPULARE

RESEARCHES CONCERNING THE CHICKEN BROILERS FEEDING WITHOUT THE USAGE OF BIO-GROWTH PROMOTERS AND THE EXPERIMENTATION OF SEVERAL BROODING DENSITIES

SIMEANU D., GAVRILAŞ Angela
USAMV Iaşi
danielsimeanu@yahoo.com

The experiment was carried out on a number of 46,000 broiler which were separated in four groups: a control group (CG) consisting of 12,150 chickens, and three experimental groups (EG1 ÷ EG3), of which EG1 had 12,150 chickens, EG2 had 12,960 chickens and EG3 had 11,340 chickens. The stocking density in the housing unit varied from 15 birds per m^2 for CG and EG1, to 16 birds per m^2 for EG2 and 14 birds per m^2 for EG3.

The combined feedstock administered to the studied birds was isoenergetic and isoproteic and their nourishing properties were very close to the standards and recommendations of "Ross Breeders". The feedstock of the broilers in the control group contained fodder additives (probiotics and enzymes), while the feedstock given to the broilers in the experimental groups did not contain such additives.

Administering combined feedstock without fodder additives to the studied broilers in the experimental groups proved to be inappropriate. Furthermore, increasing the housing density from 14 birds per m^2 to 16 birds per m^2 was not beneficial in terms of the broilers' growth, development and feed consumption because the broilers in EG2 obtained the worst results for all parameters that were analysed.

Key words: broiler, density, combined feedstock

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out at AVIS 3000 S.A., in Mintia, Hunedoara county on a number of 48,600 one-day-old broilers belonging to the "Ross-308" commercial hybrid. They were divided into four groups, as follows: a control group (CG) consisting of 12,150 broilers, and three experimental groups (EG1 ÷ EG3), of which EG1 had 12,150 broilers, EG2 had 12,960 broilers and EG3 had 11,340 broilers.

The stocking density in the housing unit varied from 15 birds per m^2 for CG and EG1, to 16 birds per m^2 for EG2 and 14 birds per m^2 for EG3.

Due to the fact that some of the studied parameters could not be determined for such a big number of birds, as was the case for the dynamics of weight-gain, several control groups were formed, one for each experimental group (control group 1, control group 2, control group 3 and control group 4), each comprising 200 birds. All the broilers in the control groups were individualised. The marked broilers which died during the experiment were replaced with others from the housing unit, with around the same body weight as the group average.

The broilers were kept on permanent litter until they reached the age of 42 days, when they were directed to the slaughterhouse.

The units housing the broilers belonging to the experimental groups were equipped with Big Dutchman kits.

The organisation of the experiment is shown in *Table 1*.

Table 1. Experiment organisational plan

Experimental group	CG	EG1	EG2	EG3
Number of one day old broilers	12,150	12,150	12,960	11,340
Control group	No.1	No.2	No.3	No.4
Number of broilers per control group	200	200	200	200
Broilers growth time	0 – 42 days			
Characteristics of the administered combined feedstock	Combined feedstock with fodder additives	Combined feedstock without fodder additives	Combined feedstock without fodder additives	Combined feedstock without fodder additives
Housing density (birds/m^2)	15	15	16	14
Studied parameters				
Dynamics of weight gain for studied broilers				
Feed consumption				
Deaths and their causes				
The European efficiency factor.				

The recipes of the combined feedstock administered to the experimental broilers were isoenergetic and isoproteic and their nourishing properties were very close to the standards and recommendations of "Ross Breeders", a company from Great Britain, targeting the "Ross-308" commercial broiler hybrid (*Table 2*).

Table 2. The studied combined feedstock

Raw materials (%)	Starting point		Growth period		Finish point	
	CG	EG1 EG2 EG3	CG	EG1 EG2 EG3	CG	EG1 EG2 EG3
Corn	46.46	37.89	40.21	37.19	41.46	39.48
Soy grits	39.81	53.83	26.10	9.12	12.02	0.43
Full fat soy	-	-	18.36	38.74	24.78	38.52
Corn gluten	3.00	3.00	6.00	6.00	8.00	8.00
Barley	-	-	5.00	5.00	10.00	10.00
Fish flour	7.00	-	-	-	-	-
Soy oil	-	0.54	-	-	-	-
Monocalcium phosphate	0.90	1.67	1.22	1.05	0.98	0.86
Calcium carbonate	1.35	1.57	1.43	1.52	1.45	1.51
Premix	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Rhodiment - methionine	0.20	0.24	0.20	0.20	0.10	0.10
ADM L-Lysine-HCl	0.10	0.10	0.15	0.21	0.11	0.16
Salt	-	0.20	0.15	0.15	0.09	0.09
Coline	0.12	0.12	0.10	0.10	0.08	0.08
BioPlus 2B	0.10	-	0.10	-	-	-
Sodium bicarbonate	0.11	0.24	0.23	0.22	0.28	0.27
AVATEC (lasalocid sodium)	0.10	-	0.10	-	-	-
KEMZYME MS dry	0.05	-	0.05	-	0.05	-
MYCOSORB	0.10	-	0.10	-	0.10	-
ADM L-Threonine	0.10	0.10	-	-	-	-
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Nourishing properties						
EM kcal/kg	3071	3010	3175	3175	3225	3225
PB %	24.50	24.50	22.50	22.50	21.00	21.00
GB %	6.59	7.49	7.87	9.69	7.84	9.08
CB %	4.09	4.80	4.33	4.12	4.09	3.96
Ca %	1.05	1.05	0.90	0.90	0.85	0.85
Available P %	0.50	0.50	0.45	0.45	0.42	0.42
Na %	0.17	0.17	0.16	0.16	0.16	0.16
Cl %	0.20	0.20	0.22	0.22	0.22	0.22
Lisine %	1.50	1.45	1.28	1.33	1.10	1.14
Methionine-Cystine %	1.09	1.09	1.05	1.01	0.95	0.93
Threonine %	1.12	1.11	0.96	0.95	0.93	0.91
Tryptophane %	0.27	0.28	0.24	0.24	0.21	0.21

RESULTS AND DISCUSSION

The dynamics of weight gain

Determining the body weight of the broilers participating in the experiment was performed weekly by individual weighing of the whole group of marked birds.

At the starting point of the experiment, very similar values were recorded in terms of the average broiler body weight for each experimental group, ranging between 40.52±0.49 g for the EG3 and 40.71±0.34 g for the CG.

The homogeneity of all of the experimental groups was very good, having % values of less than 10%.

The variance analysis showed that at this age there were no statistically significant differences among the groups involved.

At the second weighing, when the broilers were one week old, for EG2 and EG3 there were recorded values higher with 1.91÷2.02% than for the CG, while for EG1 the weight of the broilers was with 0.38% lower than its corresponding control group.

The analysed groups had a medium homogeneity, as the variance coefficient was higher than 10%.

The Fisher test calculations did not show statistically significant differences among the experimental groups.

At this age of the broilers, the different housing densities applied for the experimental housing units did not significantly influence the development of the studied chickens. Similarly, administering combined feedstock without fodder additives did not generate statistically significant differences among the experimental groups.

At the age of 14 days, it was noted that the differences among the groups deepened. Thus, for the control group an average weight of 414.91 g was recorded, while for the experimental groups the values with 1.39÷4.16 % higher than the control group.

Taking into account the value of the variance coefficient, an average homogeneity (V%=11.08-12.71) was noted for the four experimental groups.

There were recorded statistically significant differences among the groups.

The best results were recorded for EG3, for which combined feedstock without fodder additives was used and which had the lowest housing density – 14 birds per m^2.

At the fourth weighing corresponding to the age of 21 days, weight differences among the experimental groups were also recorded. Thus, for the experimental groups (EG1÷EG3) the average body weights recorded were with 0.13÷5.22 % higher than the constant value recorded for the control groups – 804.35 g.

The homogeneity of the groups was medium (V% = 15.81-19.18).

Significant differences were recorded between EG3 and CG and EG2, while for the other groups there no statistical differences were registered.

At the age of 28 days (fifth weighing), the control group (CG) reached an average body weight of 1311.24±13.27 g, which was with 0.14÷0.96% lower than the values corresponding to the experimental groups.

In this case as well, the homogeneity of the groups was medium (V% = 17.38-18.22).

The Fisher test did not reveal statistically significant differences among the experimental groups.

At the age of 35 days (sixth weighing), the broilers of the control group CG had an average body weight of 1920.64±19.54 g, with 0.11-0.33 % higher than the values obtained for the broilers in experimental groups EG1 and EG2; at the same time, EG3 showed a higher average body weight, exceeding the CG values by 1.88% and the EG1 and EG2 by 2.00-2.23%.

The homogeneity of the two groups analysed was medium (V% = 16.74-19.87).

There were statistically significant differences between EG3 and EG1 and EG2.

At the last weighing (the seventh), when the broilers became 42 days old, the best result was registered for the control group with 2370.80 g, higher by 0.56-10.3 % than the average weights obtained within the experimental groups.

The variance coefficient was under 20 %, indicating a medium homogeneity for this parameter (V% = 17.83-19.37).

Statistically significant differences were recorded among the following groups: CG-EG2, CG-EG1, EG3-EG2, and EG3-EG1.

By analysing these last values it can be concluded that feeding the chickens with combined feedstock without fodder additives (EG1, EG2 and EG3) did not have a beneficial effect on the body weight of the studied broiler chickens. The experimental groups obtained lower body weights by 0.56-10.3%.

The lowest result was registered in the case of EG2, a group in which the housing density was the highest – 16 birds per m^2.

The same dynamics of broilers weight gain is shown in *Figure 1*.

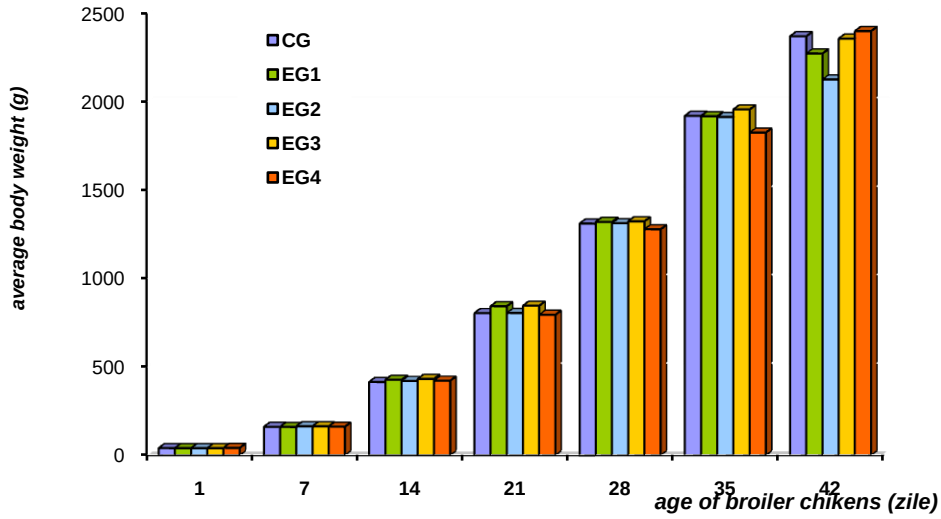


Figure 1. Dynamics of body weight for the studied broiler chickens

Comparing the average values of the studied broilers body weights with the standard weights mentioned in the "Ross-308" chickens breeding guide, it can be noticed that lower body weights were obtained at the end of the 42 days, but, during the growth period, for some of the weightings the standard values were exceeded.

As such, at the age of 7 days, the broilers in groups EG2 and EG3 had higher average body weights by 1.33-1.44% than the standard; at the age of 21 days all groups recorded higher values than the standard ones by 1.17-6.46%. The same situation was recorded at the age of 28 days, when the broilers participating in the experiment had higher average weights than standard by 2.52-3.50%; the same situation was encountered at the age of 35 days, when the difference was 4.82-7.16%.

Unfortunately, at the end of the experiment, the broilers in the experimental groups did not manage to exceed the standard value for this hybrid – 2400 g. However, broilers in two of the groups came very close – CG – 2370.80 g and EG3 – 2357.34 g.

Feedstock consumption

The rate of feedstock consumption corresponded to the achieved body weight. As we know, there is a positive correlation between the speed of growth and the specific feedstock consumption, in the sense that the animals with better growth performances have lower specific feedstock consumption and vice-versa.

At the end of the 42 days of growth for the studied broilers the feedstock consumption index was calculated to a value of 1.809 kg c.f./ kg growth in the case of the control group and with 3.59-4.69% higher for the experimental groups (*Table 3*).

Table 3. Specific feedstock consumption

Experimental groups	Total growth (kg/bird)	Average consumption (kg/bird)	FCR (kg c.f./ kg growth)	± % compared to CG
CG	2.330	4.217	1.809	-
EG1	2.229	4.218	1.892	+ 4.58
EG2	2.085	3.951	1.894	+ 4.69
EG3	2.316	4.341	1.874	+ 3.59

Bird losses and their causes

The bird deaths registered for the entire duration of the experiment did not exceed 3.5% for any of the experimental groups (*Table 4*).

The lowest losses were recorded in particular during the first week of life, being accidental. Other causes for these losses were enteritis and coccidiosis. Throughout the observation period there were signalled no specific illnesses.

Table 4. Evolution of bird losses

Experimental groups	No. of broilers at the start of the experiment	No. of broilers at the start of the experiment	Losses	%
CG	12150	11747	403	3.31
EG1	12150	11768	382	3.14
EG2	12960	12533	427	3.29
EG3	11340	10974	366	3.22

European efficiency factor

At the end of the experimental period, when the broilers were 42 days old, the European efficiency factor (EEF) was calculated. It was then used to estimate the growing efficiency of the studied broiler chickens pertaining to the experimental groups.

Several parameters were used to determine the EEF: slaughtering age of the broilers, in days, the average live weight recorded at the slaughtering age per group (kg), the observed viability per group (%) and the feedstock conversion index (FCR kg c.f./ kg growth). *Table 5* presents the calculus elements and the results obtained for the EEF using the formula below:

$$\text{EEF} = \frac{\text{Viability (\%)} \times \text{weight (kg)}}{\text{Age (days)} \times \text{CI (kg c.f./kg growth)}} \times 100$$

Table 5. The European Efficiency Factor

Experimental groups	Age (days)	Average live weight (kg)	Mortality (%)	FCR (kg c.f./kg growth)	EEF
CG	42	2.370	3.31	1.809	301.63
EG1	42	2.273	3.14	1.892	271.49
EG2	42	2.126	3.29	1.894	258.35
EG3	42	2.357	3.22	1.874	289.84

By analysing the values calculated for the EEF, it can be observed that a higher value was recorded for the control group by 3.90-14.34 % compared to that obtained for the experimental groups (EG1, EG2 and EG3); this fact can be explained especially by considering the higher weights at the time of the slaughter of the studied broilers from CG, with 0.54-10.29 % higher compared with those of the experimental groups.

CONCLUSIONS

The research performed revealed that the broilers in the control group CG obtained better results that those in the experimental groups (EG1, EG2 and EG3) in terms of live weight, average daily growth and the feedstock consumption index.

From an economic perspective, the control group registered the highest value of the European Efficiency Factor (EEF), with 3.90-14.34 % higher than in the case of the experimental groups.

Therefore, administering combined feedstock without fodder additives to the studied broilers in the experimental groups (EG1, EG2 and EG3) proved to be inappropriate. Similarly, the increase of the housing density from 14 birds per m^2 to 16 birds per m^2 was not beneficial in terms of growth, development and feedstock consumption, because the broilers in EG2 obtained the lowest results for all analysed parameters.

BIBLIOGRAFIE

1. BORMAN, K.N. and col., 1999 – British Poultry Science, vol. 40, CARFAX, UK.
2. ELWINGER. K. and TEGLOF, B., 1991 – Performance of broiler chickens as influenced by a dietary enzyme complex and without antibiotic supplementation. Arch. Geflügelk 55:69-73.
3. FERKET, P.R., 2004 – Alternatives to antibiotics in poultry productions: responses, practical experience and recommendations. Proceeding of Alltech's 20th Annual Symposium. Nottingham University Press, pag. 53-67.
4. FOTEA, LENUŢA, P. HALGA, I.M. POP, VIORICA POPA, 2003 - Folosirea aditivilor botanici în alimentaţia animalelor, concept nou referitor la aditivii furajeri. Lucrări ştiinţifice, seria zootehnie, vol. 46, USAMV-Iaşi.
5. KAMEL, C. şi col., 2002 - Feed International vol. 23 nr. 3.
6. LARBIER, M. şi LECLERCQ, B., 1994 – Nutriţia şi alimentaţia păsărilor. Editura Alutus D, Bucuteşti.
7. MIERLIŢĂ, D., SĂLĂJAN, Gh., GEORGESCU, B., 2002 – Influenţa probioticelor bazate pe acizi organici asupra performanţelor productive şi a microflorei digestive la puii de carne. Lucrări Ştiinţifice, seria zootehnie, vol. 45, USAMV-Iaşi.
8. PERIS SILVIA şi col., 2002 - Additives for animal performance: Organic acids plus botanicals. Feed International vol. 23 nr. 3.
9. POP, I.M., 2006 – Aditivi furajeri. Editura TipoMoldova, Iaşi.
10. SIMEANU, D., 2004 – Biostimulatori în alimentaţia păsărilor. Editura Alfa, Iaşi.
11. STAN, GH. şi SIMEANU D., 2005 – Alimentaţia păsărilor
12. STAN, GH. şi SIMEANU D., 2005 – Nutriţie animală. Editura Alfa, Iaşi.. Editura Alfa, Iaşi.
13. VACARU-OPRIŞ, I. şi col., 2002 - Tratat de avicultură, vol. II. Editura Ceres, Bucureşti.
14. VACARU-OPRIŞ, I. şi col., 2005 – Sisteme şi tehnologii de creştere a puilor broiler de găină. Editura Ceres, Bucureşti.

CERCETARI PRIVIND IMBUNATATIREA CALITATII GALBENUSULUI OUALOR DE CONSUM

RESEARCHES RELATED TO THE IMPROVEMENT OF CONSUMPTION EGGS YOLK QUALITY

SIMEANU D., GAVRILAŞ Angela
USAMV Iaşi
danielsimeanu@yahoo.com

The research has been finished within Avicola Lumina Company Constanta, on a total number of 1000 hens belonging to the commercial hybrid Roso-SL 2000, which have been divided into 5 experimental allotments (LC, LE1, LE2, LE3 and LE4). The feeding has been done using mixed fodder especially for top egg laying, with the specification that in the food used for the experimental allotments different fodder additives have been used for yolk colouring as follows: for LE1 Oro Glo Layer Dry additive has been use in a doses of 100 g/t; for the LE2 allotment Klem Glo 5 Dry has been used in a doses of 1 kg/t; for LE3 allotment a mixture of additives was introduces form by Oro Glo Layer Dry 150 g/t and Klem Glo 5 Dry 1,2 kg/t; for the LE4 allotment Carophyll Yellow additive has been used in a doses of 35 g/t.

After the current experience, it has been noticed that the additives used had no influence on the production of eggs or on the food consumption, but only on the intensity of the yolk colouring, determining an improvement of 91.75 – 121.64 %.

Key words: yolk, colour, additives, hens, poultry

MATERIAL ŞI METODĂ

Conform planului experimental, prezentat în *tabelul 1*, s-au luat în studiu găini ouătoare producătoare de ouă consum din hibridul comercial Roso-SL 2000 în vârstă de 25 de săptămâni ce au fost împărţite în 5 loturi de experienţă.

Factorul variabil a fost hrana administrată păsărilor, care a conţinut diferiţi aditivi furajeri pentru colorarea gălbenuşului ouălor. Astfel, păsările din lotul de control nu au primit în hrană astfel de aditivi, în timp ce în alimentaţia păsărilor din lotul 1 experimental (LE1) s-a utilizat aditivul Oro Glo Layer Dry în doză de 100 g/t; la lotul 2 experimental (LE2) s-a folosit Kem Glo 5 Dry, în doză de 1 kg/t; la lotul 3 experimental (LE3) s-a introdus un amestec de aditivi format din Oro Glo Layer Dry, 150 g /t şi Kem Glo 5 Dry, 1,2 kg/t; la lotul 4 experimental (LE4) s-a utilizat Carophyll yellow în doză de 35 g/t. Dozele de administrare a aditivilor furajeri sunt cele recomandate de firmele producătoare.

Tabelul 1 Schema de organizare a experienţei

Loturi de experienţă	LC	LE1	LE2	LE3	LE4
Felul hibridului	"ROSO-SL 2000"				
Vârsta găinilor la începutul perioadei experimentale	25 săptămâni				
Vârsta găinilor la sfârşitul perioadei experimentale	50 săptămâni				
Hrana administrată	Nutreţ combinat fără aditivi furajerei	Nutreţ combinat + Oro Glo Layer Dry: 100 g/t	Nutreţ combinat + Kem Glo 5 Dry: 1 kg/t	Nutreţ combinat + Oro Glo Layer Dry: 150 g /t + Kem Glo 5 Dry: 1,2 kg/t	Nutreţ combinat + CAROPHYLL YELLOW: 35 g/t
Număr de găini	200	200	200	200	200
INDICATORI URMĂRIŢI:					
- Curba de ouat pe loturi de experienţă - Consumul de hrană: consumul mediu de hrană (g n.c./cap/zi) şi consumul specific (g n.c./ou) – determinări săptămânale - Intensitatea colorării gălbenuşului: determinări săptămânale.					

Aprecierea culorii gălbenuşului s-a făcut prin compararea acestuia cu scara etalon La Roche (*fig. 1*). Scara La Roche, cuprinde 15 eşantioane de culoare numerotate de la 1 la 15. La primele două eşantioane, culoarea este galbenă foarte deschisă, între 2 şi 7 culoarea este galbenă cu nuanţe din ce în ce mai închise, iar după 7 culoarea virează spre orange.

Fig. 1. Scară „Roche" de apreciere a intensităţii colorării gălbenuşului REZULTATE ŞI DISCUŢII

Dinamica producţiei de ouă

Producția de ouă înregistrată pe tot parcursul celor 25 de săptămâni de experiență nu a prezentat diferențe semnificative între la cele cinci loturi formate în cadrul experimentului, dar a prezentat diferențe față de curba de ouat standard pentru hibridul pe care s-a lucrat.

Astfel, intensitatea ouatului a atins vârful de producție la vârsta găinilor de 31 săptămâni, cu 4 săptămâni mai târziu decât prevederile ghidului de creştere al hibridului comercial Roso SL. De asemenea, nu s-a realizat un platou clar al curbei de ouat, aşa cum este prevăzut în ghidul de creştere (*fig. 2*).

Începând cu a 32 săptămână de viață a găinilor studiate producția de ouă a acestora a început să scadă mult mai intens în comparație cu prevederile standard. Astfel, dacă în perioada 32-34 săptămâni procentul de ouat standard este de 94% la găinile studiate a fost cuprins între 92,5-92,6% în săptămâna 32; de 92,3-92,4% în săptămâna 33, iar în săptămâna 34 de 91,8-92,2%.

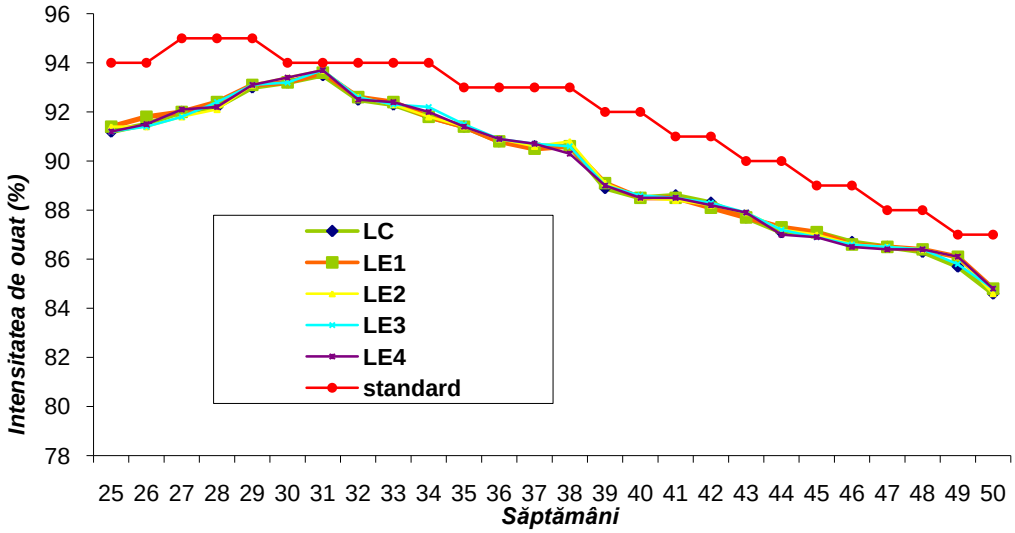


Fig. 2. Curba intensităţii de ouat la găinile studiate

Acest gen de dinamică se poate constata în perioadele următoare ajungându-se ca la finalul experienței, atunci când găinile au împlinit vârsta de 50 săptămâni procentul de ouat pe loturi de experiență să fie de 84,6% la lotul LC, 84,8% la lotul LE1; 84,6% la lotul LE2, 84,8% la lotul LE3 ca şi în

cazul lotului LE4. Aceste valori au fost cu 2,52-2,75% mai scăzute decât valoarea standard (87%) prevăzută în ghidul de creştere al hibridului Roso-SL.

Nici de această dată nu putem spune că administrarea în hrana păsărilor din loturile experimentale a unor aditivi furajeri pentru colorarea mai intensă a gălbenuşului a influenţat parametrul studiat – intensitatea ouatului.

Apreciate în ansamblu, rezultatele obţinute de către găinile din cele cinci loturi de experienţă ca intensitate a ouatului se poate afirma că acestea nu au exprimat potenţialul productiv cu care este cotat hibridul comercial pe care s-a lucrat, din cauza unor factori obiectivi, care pot să ţină atât de valoarea zootehnică a seriei de păsări introdusă în experienţă, cât şi de unii factori de natură tehnologică, precum: calitatea mai slabă, uneori, a materiilor prime pe baza cărora s-au fabricat nutreţurile combinate administrate, climatizare inadecvată a halelor de experienţă etc.

Consumul de hrană

În ceea ce priveşte consumul de hrană al găinilor din cadrul acestui experiment nu s-au constatat valori mult diferenţiate între loturi nici din punct de vedere al consumului mediu de hrană şi nici din punct de vedere al consumului specific (*fig. 3 şi 4*).

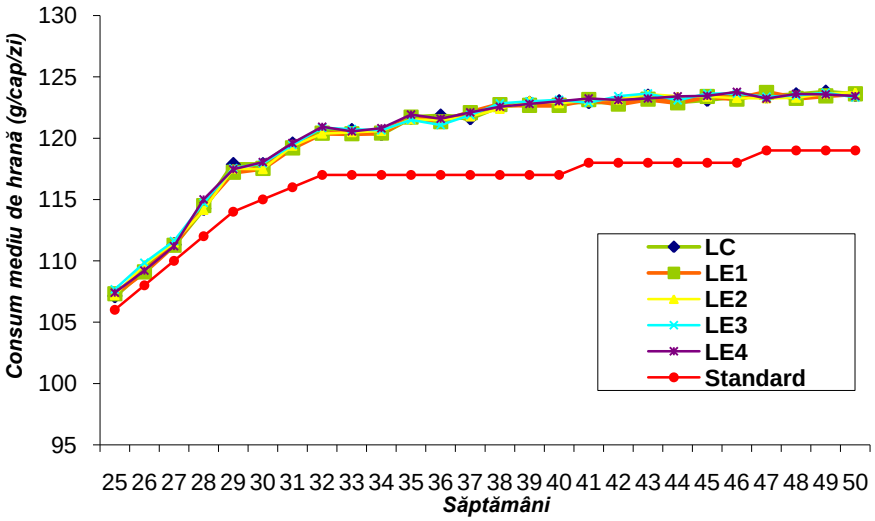


Fig. 3. Consumul mediu de hrană al găinilor studiate

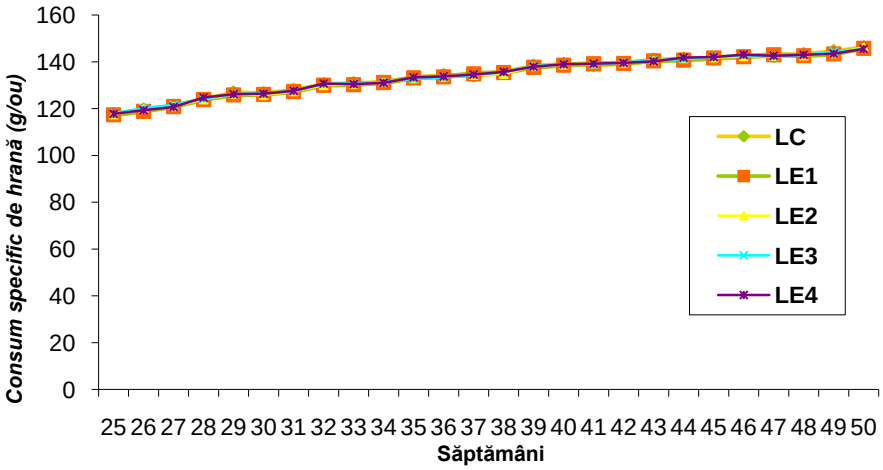


Fig. 4. Consumul specific de hrană al găinilor studiate

Astfel, la începerea experimentului, atunci când păsările aveau vârsta de 25 săptămâni, consumul mediu de hrană (g/cap/zi) a fost cuprins între 107,14 la lotul LC şi 107,68 la lotul LE3; iar consumul specific (g n.c./ou) între 117,28 la lotul LE2 şi 118,08 la lotul LE3

Diferenţele au fost foarte mici şi în cazul comparării consumurilor medii de hrană realizate de păsările studiate cu consumul standard. Astfel, la aceiaşi vârstă, 25 săptămâni, consumul mediu zilnic de hrană prezentat în ghidul de creştere este de 106 g n.c./cap/zi.

Diferenţele între consumul mediu zilnic de hrană şi consumul realizate de găinile luate în studiu s-au accentuat odată cu înaintarea în vârstă a păsărilor. Astfel, la vârsta de 31 săptămâni, atunci când a fost atins vârful de ouat s-a înregistrat un consum mediul zilnic de hrană cuprins între 119,21 g n.c./cap/zi la lotul L1exp şi 119,60 g n.c./cap/zi la lotul LE4; aceste valori au fost cu 2,76-3,10% mai ridicate decât valoarea standard – 116 g n.c./cap/zi.

În ceea ce priveşte consumul specific de hrană la această vârstă se poate observa că acesta a fost cuprins între 127,36 g n.c./ou la lotul LE1 şi 127,82 g n.c./ou la lotul LC.

La finalul experienţei, când păsările aveau vârsta de 50 săptămâni, consumul specific de hrană (g n.c./ou) a fost cuprins între 145,42 la lotul LE3 şi 146,27 la lotul LE2.

Cât priveşte consumul mediu zilnic de hrană (g n.c./cap/zi) la finalul experienţei se poate aprecia faptul că s-au înregistrat valori mai ridicate decât valoarea standard cu 3,72-3,99%.

Intensitatea colorării gălbenuşului

Aprecierea intensităţii colorării gălbenuşului la ouăle obţinute de la găinile studiate s-a efectuat cu ajutorul scării Roche. Săptămânal s-au recoltat câte 20 de ouă de la fiecare lot de experienţă şi s-a notat intensitatea colorării gălbenuşului.

Rezultatele obţinute, la finalul experienţei, indică diferenţe statistice foarte semnificative între notele obţinute la lotul de comparaţie (LC) şi cele constatate la loturile experimentale. Astfel, nota medie calculată pentru intensitate colorării gălbenuşului la lotul LC a fost de 3,88±0,32, cu 91,75-121,64% mai scăzută decât notele medii stabilite pentru loturile experimentale (*tab. 2*).

Omogenitatea loturilor a fost medie (V%=10-20).

Cele mai bune rezultate s-au obţinut la lotul LE3, lot ce a primit în hrană un amestec format din doi aditivi furajeri - Oro Glo Layer Dry şi Kem Glo 5 Dry; dozele de încorporare în nutreţul combinat administrat au fost de 150 g /t pentru *Oro Glo Layer Dry* şi de 1,2 kg/t pentru *Kem Glo 5 Dry*.

Dintre aditivii furajeri utilizaţi singuri în hrana păsărilor studiate, cele mai bune realizări s-ai obţinut în cazul aditivului *CAROPHYLL YELLOW*, administrat în doză de 35 g/t. Nota medie calculată la lotul L4exp, lot ce a primit în hrană acest aditiv, a fost de 8,44±0,39, superioară celorlalte loturi cu: 117,52% faţă de lotul Lc; 11,84% faţă de lotul LE1; 0,95% faţă de lotul LE2.

Tabelul 2 Notele medii obţinute pentru intensitatea colorării gălbenuşului

Estimatori statistici	Loturi de experienţă				
	LC	LE1	LE2	LE3	LE4
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	3,88±0,32	7,44±0,41	8,36±0,48	8,60±0,52	8,44±0,39
V%	11,51	12,08	11,59	12,37	13,04
Testul Fisher	$F_{5\%}$=2,37; $F_{1\%}$=3,32; $F_{0,1\%}$=4,62; $\hat{F}$ =6,22 > $F_{0.1}$=4.62 *Diferenţele statistice sunt foarte semnificative (***)*				
Testul Tukey		L3exp-Lc	***		
		L3exp-L1exp	n.s.		
		L3exp-L2exp	n.s.		
		L3exp-L4exp	n.s.		
		L4exp-Lc	***		
		L4exp-L1exp	n.s.		
		L4exp-L2exp	n.s.		
		L3exp-Lc	***		
		L2exp-L1exp	n.s.		
		L1exp-Lc	***		

Notă: n.s – nesemnificativ; *** - foarte semificativ.

CONCLUZII

Producţia de ouă înregistrată pe tot parcursul celor 25 de săptămâni de experienţă nu a prezentat diferenţe semnificative între la cele cinci loturi formate în cadrul experimentului, dar a prezentat diferenţe faţă de curba de ouat standard pentru hibridul pe care s-a lucrat.

Astfel, vârful de producţie al găinilor studiate a fost atins la vârsta de 31 săptămâni, cu 4 săptămâni mai târziu decât prevederile ghidului de creştere al hibridului comercial Roso SL. De asemenea, platoul curbei de ouat nu a fost bine evidenţiat.

Apreciate în ansamblu, rezultatele obţinute de către găinile din cele cinci loturi de experienţă ca intensitate a ouatului se poate afirma că acestea nu au exprimat potenţialul productiv cu care este cotat hibridul comercial pe care s-a lucrat, din cauza unor factori obiectivi, care pot să ţină atât de valoarea zootehnică a seriei de păsări introdusă în experienţă, cât şi de unii factori de natură tehnologică, precum: calitatea mai slabă, uneori, a materiilor prime pe baza cărora s-au fabricat nutreţurile combinate administrate, climatizare inadecvată a halelor de experienţă etc.

Prin suplimentarea hranei păsărilor din loturile experimentale cu aditivi furajeri pentru colorarea mai intensă a gălbenuşului (*Oro Glo Layer Dry, Kem Glo 5 Dry*, *CAROPHYLL YELLOW*) nu a influenţat intensitatea ouatului.

În ceea ce priveşte consumul de hrană al găinilor din cadrul acestui experiment nu diferenţe între loturi; astfel, la începerea experimentului, consumul mediu de hrană (g/cap/zi) a fost cuprins între 107,14 la lotul LC şi 107,68 la lotul LE3; iar consumul specific (g n.c./ou) între 117,28 la lotul LE2 şi 118,08 la lotul LE3. Consumul mediu realizat de găinile din cadrul experienţei au fost cu 1,07-1,58% mai ridicat faţă consumul prevăzut în ghidul de creştere al hibridului Roso SL.

La finalul experienţei nu s-au constatat diferenţe semnificative între consumurile specifice de hrană (g n.c./ou) realizate de cele cinci de experienţă, acestea fiind cuprinse între 145,42 la lotul LE3 şi 146,27 la lotul LE2.

Cât priveşte consumul mediu zilnic de hrană (g n.c./cap/zi) la finalul experienţei se poate aprecia faptul că s-au înregistrat valori mai ridicate decât valoarea standard cu 3,72-3,99%.

În urma administrării în hrana găinilor ouătoare studiate a trei aditivi furajeri *Oro Glo Layer Dry, Kem Glo 5 Dry*, *CAROPHYLL YELLOW* s-a îmbunătăţi gradul de colorare a gălbenuşului. Astfel, nota medie calculată pentru intensitate colorării gălbenuşului la lotul LC a fost de 3,88±0,32 aceasta fiind cu 91,75-121,64% mai scăzută decât notele medii stabilite pentru loturile experimentale.

Cele mai bune rezultate s-au obţinut la lotul LE3, lot ce a primit în hrană un amestec format din doi aditivi furajeri - Oro Glo Layer Dry şi Kem Glo 5 Dry; dozele de încorporare în nutreţul combinat administrat au fost de 150 g /t pentru *Oro Glo Layer Dry* şi de 1,2 kg/t pentru *Kem Glo 5 Dry*.

Dintre aditivii furajeri utilizaţi singuri în hrana păsărilor studiate, cele mai bune realizări s-ai obţinut în cazul aditivului *CAROPHYLL YELLOW*, administrat în doză de 35 g/t. Nota medie calculată la lotul LE4, lot ce a primit în hrană acest aditiv, a fost de 8,44±0,39, superioară celorlalte loturi cu: 117,52% faţă de lotul LC; 11,84% faţă de lotul LE1; 0,95% faţă de lotul LE2.

BIBLIOGRAFIE

1. LEESON S., SUMMERS J.D., 1997 - Comercial Poultry Nutrition, Second Edition, ed University Books, Poultry Science 62:499-504.
2. NYS Y., 2001 - Recent developments in layer nutrition for optimizing shell quality. 13tn European Symposium on Poultry Nutrition. Blankenberge, Belgium
3. NYS Y. şi col., 1999 - Avian eggshell mineralization, Poultrv Avian Biol. Rev. 10:143-166
4. NYS Y., 2000 - Dietary carotenoids and egg yolk coloration. A review. Arch. Geflugelk-, 64, p. 45-54.
5. NYS Y., SAUVEUR B., 2004 - „Valeur nutritionnelle des oeufs". INRA Prod. Anim. 17
6. POP I.M., 2006 – Aditivi furajeri,, Editura Tipo-Moldova, Iaşi
7. SIMEANU, D., 2004 – Biostimulatori în alimentaţia păsărilor. Editura Alfa, Iaşi.
8. SIMEANU, D. şi col., 2006 – Prepararea furajelor şi producerea nutreţurilor combinate. Editura Alfa, Iaşi.
9. STAN, GH. şi SIMEANU D., 2005 – Alimentaţia păsărilor
10. STAN, GH. şi SIMEANU D., 2005 – Nutriţie animală. Editura Alfa, Iaşi.. Editura Alfa, Iaşi.
11. VACARU-OPRIŞ, I. şi col., 2000 – Tratat de avicultură, vol. I. Editura Ceres, Bucureşti.
12. VACARU-OPRIŞ, I. şi col., 2002 – Tratat de avicultură, vol. II. Editura Ceres, Bucureşti.
13. VACARU-OPRIŞ, I. şi col., 2004 – Tratat de Avicultură, vol. III. Editura Ceres, Bucureşti.

ASSESSMENT OF FUNGI AND MYCOTOXINS CONTAMINATION INFLUENCE ON NUTRITIVE VALUE OF SOME CONCENTRATE FORAGES AND CORN SILAGE

SIMION Violeta[1], MITRĂNESCU Elena[2], TAPALOAGA Dana[2], FURNARIS F.[2], BUSTANI S.[2]
[1] FMV Spiru Haret Bucuresti
[2]USAMV, FMV Bucuresti

Fungi and mycotoxins contamination was assessed based on 16 concentrate forages and corn silage samples collected during February and April 2007, in a family dairy cows' farm in Ilfov County.

These samples were organoleptic appreciated (shape, color, smell, impurification range), then mycologic and mycotoxicologic analyzed (total aflatoxins – AF, ochratoxin A – OTA, citrinine – CT and zearalenone - ZEA).

The mycotoxicologic analyze was made by ELISA and results interpretation was made in accordance with 249/2003 MAAP and MSF Order and 18/2007 ANSVSA Order.

By mycologic analyze of forage samples we revealed the following: during February there were carried out fungi from Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Cladosporium, Absidia, Candida, Mucor, Rhyzopus genera and yeasts in all the analyzed sample, except the wheat bran samples – where there were established only yeasts and the contamination range varied between 7 x 10^3 – 2,7 x 10^4 fungi/g; during April there were established yeasts and fungi from the above genera in all the analyzed samples except corn silage and corn flour samples – where there were established only yeasts and the contamination range varies between 5,7 x 10^3 – 4,7 x 10^4 fungi/g.

By mycotoxicologic analyze of forage samples we noticed: during February, AF had values between 0,95 and 4,25 ppb, OTA had values between 0,66 and 7,34 ppb, CT had values between 43,79 and 177,02 ppb and ZEA between 40 and 1000 ppb; during April, AF had values between 0,61 and 4,91 ppb and OTA between 2,05 and 8,76 ppb.

In the 16 forage samples analyzed during February and April 2007 in the same forage stock, the organoleptic modifications, chemical parameters, fungi and mycotoxins presence were partially correlated.

Key words: forages, dairy cows, fungi, mycotoxins

The research had as aim the assessment of influence of fungi and mycotoxins contamination for concentrate forage and corn silage in dairy cows feed in family farm on their nutritive values.

MATERIALS AND METHODS

Having in view the aim of the study, during February and April 2007 there were collected and analyzed 16 samples of which one sample of corn silage and 15 of concentrate forages (corn flour, wheat and oat grinded, peas grinded, sun flower oil cakes, mixed forages for youth, combined forages for dairy cows) from the same stock in a family farm in Ilfov.

The organoleptic assessment of forages was carried out separately for each forage and consisted in the establishing of: shape, color, smell and impurities.

The mycotoxicologic analyze was made by ELISA and consisted in establishing of: total AF, OTA, CT and ZEA.

The collecting, processing and analyzing of the samples were carried out in accordance with the stipulated methodologies. The results interpretation was made based on 249/2003 MAAP and MSF Order and 18/2007 ANSVSA Order.

RESULTS AND DISCUSSIONS

In the table no. 1 there are shown the results of the chemical, qualitative and quantitative mycologic and mycotoxicologic analyzes.

Table no. 1 The chemical analysis, the identified fungi genders, the contamination degree with fungi and the quantity of AF, OTA, CT and ZEA that were determined in the analyzed assays of fodder in February and April 2007

Fodder		The identified fungi genders	NTF/g	AF ppb	OTA ppb	CT ppb	ZEA ppb
Type	No.						
February month							
Wheat and oat grinded	1	*Aspergillus spp.,Penicillium spp., Absidia spp.*, levuri	1 x 10^4	1,24	0,66	68,95	>1000
Peas grinded	1	*Aspergillus spp., Cladosporium spp., Mucor spp., Rhyzopus spp.*	8 x 10^3	0,95	1,19	52,52	45
Wheat bran	1	levuri	2,7x10^4	1,72	2,78	61,36	< 40
Non-fried sun flower oil cake	1	*Aspergillus spp., Cladosporium spp., Mucor spp.*, levuri	6 x 10^3	4,25	2,64	177,02	110
Mixed forage for dairy cows	1	*Penicillium spp., Fusarium spp., Absidia spp.*, levuri	2,4x10^4	1,56	7,34	60,42	50
Mixed forage for youth	1	*Aspergillus spp., Penicillium spp., Cladosporium spp., Fusarium spp., Mucor spp., Rhyzopus spp.*	7 x 10^3	1,63	4,50	43,79	< 40
Samples analyzed total no.	6		6	6	6	6	6
Limit of variation			7x10^3-2,7x10^4	0,95-4,25	0,66-7,34	43,79-177,02	< 40->1000
Limit of reference			5x10^4	4	5	*	100
Corn silage	1	levuri	4,7x10^4	0,64	2,05		
Fried sun flower oil cake	1	*Aspergillus spp., Cladosporium spp., Mucor spp.*, levuri	6 x 10^3	2,23	5,02		
Corn flour	1	*Aspergillus spp., Penicillium spp.,Fusarium spp.,Cladosporium spp.,Absidia spp.*, levuri	6 x 10^3	0,71	2,32		
Grinded wheat and oat	1	levuri	3,4x10^4	0,61	4,32		
Peas grinded	1	*Aspergillus spp., Penicillium spp.,Candida spp., Mucor spp.,Rhyzopus spp.*	5 x 10^3	3,03	5,91		
Wheat bran	1	*Aspergillus spp.,Penicillium spp.,Candida spp.,Mucor,Rhyzopus spp.*	1,6x10^4	4,09	3,21		
Non-fried sun flower oil cake	1	*Aspergillus spp.,Fusarium spp.,Penicillium spp.,Mucor,Rhyzopus spp.*	7 x 10^3	4,91	7,76		
Mixed forage for dairy cows	1	*Aspergillus spp.,Fusarium spp.,Penicillium spp.,Mucor,Rhyzopus spp.*	1,6x10^4	4,64	8,76		
Mixed forage for youth	1	*Aspergillus spp.,Penicillium spp.,Candida spp.,Mucor,Rhyzopus spp.*	5 x 10^3	3,01	5,02		
Samples analyzed total no.	10		10	10	10		
Limit of variation			5x10^3-4,7x10^4	0,61-4,91	2,05-8,76		
Limit of reference			5x10^4	4	5		

A) There were organoleptical appreciated forage samples as: wheat and oat grinded, peas grinded, wheat bran, non-fried sun flower oil cake, mixed forage for dairy cows, mixed forage for youth, corn silage, fried sun flower oil cake and corn flour.

Following the organoleptic analyze it was noticed that all the 16 samples had normal aspects, color, shape and smell, except the mixed forage sample for dairy cows in both analyzed periods.

B) Analyzing the data regarding fungi contamination shown in table 1 it may conclude:

- ● during February there were carried out in all the samples fungi as: *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Cladosporium, Absidia, Candida, Mucor, Rhyzopus* and yeasts, except the third sample, the wheat bran one, where there were established only yeasts.
- The contamination range as TNF/g varied for the analyzed samples in this period between 7 x 10^3 and 2,7 x 10^4, the obtained values being 100% (6 samples) below the maximum admitted limit;

- ● during April, there were established in all the samples yeasts and fungi from the above genera except the first sample (corn silage) and the fourth (corn flour) where there were carried out only yeasts.

The TNF/g in the analyzed samples during this period varied between 5 x 10^3 and 4,7 x 10^4, the obtained results being 100% (10 samples) bellow the maximum admitted limit.

C) Analyzing the data regarding the mycotoxins contamination shown in table 1 it may conclude:

- ● in the samples harvested during February, AF concentration was between 0,95 and 4,25 ppb: in 16,6% cases (1 sample) values being over the admitted limit and in 83,3% cases (5 samples) below the limit; OTA had concentration between 0,66 and 7,34 ppb: in 16,6% cases (1 sample) values being over the admitted limit and in 83,3% cases (5 samples) below the limit; CT had concentration between 43,79 and 177,02 ppb and even they are not stipulated maximum admitted limits for this mycotoxin, values higher than 40 ppb CT could generate in cows a haemoragic syndrome with fever and itches; ZEA had concentration which varied between 40 and 1000 ppb: in 33,3% of cases (2 samples) values being over the admitted limit and in 66,6% of cases (4 samples) below.
- ● in the forage samples analyzed during April, AF had concentration between 0,61 and 4,91 ppb: in 30% of cases (3 samples) the values being over the admitted limit and in 70% of cases (7 samples) below it; OTA had concentration between 2,05 and 8,76 ppb: in 50% of cases (5 samples) the values being over the admitted limits and in 50% below the limit.

In the six forage samples analyzed during February, concerning the correlations between the organoleptic aspects and the mycologic and mycotoxicologic parameters values, we noticed:

- - grinded wheat and oat: normal organoleptic aspects, contamination with fungi and mycotoxins; high CT contamination and ZEA over the admitted limit;
- - grinded peas: normal organoleptic aspects, contamination with fungi and mycotoxins, high CT contamination;
- - wheat bran: normal organoleptic aspects, yeasts and mycotoxins contamination, high CT contamination;
- - raw sun flower oil cake: normal organoleptic aspects, mycotoxins and fungi contamination, AF and ZEA over the admitted limit and high CT contamination;
- - mixed dairy cows forages: normal organoleptic aspects except the oxidative smell, fungi and mycotoxins contamination, OTA over the admitted limit and high CT contamination;
- - youth mixed forages: normal organoleptic aspects, moderate contamination with fungi and mycotoxins.

Among the 10 forage samples analyzed during April, concerning the correlations between the organoleptic aspects and the mycologic and mycotoxicologic parameters values, we noticed:

- - corn silage: normal organoleptic aspects, mycotoxin and yeast contamination, OTA values below the admitted limit;
- - fried sun flower oil cake: normal organoleptic aspects, fungi and mycotoxins contamination, OTA over the admitted limit;
- - corn flour (samples 3 and 4): normal organoleptic aspects, fungi contamination in sample 3 and yeasts contamination in sample 4, mycotoxins below the admitted limits;
- - grinded wheat and oat: normal organoleptic aspects, fungi and mycotoxins contamination, OTA over the admitted limit;
- - grinded peas: normal organoleptic aspects, fungi and mycotoxins contamination below the admitted limit;
- - wheat bran: normal organoleptic aspects, fungi and mycotoxins contamination, AF over the admitted limit;

- - raw sun flower oil cake: normal organoleptic aspects, fungi and mycotoxins contamination, AF and OTA over the admitted limit;
- - mixed dairy cows forage: normal organoleptic aspects, except the oxidative smell, fungi and mycotoxins contamination, AF and OTA over the admitted limit;
- - youth mixed forage: normal organoleptic aspects, fungi and mycotoxins contamination, OTA over the admitted limit.

Sumarah and coworkers noticed in a study carried out in Canada the effect of *Penicillium roqueforti, P. crustosum* and *P. paneum* fungi in a silage forage administered in dairy cows food. The producing of roquefortin C was achieved by nitrogen source depletion in food, while penitrem A mycotoxin production was favored by carbon consumption in food, both toxins being known for their toxic potential on animals.

Mycotoxins identifying in animal forages which could represent human food sources is a permanent up-to-date problem.

CONCLUSIONS

1. The analyzed forage samples had a characteristic aspect color and smell in 87,5% cases (14 samples) and had an oxidative smell in 12,5% cases (2 samples, both mixed forages for dairy cows);
2. The mycologic analyze of forage samples revealed:
    a. during February, there were established yeasts and fungi from *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Cladosporium, Absidia, Candida, Mucor, Rhyzopus* genera in all the 6 analyzed samples, except the wheat bran sample where there were established only yeasts; the contamination range varied between 7 x 10^3 and 2,7 x 10^4 TNF/g, all the samples having values below the admitted limit;
    b. during April, there were established yeasts and fungi from *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Cladosporium, Absidia, Candida, Mucor, Rhyzopus* genera in all the 10 analyzed samples, except the corn silage and corn flour where there were established only yeasts; the contamination range varied between 5,7 x 10^3 – 4,7 10^4 TNF/g, all the samples having values below the admitted limit;
3. The mycotoxicologic analyze of forage samples revealed:
    a. during February, AF concentration was between 0,95 and 4,25 ppb: in 16,6% of cases (1 sample) having values over the admitted limit and in 83,3% of cases below the admitted limit;

    OTA concentration was between 0,66 and 7,34 ppb: in 16,6% of cases the values being over the admitted limit and in 83,3% (5 samples) below;

    CT concentration was between 43,79 and 177,02 ppb and ZEA between 40 and 1000 ppb: in 33,3% of cases (2 samples) values being over the admitted limits and in 66,6% (4 samples) being below the admitted limits;

    b. during April, AF concentration was between 0,61 and 4,91 ppb: in 30% of cases (3 samples) values being over the admitted limits and in 70% (7 samples) below; OTA had concentration between 0,05 and 8,76: in 50% of cases (5 samples) values being over the admitted limits and in 50% below the admitted limit.

REFERENCES

1. Coman I., O. Popescu, O.Bazgan, 1983 – Micotoxinele, problema actuală a patologiei veterinare, Cercetari Agronomice in Moldova, 2(62):138.
2. Coman I., M. Mares, Ancuta Apreutesei, 2002 – Rolul si importanta epidemicosanitara a micotoxinelor, Lucr. St., fascicula II, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iasi, Vol. 45(4):657.
3. Sumarah M.W., Miller J.D., Blackwell B.A., 2005 – Isolation and metabolite production by Penicillium roqueforti, P. paneum and P.crustosum isolated in Canada, Mycopathologia, 159(4):571-577
4. Whitlow, L.W., W.M. Hagler Jr., B.A. Hopkins, 1998 - Mycotoxin occurrence in farmer submitted samples of North Carolina feedstuffs: 1989- 1997. J. Dairy Sci. 81:(Abstr.)1189.

EVALUAREA INFLUENŢEI SISTEMULUI DE EXPLOATARE ASUPRA REACTIVITĂŢII IMUNE CELULARE NESPECIFICE

SPÎNU Marina, ŞANDRU Carmen Dana, BRUDAŞCĂ Gh. F., DUCA Gh.
USAMV Cluj-Napoca
marinaspinu@yahoo.com

Researches were carried out on two equal groups of bovine (n=12), kept under two different maintenance systems (semi-intensively farmed and extensive, household type) and aimed to monitor the influence of specific environmental factors on the innate cell-mediated immunity, as well as the capacity of Sylibum marianum alcoholic extraction to influence the in vitro phagocytosis. The results of carbon particle inclusion test indicated similar values for the untreated control (0.709±0.169 optical density units, ODU) and vegetal extraction treated (0.805±0.256 ODU) in vitro variants while in the 70° alcohol treated control phagocytosis was inhibited (0.884±.0.112 OD). The alcoholic extraction of Sylibum marinum inhibited the phagocytosis in extensively grown animals.

Zootehnia modernă pledează pentru implementarea unor tehnologii novatoare, aplicabile unor efective de dimensiuni diferite, dar care iau în considerare toate interrelațiile şi realizează un compromis acceptabil între biologia, fiziologia şi etologia taurinelor în funcție de rasă, categorie de vârstă şi de producțiile şi dezideratele economice, tehnice, igienico-sanitare şi ecologice (Man şi col., 2002). Aceasta coexistă ănsă, la nivelul României, cu tehnicile tradiționale de creştere, foarte diversificate în ceea ce priveşte igiena, tehnologiile de exploatae şi încărcătura microbiană a mediului vital al animalelor. Mecanismele de variație sunt deosebit de importante pentru succesul diseminării unei infecții în populația gazdă. Diversitatea fenotipică corespunzătoare variației antigenice este o strategie foarte eficientă pentru adaptarea la presiunea selectivă pe care o exercită efectorii răspunsului imun şi la diversitatea de particularități structurale şi funcționale ale țesuturilor gazdei.

În aceste condiții, sistemul imun reprezintă unul din cele mai sensibile "radare" ale organismului. Monitorizarea modificărilor la nivelul acestuia poate furniza informații utile pentru crescător în scopul asigurării condițiilor optime de întreținere şi bunăstare.

Cercetările efectuate pentru stabilirea efectelor unor extracte vegetale asupra sistemului imun şi productivității se înscriu în cadrul general al unor studii detaliate, începute în anii ´70, care urmaresc descoperirea, caracterizarea şi utilizarea unor compuşi din plante conținând elemente imunomodulatoare (imunostimulatoare sau antiinflamatoare), care să asigure o alternativă terapeutică eficace, mai apropiată de biologic decât medicamentele de sinteză (Liu F., Ng TB. – 2000).

Studiul a urmărit monitorizarea influenței condițiilor de întreținere a bovinelor asupra reactivității celulare nespecifice si capacitatea unui extract alcoolic din *Sylibum marianum* de a modifica activitatea fagocitară la bovine crescute in sisteme diferite de exploatare.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experimentul s-a realizat pe două loturi de vaci pentru lapte, crescute în sisteme de întreținere diferite, egale ca mărime (n=12), cu vârste între 5 şi 11 ani.

Bovinele crescute în sistem semintensiv sunt menținute iarna în adăposturi în sistem legat cu aşezare pe două rânduri şi dispunerea cap la cap, fiind prevazute cu adăpători mecanice cu nivel constant, iar în sezonul cald la păşune, în tabere de vară. Furajele din timpul iernii sunt constituite din fân, tain de concentrate şi suculente (tăieței de sfeclă, siloz), pe timpul verii rația zilnică fiindu-le asigurată din masă verde, suplimentată cu concentrate. Evacuarea dejecțiilor se realizează mecanic cu racleți batanți.

În sistem gospodăresc (extensiv) bovinele sunt menținute în adăposturi cu capacitate redusă, în acelaşi grajd putând fi adăpostite şi alte specii de animale (cai, porci, bivoli, găini) de vârste diferite, care nu fac decât să sporească microbiota mediului. Furajarea se face iarna cu fân, uneori suplimentat cu concentrate (făină de porumb şi tărâțe) şi suculente (sfeclă), iar vara cu furaj verde sau prin păşunat. Adăparea se face la galeată sau în unele gospodării bovinele sunt scoase la jgheab în curte. Evacuarea dejecțiilor se face manual.

Încărcătura bacteriană este diferită în cele două sisteme şi datorită faptului că în cel intensiv, dezinfecţiile periodice sunt obligatorii, în timp ce ăn sistemul gospodăresc sunt la latitudinea proprietarului.

Probele de sânge s-au prelevat în tuburi sterile câte 4,5 ml sânge pe heparină (50 UI/ml). Investigarea capacităţii funcţionale a fagocitelor circulante s-a realizat prin testul de incluzie al particulelor de carbon (tus de China). Citirea indicilor fagocitari s-a făcut spectofotometric, la 0, 25 şi 50 minute de incubare iar valorile au fost exprimate ăn unităţi de densitate optică (UDO).

S-au realizat determinări referitoare la influenţa extractului alcoolic de *Sylibum marianum in vitro* asupra capacităţii fagocitare a leucocitelor din sângele integral. Evaluarea este estimată cantitativ prin comparaţie cu martorul netratat respectiv martorul trata cu alcool, care reprezintă solventul ăîn cazul extractului vegetal.

Pentru facilitarea interpretării rezultatelor, valorile obţinute au fost logaritmate apoi reprezentate grafic. S-au calculat parametrii statistici: media, deviaţia standard şi semnificaţia statisticpă a diferenţelor (testul t)

REZULTATE SI DISCUŢII

Date recente (Hornef şi col., 2008) nu numai că au permis elaborarea unei imagini mai clare a proceselor implicate în recunoaşterea bacteriană de către celulele sistemului imun şi protejarea organismului gazdă, ci au relevat şi elemente neaşteptate referitoare la procesele inflamatorii declanşate de agresori în lumina interrelaţiei apropiate dintre gazda vertebrată şi microbiota mediului de viaţă. Sistemul imun înnăscut este o formă universală şi extrem de veche pe linia filogenetică a protecţiei macroorganismului împotriva infecţiei. Recunoaşterea imună înnăscută se bazează pe un număr limitat de receptori codaţi de bacterii (Janeway şi Medzhitov, 2001). Mai mult chiar, celulele fagocitare cooperează în procesul optim de distrugere şi degradare a agresorilor microbieni cu agenţi extracelulari respectiv alte celule imunocompetente (Nauseef, 2007). Macrofagele sunt celule care acţionează în “prima linie a apărării” împotriva microorganismelor invadante, având ca semn distinctiv abilitatea de a se activa ca răspuns la semnalele de „primejdie”. Majoritatea germenilor microbieni posedă modele moleculare (PAMPS) recunoscute de macrofage, acestea activând răspunsul celular protector (Zhang şi Mosser, 2008).

Rezultatele activităţii fagocitare înregistrate la lotul de bovine crescute în sistem gospodăresc sunt prezentate în tabelul 1.

Analizând rezultatele obţinute observăm că, în cazul variantei martor, valorile oscilează mult, fiind crescute, ceea ce indică o slabă activitate fagocitară. În cazul variantei tratate cu alcool de 70°, dinamica activităţii fagocitare este similară, pragul fiind totuşi situat mai sus decât în cazul variantei martor, ceea ce subliniază efectul inhitor al alcoolului asupra fagocitozei.

Activitatea fagocitară a celulelor tatate cu extract de *Sylibum* este crescută comparativ cu cea a martorului alcool dar nu şi comparativ cu a martorului netratat; se pare că acest extract are un efect inhibitor asupra activităţii fagocitare la lotul de vaci luate în studiu crescute în sistem extensiv (gospodăresc).

Tabel 1 - Valorile medii ale activităţii fagocitare la bovine crescute în sistem gospodaresc (UDO)

Nr. proba	Varianta martor			Varianta tratata cu alcool			Varianta tratata cu Sylibum		
	0'	25'	50'	0'	25'	50'	0'	25'	50'
Media	0,663	0,717	0,709	0,841	0,883	0,884	0,699	0,765	0,805
Dev.st	0,156	0,127	0,169	0,114	0,113	0,112	0,266	0,258	0,256

Valorile medii ale densităţilor optice obţinute în cazul variantelor martor şi a variantei tratate cu *Sylibum* sunt relativ apropiate, în timp ce varianta tratată cu alcool înregistrează valori superioare celorlalte două.

La bovinele crescute în sistem semiintensiv activitatea fagocitară (tabelul 2) este crescută la varianta tratată cu alcool, comparativ cu cea a variantei martor, dar care la rândul ei prezintă valori ale fagocitozei crescute comparativ cu cea tratată cu extract alcoolic vegetal.

Tabel nr. 2 - Valorile medii ale activităţii fagocitare la bovine crescute în sistem semiintensiv (UDO)

Nr. proba	Varianta martor			Varianta tratata cu alcool			Varianta tratata cu Sylibum		
	0'	25'	50'	0'	25'	50'	0'	25'	50'
Media	0,566	0,561	0,641	0,426	0,452	0,452	0,573	0,661	0,648
Dev.st	0,181	0,190	0,223	0,179	0,212	0,214	0,116	0,128	0,145

Se poate remarca de asemenea lipsa efectului stimulator al extractului alcoolic de *Sylibum marinum* în ceea ce priveşte activitatea fagocitară.

Din analiza activitatii fagocitare pe baza densitatilor optice (fig. 1) se observa valori superioare ale la vacile crescute in sistem extensiv, comparativ cu cele din sistem semiintensiv; dată fiind interpretarea particulară a testului (valori crescute ale densităţilor optice=fagocitoză slabă şi reciproc) se poate conchide că fagocitoza este mai intensă la categoria de animale provenite din sistemul semiintensiv, pentru toate variantele experimentale şi toţi timpii de incubare.

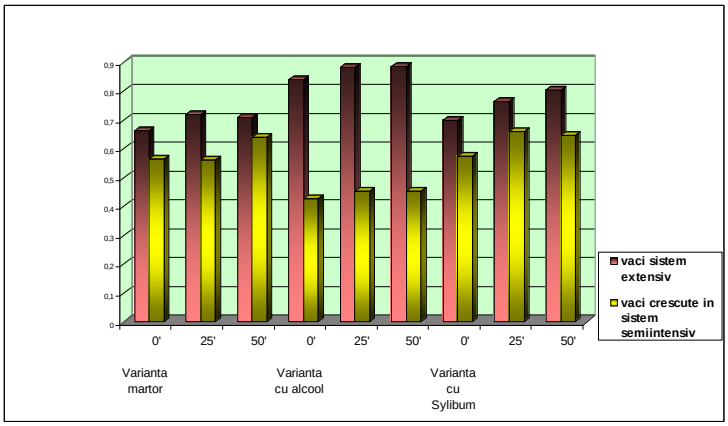


Figura 1 - Evaluarea sinoptică a activităţii fagocitare la bovine crescute în sistem extensiv si semiintensiv pe baza densităţilor optice

În urma prelucrării rezultatelor citite spectrofotometric, prin aplicarea logaritmului natural, au rezultat valorile prezentate în tabelul 3, 4, 5 si 6.

Tabel 3 - Valorile logaritmate medii ale activităţii fagocitare la bovine crescute în sistem extensiv (UDO)

Nr. proba	Varianta martor			Varianta tratata cu alcool			Varianta tratata cu Sylibum		
	0'	25'	50'	0'	25'	50'	0'	25'	50'
Med	-0,41	-0,33	-0,34	-0,17	-0,12	-0,12	-0,36	-0,27	-0,22
Stde	-1,86	-2,06	-1,78	-2,17	-2,18	-2,19	-1,32	-1,35	-1,36

Tabel 4 - Valorile ale activităţii fagocitare pe unitatea de timp la bovine crescute în sistem extensiv

Nr. proba	Varianta martor			Varianta tratata cu alcool			Varianta tratata cu Sylibum		
		Ln0-n25'	Ln25-n50'		Ln0-n25'	Ln25-ln50'		Ln0-n25'	Ln25-n50'
Med		-0.078	0.011		-0.049	-0.001		-0.090	-0.051
Stde		0.21	-0.29		0.01	0.01		0.03	0.01

Aceste valori au fost doar intermediare, servind pentru calculul activităţii fagocitare pe perioada de incubare *in vitro* (min), după formula:

Activitate fagocitară/min=(ln T1-lnT2)/durata intervalului de incubare

unde T1 şi T2 sunt momentul 0 şi 25min, respectiv 25min şi 50 min

Se poate observa că la lotul crescut în sistem extensiv, toţi aceşti indici sunt negativi, cu excepţia perioadei a doua pentru varianta martor.

Tabel 5 - Valorile logaritmate medii ale activităţii fagocitare la bovine crescute în sistem semiintensiv (UDO)

Nr. proba	Varianta martor			Varianta tratata cu alcool			Varianta tratata cu Sylibum		
	0'	25'	50'	0'	25'	50'	0'	25'	50'
Med	-0.57	-0.58	-0.44	-0.85	-0.79	-0.79	-0.56	-0.41	-0.43
Stde	-1.71	-1.66	-1.50	-1.72	-1.55	-1.54	-2.15	-2.06	-1.93

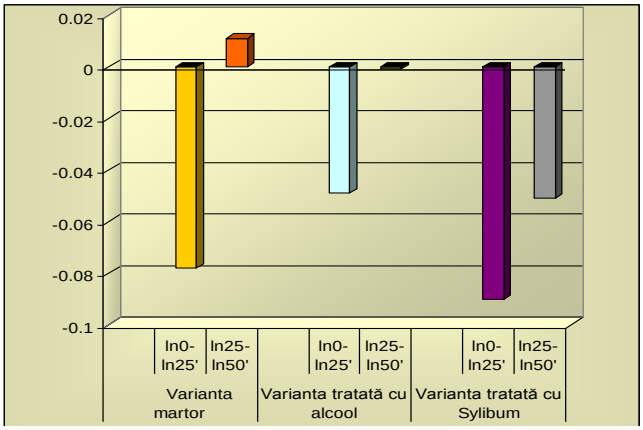


Fig.2 - Activitatea fagocitară pe intervalul de timp de incubare în sistem extensiv

Tabel 6- Valorile ale activităţii fagocitare pe unitatea de timp la bovine crescute în sistem semiintensiv (ln)

Nr. proba	Varianta martor			Varianta tratata cu alcool			Varianta tratata cu Sylibum		
	0'	Ln0-n25'	Ln25-n50'	0'	Ln0-n25'	Ln25-ln50'	0'	Ln0-n25'	Ln25-n50'
Med		0.01	-0.13		-0.06	0.00		-0.14	0.02
Stde		-0.05	-0.16		-0.17	-0.01		-0.10	-0.12

Urmărind parametri prezentaţi în fig. 2 şi 3, se poate observa că la fiecare dintre sistemele de întreţinere există indici fagocitari pozitivi. Astfel, pentru sistemul extensiv de creştere există un singur indice pozitiv în prima perioadă, iar pentru sistemul semiintensiv, doi indici pozitivi respectiv varianta martor şi stimulată cu extractul vegetal.

Extractul de *Sylibum marianum* acţionează inhibitor în primele 25 min de incubare pentru probele provenite din ambele sisteme. Cu toate acestea, inhibiţia fagocitozei prin tratarea celulelor cu extract de *Sylibum marianum* este diminuată la bovinele crescute în sistem semiintensiv prin comparaţie cu cele crescute în sistem gospodăresc iar în perioada a doua de testare efectul este stimulator slab, comparativ cu martorul alcool, dar statistic semnificativ crescut ($p<0,05$) comparativ cu lotul din sistemul gospodăresc de întreţinere. Este posibil ca microbismul accentuat al mediului să contribuie la eficientizarea efectelor principiilor vegetale.

Funcţia fagocitară reprezintă unul dintre aspectele importante ale protecţiei antiinfecţioase. Testarea capacităţii funcţionale a granulocitelor neutrofile corelată cu alte teste aplicate pentru evaluarea imunodeficienţelor, poate elucida suspiciunea de imunodeficit neutrofilic primar.

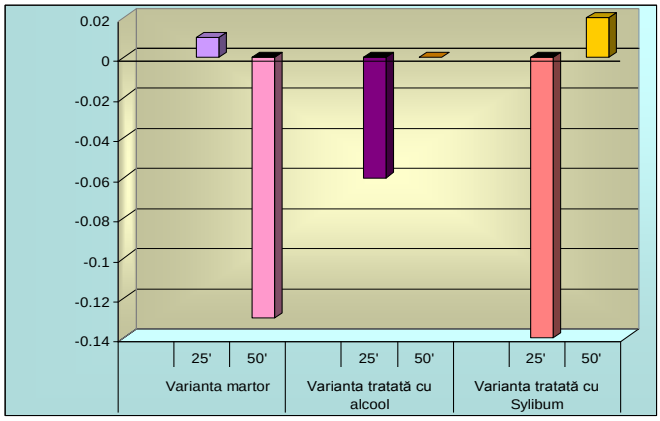


Fig.3 - Activitatea fagocitară pe intervalul de timp de incubare în sistem semiintensiv

Testele funcţionale pot depista, în cazul unor deficite neutrofilice secundare, perturbări intervenite în diferitele etape ale fagocitozei: chemotaxia, interacţiunea cu particulele opsonizate, ingestia, dezvoltarea şuntului respirator, distrugerea şi digerarea microorganismelor (Pereţianu D. şi col., 1998).

În cadrul determinărilor efectuate în pentru caracterizarea fagocitozei spontane, varianta martor se referă la investigarea capacităţii leucocitelor de a îngloba particulele de carbon din tuşul de China, *in vitro*, sub influenţa temperaturii de incubare, fără alte intervenţii (alcool, extracte vegetale, vaccinuri etc.)(Hilton şi col., 2002). Celulele sistemului imun nespecific pot fi astfel monitorizate funcţional şi se poate cuantifica potenţialul reactiv direct în caz de agresiune microbiană sau sub influenţa factorilor stresanţi, prin exprimare în densităţi optice sau valori logaritmate (Vanmiert, 1991).

Cele două sisteme de creştere a bovinelor selectate ca factor de influenţă asupra sistemului imun diferă nu numai prin tehnologie ci şi prin încărcătura bacteriană, datorită faptului că în sistemul intensiv, dezinfecţiile periodice sunt obligatorii, în timp ce în sistemul gospodăresc sunt la latitudinea proprietarului. Acest factor este cu siguranţă unul determinant în activarea fagocitozei şi responsabil de modul în care intervin diferiţii principii activi cum sunt cei din extractul de *Sylibum marianum*, în cazul de faţă.

Activitatea fagocitară poate fi modificată în sens pozitiv (stimulator) sau negativ (inhibitor) prin unele extracte vegetale (Spînu Marina şi col. 1995) cum este extractul alcoolic de *Sylibum marianum*. În prezentul experiment, extractul alcoolic utilizat determină stimularea activităţii fagocitare la lotul de bovine crescut în sistem semiintensiv, la care această funcţie este oricum superioară celei observate la animalele crescute în sistem gospodăresc.

CONCLUZII

1. Activitatea fagocitară este influenţată de sistemul de creştere, cu diferenţe pozitive semnificative statistic ($p<0,05$) în cayul lotului crescut în condiţii semiintensive, comparativ cu cel menţinut în sistem extensiv.
2. Extractul alcoolic de *Sylibum marinum* are un efect inhibitor asupra activităţii fagocitare la lotul de vaci luate în studiu crescute în sistem extensiv (gospodăresc), dar este stimulator statistic semnificativ la lotul crescut în sistem semiintensiv, în cea de-a doua perioadă de testare a fogocitozei.

BIBLIOGRAFIE

1. Vanmiert A. S. – 1991 – Acute phase response and non cellular defence mecanisms, Flemish Vet. Journ., 62: 69-91
2. Hilton LS, Bean AG, Lowenthal JW. – 2002 - The emerging role of avian cytokines as immuno-therapeutics and vaccine adjuvants. Vet Immunol Immunopathol;85(3-4):119-28
3. Pereţianu D., Saragea M. – 1998 - Imunologia în teoria şi practica medicinei, vol. 1 şi 2, Ed. All;
4. Liu F., Ng TB. – 2000 – Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. Life Sci Jan 14;66(8):725-35.
5. Man C., Podor C., Ilarie I., Ecologia exploatării taurinelor, Editura AcademicPres, Cluj-Napoca, 2002
6. Spînu Marina, Socaciu Carmen, Vasiu C., Brudaşcă Gh. F., Dumitru C., Boldizsar E., Dobrean V., - 1995 - Influenţa imunomodulatoare a unor extracte vegetale asupra câtorva efectori imunologici la diferite specii de animale domestice - Bul. USAMV-ZMV, 49, p. 375-383. 49
7. Hornef M.W., Henriques-Normark B., Normark S. - 2008 -The function and biological role of toll-like receptors in infectious diseases: an update. Curr Opin Infect Dis.;21(3):304-12.
8. Janeway C.A. Jr, Medzhitov R. – 2001 - Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216. Epub
9. Nauseef W.M. - 2007 -How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. Immunol Rev.;219:88-102.
10. Zhang X, Mosser D.M. – 2008 - Macrophage activation by endogenous danger signals. J Pathol. Jan;214(2):161-78.

MODIFICĂRI MORFOPATOLOGICE ŞI HISTOPATOLOGICE SPECIFICE ÎN CAZUL BURSITEI INFECŢIOASE AVIARE

STARCIUC N.
Universitatea Agrară de Stat din Moldova

The study was conducted to determine morfopathological characteristic modification in the case of infectious bursal disease include the histological modifications in bursa of Fabricius as a more often affected organ in infectious bursal disease. Was established that most important and characteristic morphological modifications of duded chickens was inflammation of cloacal bursa, incise in size with purulent-haemorrhagic exudates in bursal cavity, haemorrhages are fervently in the thigh and pectoral muscles in the kidneys.

Histological lesions occur primarily in the lymphoid structures of cloacal bursa. All lymphoid follicles are infected. There are severe oedema, hyperaemia, cystic cavities in medullar areas of follicles, necrosis and fagocitosis of heteruofils and plasma cells occurred and there is fibro plasma, exudates in the interffolliclare connective tissue.

Key words: bursa of Fabricius, limfoid follicles, exudat, haemorrhages, limfocite

Bursita infecţioasă aviară persistă pe parcurs a mai mult de 15 ani în efectivele de păsări din republica, clasînduse printre cele mai periculoase boli infecţioase la puii de găină. Pentru profilaxia specifică a bursitei infecţioase au fost propuse şi utilizate diferite tulpini vaccinale (medii, intermediare şi fierbinţi) produse în România, Rusia, Ucraina, Europa. La momentul actual nu exista o schemă unică de imunizare a păsărilor contra bursitei infecţioase aviare. Unele întreprinderi avicole utilizează vaccinuri din tulpini fierbinţi, altele din tulpini intermediare sau moi. Efectul imunologic al vaccinurilor utilizate practic nu se apreciază. Indicele care argumentează eficacitatea imunologică este lipsa apariţiei semnelor de boală in efectivele cu pui vaccinaţi.

Eficacitatea imunologică postvaccinală nu se examinează din unele considerente şi anume: preţurile înalte a chiturilor de diagnostic, posibilitatea financiară redusă a întreprinderilor avicole, interesul scăzut pentu imunizare al proprietarilor de păsări etc. Necătînd la efectuarea vaccinărilor, în efectivele de păsări frecvent au loc cazuri de apariţie a focarelor de boală, atît pe fonul imun, cît şi în efectivele de păsări nevaccinate. Important este să cunoaştem că puii trecuţi prin boală devin imunosupresivi şi rămîn în dezvoltare, deci diferă semnificativ în masa corporală comparativ cu puii sănătoşi, aceasta fiind mult mai joasă. Ei sînt mai receptivi către diferite boli infecţioase şi formează titre postvaccinale mai reduse.

În sectoarele particulare supravegherea şi imunoprofilaxia este mai dificilă. Aceasta poate fi argument din consideratul numărului mic de păsări în efective, lipsa ambalajului cu dozaj mic de vaccin, lipsa informaţiei despre importanţa şi nesesitatea vaccinărilor contra bolilor infecţioase. Bursita infecţioasă in unele cazuri evoluează cu simptome clinice caracteristice, în alte situaţii - necaracteristice. Acestea depind de mai mulţi factori dintre care mai importanţi sunt: virulenţa virusului, rezistenţa organizmului, condiţiile de alimentaţie şi întreţinere.

Scopul cercetărilor a fost de a stabili modificările morfopotologice şi histopatologice caracteristice la puii de găină bolnavi de bursita infecţioasă aviară.

MATERIAL ŞI METODĂ

Investigaţiile au fost efectuate într-un efectiv de pui ai întreprinderii individuale „Domodedova Tatiana“, care constituia 10 000 capete pui broiler cu vîrsta de 17 zile, hevaccinaţi contra bursitei infecţioase. S-au efectuat cercetări statistice, epizootologice, clinice, morfopatologice şi histologice. Cercetări necropsice s-au efectuat la 370 cadavre de pui din exploataţia respectivă, de la care ulterior s-au recoltat parţial bursele Fabricius pentru examenul histologic, folosind metoda clasică. Preparatele histologice au fost vopsite cu hematoxilin şi eozină şi examinate la microscopul biologic, imagine 10x40.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Examinările epizootologice şi macroscopice au fost efectuate în cadrul unităţii avicole şi la catedra de Epizootologie a facultăţii de Medicină Veterinară.

Din discuţiile cu proprietarii unităţii avicole s-a stabilit că efectivul de pui broiler n-a fost vaccinat contra bursitei infecţioase. Puii au fost întreţinuţi într-o încăpere animalieră acomodată, unde pe parcursul a mai multor ani nu s-au întreţinut animale şi pe parcursul a 2 ani s-au întreţinut pui broiler. În această perioadă vaccinarea puilor contra bursitei infecţioase nu s-a efectuat. Motivul nevaccinării a fost lipsa cazurilor de îmbolnăvire a puilor de boli infecţioase, lipsa informaţiei despre potenţialul pericol al acestei maladii pentru puii broiler.

Rezultatele investigaţiilor morfopatologice sînt prezentate în figurile 1-5.

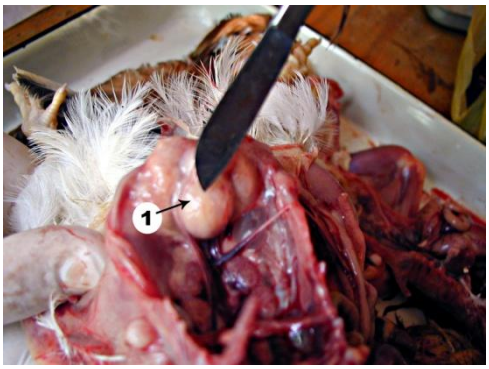


Fig. 1

Fig. 2

Figura 1 prezintă cadavrul unui pui broiler cu modificări patomorfologice caracteristice bursitei infecţioase aviare. În figura respectivă bursa Fabricius este bine evidenţiată, inflamată considerabil, majorată în volum de 5-7 ori (cifra 1), avînd o culoare roză-roşietică.

Figura 2 prezintă aspectul bursei Fabricius la secţiune. În interiorul bursei se găseşte un exudat purulent-sanguinulent. Ţesutul bursei Fabricius are o culoare roşie închisă, cu unele focare necrotice.

Figura 3 prezintă modificări mopfopatologice localizate la nivelul bursei Fabricius şi alte organe. Cifra 1 indică bursa Fabricius în secţiune unde este bine evidenţiată inflamaţia ţesutului bursal, acumulări de exudat purulent cu sînge. Cifra 2 indică rinichii care sînt hipertrofiaţi şi prezintă hemoragii punctiforme, cifra 3 indică hemoragii pe musculatura scheletică.

Unele din modificările morfopatologice specifice bursitei infecţioase sînt hemoragiile localizate pe musculatura scheletică.

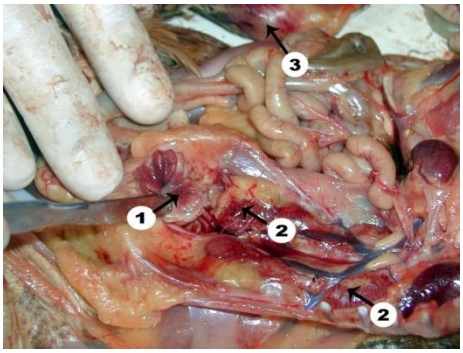


Fig. 3

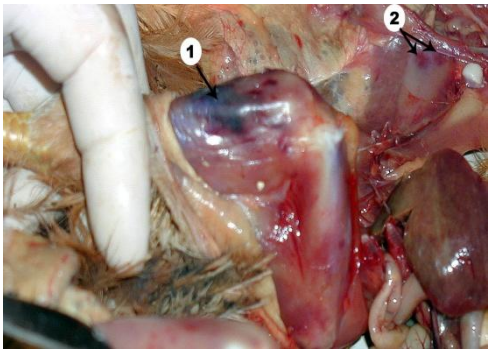


Fig. 4

Figura 4 prezintă hemoragii intense punctiforme şi în formă de peteşii localizate pe musculatura femurului (cifra 1) şi pe musculatura pectorală (cifra 2).

Modificări distructive profunde au fost observate la examenul histologic al ţesutului burselor Fabricius afectate.

Figura 5 prezintă în plan comparativ structura foliculilor limfoizi la puii clinic sănătoşi. Cifra 1 indică regiunea interfoliculară cu un lichid transparent, iar cifra 2 indică foliculii limfoizi activi cu un număr mare de limfocite, plazmocite.

Cifrele 6 şi 7 prezintă modificări structurale profunde ale foliculilor limfoizi. Cifra 1 din figura 6 indică seroasa bursei Fabricius, care este descvamată, sînt distruse şi celulele epiteliale cilindrice.

Cifra 2 indică foliculii limfoizi care conţin peste 95% limfocite distruse, celule plasmocitare. În unii foliculi limfoizi (cifra 4) se mai observă parţial celule limfoide neafectate.

In regiunea interfoliculară se observă acumulări de exudat sero-hemoragic. Aşa tip de modificări se observă la a 2-4 zi de boală. Ulterior la a 6-9 zi de boală are loc atrofia şi vacuolizarea foliculilor limfoizi (fig. 7, cifrele 1, 2) sau se observă numai unele porţiuni ale foliculilor limfoizi (fig. 7, cifrele 3, 4).

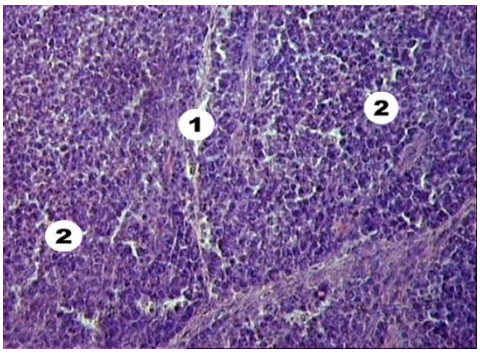


Fig. 5

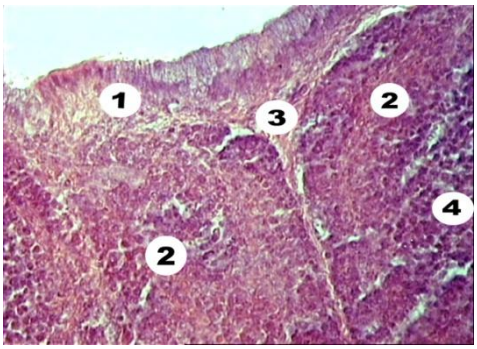


Fig. 6

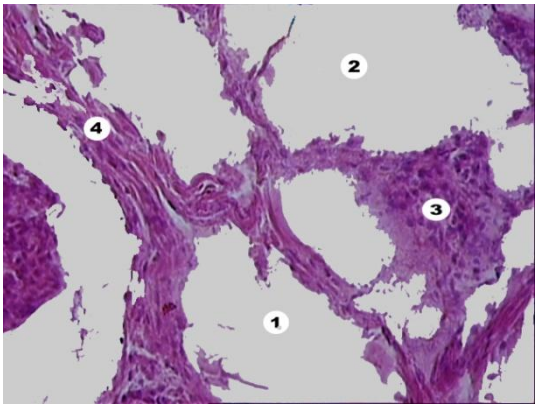


Fig. 7

CONCLUZII

1. 1.Virusul bursitei infecţioase aviare persistă permanent prin efectivele de păsări provocînd focare de boală în special la efectivele puilor nevaccinaţi.
2. În efectivele de pui nevaccinaţi boala evoluează cu modivicări morfopatologice caracteristice exprimate mai des prim inflamaţia bursei Fabricius, acumulări de exudat sero-sanguinulent, hemoragii pe musculatura scheletică şi rinichi.
3. Virusul bursitei infecţioase provoacă şi modificări profunde structurale în foliculii limfoizi exprimate prin distrugerea în masă a limfocitelor, acumulări de exudat sero-hemoragic în primele 3-4 zile de boală, iar peste 6-9 zile de la debutul bolii are loc atrofia şi vacuolizarea foliculilor limfoizi ai bursei Fabricius.

BIBLIOGRAFIE

1. Al-Natour MQ, Ward LA, Saif YM, Stewart-Brown B, Keck LD. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. Avian Dis. 2004 Jan-Mar.; 48(1):177-182.
2. Hudson JC, Hoerr EJ, Parker SH, Ewald SJ. Quantitative measures of disease in broiler breeder chicks of different major histocompatibility complex genotypes after challenge with infectious bursal disease virus. Trop Anim. Health Prod. 2004 Oct.;36(7):627-632
3. Mitra M, Pramanik AK, Bhattacharyya HM, Basak DK, Chatterjee A, Roy P. Spontaneous colibacillosis in infectious bursal disease-affected broiler flocks. Vet. Microbiol. 2003, Dec. 2; 97(1-2):153-165.
4. Müller H, Islam MR, Raue R. Research on infectious bursal disease – the past, the present and the future. University of Leipzig. Vet Rec. 2005 Dec. 17;157 (25):813-4.

SUPRAVEGHEREA TOXOPLASMOZEI LA PORCINE PRIN DETECTIA ANTICORPILOR DE TIP IgG, UTILIZAND TESTUL IMUNOENZIMATIC

SURVEILLANCE OF PORCINE TOXOPLASMOSIS THROUGH IGG TYPE ANTIBODIES DETECTION BY IMMUNOENZYMATIC TEST

ŞTIRBU-TEOFĂNESCU Beatrice[1], MILITARU D.[1], MILITARU Manuella[2], DIACONU Ioana[1]
[1]Institutul Pasteur, Bucureşti
[2]FMV Bucuresti

An ELISA kit was used in determination the sera levels of pigs antibodies against Toxoplasma gondii.. To capture and quantify specific antibodies an proteic antigen of Toxoplasma gondii, a peroxidase anti-pig IgG conjugate, an enzyme-specific substrate (H2O2) and a chromogen evidencing the antigen-antibody reaction (ABTS were used to test 265 samples of pig serum.

The results showed that 165 (62.264%) of samples tested were positives, 39 (14.716%) were negatives and 61 (23.018%) were dubious.The sensivity and specificity of the ELISA test compared with the indirect immunofluorescence test were 98.75% and 84.09% and the global correlation between these two tests was 95.58%.

Key words: Toxoplasma gondii, antibodies, ELISA, serodiagnosis.

Creşterea preciziei metodelor de diagnostic şi de supraveghere a bolilor la animale, inclusiv a toxoplasmozei porcine, constituie un deziderat al practicii veterinare actuale, aliniate la exigentele UE. Metoda imunoenzimatică, datorită sensibilităţii şi specificităţii sistemului analitic, avantajelor legate de costuri, durata de execuţie cat şi simplitatea tehnicii, răspunde acestui deziderat.

În aceasta lucrare sunt prezentate rezultatele cercetărilor vizând obtinerea reagenţilor (antigen, seruri martor, conjugat) şi aplicarea trusei obtinute in identificarea şi cuantificarea anticorpilor anti-*Toxoplasma gondii* din seruri provenite de la porcine din ferme.

MATERIAL ŞI METODĂ

Tulpina RH de *Toxoplasma gondii* (Institutul Pasteur, Bucureşti) s-a folosit la infestarea şoarecilor, dupa care s-a recoltat lichidul peritoneal cu elemente parazitare care a fost utilizat atât în tehnica de imunofluorescenţa indirectă (IFI), cât şi pentru prepararea antigenului din testul imunoenzimatic.

Tehnica IFI s-a bazat pe evidenţierea anticorpilor anti-*Toxoplasma gondii* din seruri de la porcine prin utilizarea unui conjugat fluorescent antispecie (IgG capra anti-IgG porc marcat cu izotiocianat de fluoresceină – Institutul Pasteur, Bucuresti).

Tehnica imunoenzimatică- trusa Eli-Tox-P (Institutul Pasteur, Bucuresti)

Antigen: pentru captarea şi cuantificarea anticorpilor specifici (de tip IgG) s-a utilizat un antigen solubil total obţinut din exsudatul peritoneal, cu parazitul sub formă de trofozoid, recoltat de la şoricei inoculaţi anterior cu tulpina RH de *Toxoplasma gondii.* Exsudatul peritoneal, reluat în tampon fosfat salin (PBS) 0,01M steril, pH 7,4 a fost filtrat, iar suspensia parazitară obţinută a fost prelucrată prin 3 cicluri de îngheţare-dezgheţare, urmate de ultrasonicare de 10 ori, 30sec./ciclu. Ultrasonicatul a fost centrifugat la 10 000 rpm, 40 minute la 4°C şi s-a recoltat supernatantul (antigenul solubil total).

În etapa de peliculizare au fost utilizate microplăci de polistiren (Nunc, Maxisorp). Antigenul a fost diluat 10 µg/ml în NaOH 0,1N şi adăugat câte 100 µl/godeu. După incubare o ora la 37 ^{o}C, plăcile au fost spălate de trei ori cu PBS 0,01M cu 0,05% Tween 20 (PBS/Tween).

Seruri de referinţă:

- serurile de referinţă pozitive cu calităţi de reagenţi ELISA au fost obţinute de la porcine diagnosticate prin IFI ca fiind pozitive;
- serurile de referinţă negative au fost obţinute de la porcine negative serologic faţă de *Toxoplasma gondii* (IFI).

Probele de ser de testat au fost diluate 1/400 in PBS/Tween cu 1% albumină serică bovină (BSA), adăugate pe placă (câte 100 μl/godeu) şi incubate 60 minute la 37 °C. După incubare, placa s-a spalat de 3 ori ca mai sus.

Conjugat: a fost utilizat un conjugat IgG capra anti-IgG porc marcat cu peroxidază (prin metoda periodat) preparat în Institutul Pasteur. Conjugatul a fost diluat in PBS/Tween cu 1% BSA şi adăugat câte 100 μl/godeu. După incubare timp de 60 minute la 37 °C, plăcile au fost spalate de trei ori cu PBS/Tween.

Substrat: conţine 0,05% perhidrol (H_2O_2) şi 0,6 mg/ml 2,2 azino-di-(3-etil-benztiazolin-sulfat) (ABTS) în tampon citrat 2,3%, pH 4,5. Se pipetează câte 100 μl substrat/godeu, iar dupa 30 minute reacţia a fost stopată cu 50 μl/godeu fluorură de sodiu 1,5%. Citirea densităţii optice s-a realizat la un spectrofotometru pentru plăci, Multiskan (Labsystem), la 405 nm.

Interpretarea reacţiei: s-a realizat în raport cu serurile martor de reacţie (pozitiv şi negativ), prin calcularea, pentru fiecare probă de ser testată, a raportului S/P (DO_{proba}-DO_N)/ (DO_P – DO_N).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Au fost preparate şi caracterizate antigenele *Toxoplasma gondii* care au fost utilizate la captusirea microplacilor ELISA. Dupa captusire, placile ELISA au fost spalate cu PBS cu Tween 20, stabilizate si uscate la 30°C, timp de 90 minute.

Au fost testate 265 seruri porcine, grupate pe 7 loturi, seruri provenite de la animale din ferme de crestere a porcilor, cu probleme de reproductie (in special avorturi), iar reactia a fost interpretata in raport cu valorile densitatilor optice ale serurilor martor (pozitiv si negative) de reactie.

Condiţiile de validare a testului ELISA au fost :

- valoarea DO a serului martor negativ mai mică de 0,200;
- valoarea DO a serului martor pozitiv mai mare de 0,800.

Serurile martor de reacţie, pozitiv şi negativ au prezentat urmatoărele valori medii ale DO :

$\overline{DO}_{\text{ser martor pozitiv}}$ x 1000 = 1443

$\overline{DO}_{\text{ser martor negativ}}$ **x 1000 = 75**

Criteriile de interpretare a rezultatelor testului ELISA în funcţie de valori ale raportului de pozitivitate, sunt prezentate în tabelul de mai jos (tabel 1):

Tabelul 1: Criteriile de interpretare a rezultatelor în funcţie de valorile raportului de pozitivitate (S/P)

Valori S/P	***S/P < 0,15***	Negativ
	0,15< S/P < 0,25	Dubios (suspect)
	S/P ≥ 0,25	Pozitiv

Din cele 265 seruri testate, 165 au fost pozitive (62,264%), 39 au fost negative (14,716%) şi 61dubioase (23,018%) (tabel 2).

Tabelul 2: Rezultate testare seruri porci prin ELISA anticorpi anti-Toxoplasma gondii

Ferma/ Unitate	**Nr. Probe**	**Probe pozitive**		**Probe negative**		**Probe dubioase**	
		Nr.	**%**	**Nr.**	**%**	**Nr.**	**%**
1	40	32	80	0	0	8	20
2	40	35	87,5	0	0	5	12,5
3	30	25	83,33	0	0	5	16,67
4	60	40	66,66	3	5	17	28,34
5	15	13	86,66	2	13,34	0	0
6	35	8	22,85	23	65,71	4	11,44
7	45	12	26,66	11	24,44	22	48,9
Total	**265**	**165**	**62,264**	**39**	**14,716**	**61**	**23,018**

Cu ajutorul datelor obţinute în urma testării, s-a reprezentat grafic ponderea de seruri pozitive/negative pe fiecare unitate în parte (fig. 1).

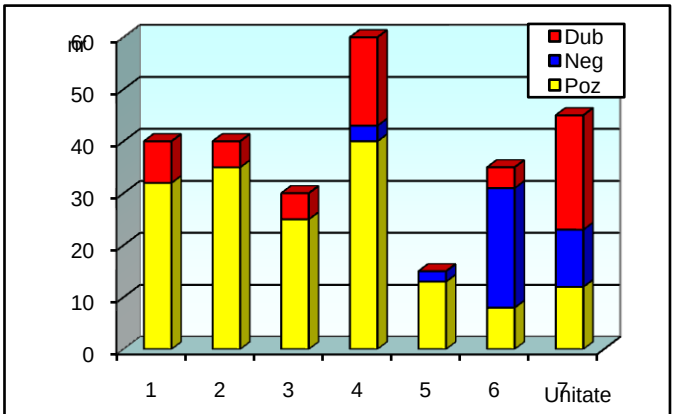


Fig. 1: Reprezentarea grafică a rezultatelor testării de seruri porcine- detecţie anticorpi IgG anti-Toxoplasma gondii

Serurile pozitive ELISA (165 probe) şi negative ELISA (39 probe) au fost testate şi prin imunofluorescenţă indirectă (test comparative) si au fost calculate parametrii testului ELISA.

Tabel 3: Calcularea sensibilităţii şi specificităţii pentru tehnica ELISA

		IFI	
		Pozitive (160 probe)	Negative (44 probe)
ELISA	Pozitive	158	7
	Negative	2	37

Aplicând formulele de calcul a sensibilitatii, specificitatii si corelatiei globale, s-au obţinut :

- Sensibilitate : 98,75 % ;
- Specificitate : 84,09% ;
- Corelaţia globală : 95,58%.

CONCLUZII

1. S-au obţinut reagenţii necesari testului ELISA (antigen, seruri martor, conjugat imunoenzimatic) şi IFI (antigen, conjugat fluorescent) pentru toxoplasmoza porcina si s-a calibrat si omologat trusa ELISA de detectie a anitocrpilor IgG anti-Toxoplasma gondii din seruri porcine.
2. Testul ELISA a fost utilizat pentru evaluarea nivelului de anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* din 265 de seruri din teren.
3. Sensibilitatea şi specificitatea testului ELISA, comparativ cu IFI, au fost 98,75% şi respectiv 84,09%, iar corelatia globala între cele două teste a fost de 95,58%.
4. Metoda ELISA elaborată cu această ocazie a stat la baza conceperii şi omologării unei truse de monitorizare a anticorpilor anti-*Toxoplasma gondii*, trusa omologata, ce poate fi utilizată într-un program de supraveghere a toxoplasmozei.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Acha, P.N., Szyfres, B**., **1989:** Zoonoses et maladies transmissibles communes a l'homme et aux animaux, Office International des Epizooties, 1989, 677-691.
2. **Feţeanu, A.,** Anticorpi marcaţi în biologie şi medicină, Editura Ceres, Bucureşti, 1973.
3. **Lin,D.-S., Su, W.-L., 1997:** Comparison of four diagnostic techniques for detecting *Toxoplasma gondii* infection in cats, dogs and humans, *Acta Zoologica Taiwanica*, 1997, vol. 8, nr. 1, 3-13.
4. **Ştirbu-Teofănescu Beatrice, Amzuţă Andreia, Comârzan Ana Maria, Militaru D., 2005:** Cercetări privind diagnosticul serologic prin ELISA în toxoplasmoza la ovine, Lucrări Ştiinţifice Simpozion USAMV a Banatului, Timişoara, Medicină Veterinară, Vol XXXVIII, 647-652, ISSN 1221-5295;
5. **Beatrice Ştirbu-Teofănescu, D. Militaru, Manuella Militaru, Emilia Ciobotaru, C. Ciocioi, 2007**: Cuantificarea anticorpilor de tip IgG anti-Toxoplasma gondii din seruri de la porcine, Revista Romana de Parazitologie, vol. XVII, nr. 1, 27-32, ISSN 1221-1796;
6. **Dinescu Georgeta, Emilia Ciobotaru, Manuella Militaru, Dumitru Militaru, Beatrice Stirbu-Teofanescu, Mara Nicolaescu, 2007**: Role of cytological investigation in identification of hepatopathies and infection with Toxoplasma gondii in abattoir slaughtered swine, Proceedings of the 25th Annual Meeting of European Society of Veterinary Pathology, Munich, Germany, 29 August-1 September 2007, 79;
7. **Beatrice-Maria Stirbu-Teofanescu, D. Militaru, Ioana Diaconu, E. Bucur, 2007:** Detectia parazitului Toxoplasma gondii in probe biologice prin imunofluorescenta, Conferinta Nationala de Parazitologie, Mamaia 8-10 noiembrie 2007, Revista Romana de Parazitologie, vol. XVII, supliment, 176.

CERCETĂRI PRIVIND VACCINAREA CU VACCIN INACTIVAT MIPRAVAC ÎN EFECTIVE DE GĂINI DE REPRODUCŢIE

RESEARCHES REGARDING VACCINATION WITH INACTIVATED VACCINE MIPRAVAC IN REPRODUCTION POULTRY EFFECTIVE

STREJA Adriana[1], CARP-CĂRARE M.[2]
[1]D.S.V. Bacău
[2]FMV Iaşi

Avian mycoplasmosis is an infectious disease of poultry, caused by Mycoplasma gallisepticum, caracterised by severe breathing disorders, progressive loss of weight, decrease in egg production. In our country the disease was confirmed for the first time in 1958, after chicken import from Canada. Today it is widely spread in the farms and facilities from the intensive breeding sistem.

The economic importance of the disease is high, allthough the death rate is moderate. The economic damages occur due to progressive loss of weight in avian youth, the decreaseased conversion factor in feed, decrease in egg production and meat, reduced fertility and hatching procentage, quallity decrease of the meat and the need to apply therapeutical treatments which are expensive, take long to do and have limited usage due to the fact that it is a necessity procedure or a method of prevention which in either cases does not solv the primary issue.

Infections with Mycoplasma continue to be a major problem of avian pathology even when prevention methods have been applied rigurously, mycoplasmosis control in avian units beeing a essential management factor. Even in countries where poultry rases suffered a high degree of specialization, there are cronic areas of infection with one or more pathogen mycoplasms.

The best results in treating this disease occur upon succes in maintaining the reproduction section in a low level of exposure to the Mycoplasma gallisepticum. The vaccination of poultry is an essential measure in controling the exposure. This can be done using either inactivated vaccines or live vaccines.

This study plans to evaluate the results obtained from vaccinating the heavy race reproducting Ross 308 chickens with inactivated Mipravac.

Micoplasmoza respiratorie aviară, este o boală infecţioasă a galinaceelor, produsă de *Mycoplasma gallisepticum*, caracterizată prin tulburări respiratorii grave, slăbire progresivă, scăderea producţiei de ouă. În ţara noastră boala a fost confirmată prima dată în 1958, după importul de pui din Canada. Astăzi este foarte răspândită în complexele sau fermele avicole din sistemul intensiv de creştere.

Importanţa economică a bolii este mare, deşi mortalitatea este moderată. Pagubele economice sunt datorită slăbirii progresive a tineretului aviar, factorului de conversie a furajului scăzut, scăderii producţiei de ouă şi carne, procentului redus de fertilitate şi ecloziune, deprecierii calitative a cărnii şi necesitatea aplicării tratamentelor terapeutice costisitoare şi de lungă durată, cu valoare limitată de folosire, fiind doar o procedură de necesitate sau profilaxie ce nu rezolvă problema de bază.

Infecţiile cu *Mycoplasma* continuă să fie o problemă majoră de patologie aviară, chiar acolo unde măsurile de profilaxie au fost aplicate riguros, controlul micoplasmozei în unităţile avicole fiind un factor de management esenţial. Chiar în ţările unde rasele de găini au cunoscut o specializare foarte mare, există rezervoare cronice de infecţie cu una sau mai multe micoplasme patogene.

Cele mai bune rezultate în combaterea acestei boli, constau în reuşita menţinerii efectivelor de reproducţie la un nivel scăzut al incidenţei infecţiei cu *Mycoplasma gallisepticum*. Vaccinarea efectivelor de păsări este o opţiune esenţială pentru controlul incidenţei infecţiei. Aceasta se poate realiza utilizând fie vaccinuri inactivate fie vaccinuri vii cu tulpini atenuate.

Prezentul studiu îşi propune să evalueze rezultatele obţinute în urma vaccinării efectivelor de găini de reproducţie, rase grele Ross 308 cu vaccin inactivat Mipravac.

MATERIAL ŞI METODĂ

Vaccinarea contra micoplasmozei aviare s-a aplicat în 2 ferme de reproducţie, tineret rase grele Ross 308, după cum urmează:

Primul efectiv vaccinat cu Mipravac a fost în număr de 60500 pui de găină părinţi, cazat în ferma nr. 2, care au fost transferaţi pentru producţie, în ferma de adulte nr.18. Vaccinarea a-I-a s-a efectuat la vârsta de 51 de zile, administrarea făcându-se i.m., în musculatura pectorală, cu doza de 0,5 ml vaccin, a –II-a vaccinare efectuându-se la vârsta de 120 de zile, înainte de transfer i.m., în musculatura pectorală, cu doza de 0,5 ml vaccin. S-au utilizat pentru vaccinare seringi automate sterilizate, cu ace sterilizate.

Al doilea efectiv vaccinat cu vaccin inactivat Mipravac a fost în număr de 58600 de pui de găină părinţi, cazat în ferma numărul 2, care au fost transferaţi pentru producţie în ferma de adulte nr 21. Schema de vaccinare aplicată a fost identică cu cea efectuată la prima serie, în aceleaşi condiţii sanitar veterinare.

Vaccinul utilizat este inactivat, care are ca antigene *Mycoplasma gallisepticum* inactivat ($\geq 2{,}5 \times 10^9$cfu), iar ca adjuvant marcol-52830, polysorbate-80, PEG-8 dioleate, sorbitan, thimerosal.

Metodele prin care s-a verificat eficienţa vaccinării sunt:

- examenele clinice şi anatomopatologice efectuate atât în fermele vaccinate cât şi în femele de broiler (pui de carne) obţinut din fermele nr.18 şi 21, pe toată perioada de producţie. Au fost efectuate un număr de 11350 de necropsii;
- embrioteste efectuate în staţiile de incubaţie Popas şi Brad pe embrioni rămaşi în coajă la termen şi pe pui neviabili.
  Au fost efectuate un număr de 2560 embrioteste;
- testări serologice efectuate pe probe de sânge recoltate atât de la găinile vaccinate cât şi de la broiler.

Recoltările de sânge s-au efectuat atât pe paper-stripsuri cât şi în vacutainere. S-a efectuat testul imunoenzimatic Elisa în laboratorul Lohmann din Germania, Babolna din Ungaria şi Inst.Pasteur. Au fost trimise pentru confirmarea diagnosticului cadavre la Institutul Pasteur din Bucuresti.

Testul imunoenzimatic Elisa are ca scop detectarea anticorpilor anti-*Mycoplasma gallisepticum* din serurile de pasăre.

Modul de lucru este următorul:

- plăcile de reacţie sunt căptuşite cu antigen inactivat; se adaugă serurile diluate 1:401 şi se incubează la temperatura de 20-30ºC timp de 30 min. Anticorpii anti-*Mycoplasma gallisepticum* prezenţi în ser se vor lega de antigenele din placă, formând un complex antigen-anticorp.
- se îndepărtează prin spălarea plăcilor de 3 ori cu 300µ soluţie de spălare/godeu, elementele nelegate.
- se adaugă 100µ Ig G antipasăre conjugată cu fosfataza alcalină. Se incubează 30min la temperatura camerei, apoi se repetă procedura de spălare.
- se adaugă substratul enzimatic 100µ care va reacţiona cu fosfataza alcalină prezentă şi va forma un produs de reacţie galben. În etapa finală se stopează reacţia enzimatică adăugând 100µ soluţie de stopare. Intensitatea culorii se măsoară spectrofotometric la 405 - 410 nm. Citirea trebuie să se facă imediat după adăugarea soluţiei de stopare.

Calcularea rezultatelor se face după următoarea formulă:

$$(DO_{probă} - DO_{BL})/(DO_{CALIBR.} - DO_{BL}) \times 100 = (UE)_{probă}$$

$DO_{probă}$ - media absorbanţelor probelor
DO_{BL} - media absorbanţeor blankului
$DO_{CALIBR.}$ - valoarea calibratorului

Interpretarea rezultatelor: < 5 UE - negativ,
> 5 UE - moderat pozitiv,
> 25 UE - puternic pozitiv.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Examenele clinice şi anatomopatologice efectuate în ferma nr.18 (prima serie de părinţi vaccinată) nu indicau prezenţa infecţiei cu *Mycoplasma gallisepticum* în efectiv. S-au recoltat 60

probe de sânge pentru examen imunoenzimatic Elisa. Găinile aveau vârsta de 29 de săptămâni. Rezultatul a fost următorul: toate probele au fost pozitive. Au fost detectaţi anticorpi anti-*Mycoplasma gallisepticum* în procent 100% la găinile testate.

Cu toate acestea embriotestele efectuate în staţiile de incubaţie în toată perioada de producţie a găinilor indicau o scădere a transmisibilităţii pe verticală a micoplasmei cu 2-3%, faţă de perioada când nu se vaccina. S-au efectuat un număr de 2560 de embrioteste pe embrionii rămaşi în coajă şi pui neviabili. Procentul de transmitere prin ou scăzuse de la 5-7% la 3-4 %. (tabelul nr.1)

Tabel nr.1 Rezultatele embriotestelor efectuate in staţiile de incubaţie pe broiler provenit din prima serie vaccinată comparativ cu broiler din ferme nevaccinate

Broiler provenit din efectiv vaccinate	Nr. probe	Aerosaculite		Alte cauze		Broiler provenit. din efectiv nevaccinat	Nr. probe	Aerosaculite		Alte cauze		Diferenţe %
		Nr.	%	Nr.	%			Nr.	%	Nr.	%	
Embrioni rămaşi în coajă	745	23	3	722	97	Embrioni rămaşi în coajă	920	46	5	874	95	-2
Pui neviabili	610	25	4	585	96	Pui neviabili	1100	77	7	1023	93	-3

Examenele anatomopatologice efectuate pe cadavre de pui broiler proveniţi din aceiaşi fermă, indicau o scădere a leziunilor produse de *Mycoplasma gallisepticum*. Din totalul pierderilor prin mortalitate, procentul de pierderi datorate micoplasmozei aviare scăzuse cu aproximativ 20 %. Starea de sănătate a broilerului se îmbunătăţise, consumul de furaj, de asemenea, calitatea carcasei în abator crescuse. Toate aceste îmbunătăţiri ne-au încurajat să continuăm strategia aplicată până acum.

Broilerul provenit din a doua serie vaccinată, a avut performanţe mai slabe decât broilerul provenit din prima serie. Din totalul pierderilor prin mortalitate de aproximativ 4%, procentul de pierderi datorate micoplasmozei crescut cu până la 80-85 %, faţă de 60-70 %, cât fusese la prima serie. Din punct de vedere anatomopatologic, erau frecvent întâlnite leziuni de aerosaculită fibrino-cazeoasă în sacii aerieni toracali, cervicali şi abdominali. De asemenea erau întâlnite frecvent dopuri fibrino-cazeoase localizate în trahee, la ramificaţia bronhiilor. La acestea se adaugă congestia mucoasei traheale care era îngroşată, acoperită cu exudat mucos, mucofibrinos sau fibrinocazeos (tabelul nr.2).

Din punct de vedere clinic, puii întârziau în dezvoltare, respirau cu ciocul deschis, dispneică. Era prezent jetajul seromucos, strănutul şi raluri umede la nivelul traheii.

Tabel nr.2 Rezultatele examenelor anatomopatologice efectuate pe pui broiler proveniti din prima şi a doua serie vaccinată,comparativ cu pui broiler provenit din efective nevaccinate

Cat. de prod	Vârsta /zile	Origine	Nr. cadavre	Prezentarea leziunilor								
				Aerosaculită fibrinocaz.		Dopuri traheale		Opacifieri saci aerieni		Poliserozită fibr-caz.		Total leziuni
				Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	%
Pc	28	Fn	620	112	18	99	16	143	23	154	25	82
Pc	25	Fn	745	141	19	127	17	194	26	171	23	85
Pc	26	Fn	812	179	22	105	13	195	24	211	26	85
Pc	26	Fn	640	134	21	115	18	147	23	135	21	83
Pc	28	Fv1	596	89	15	83	14	95	16	90	15	60
Pc	27	Fv1	628	113	18	101	16	119	19	107	17	70
Pc	29	Fv1	722	116	16	94	13	130	18	122	17	64
Pc	32	Fv1	598	90	15	125	12	102	17	107	18	62
Pc	27	Fv2	890	187	21	125	14	231	26	214	24	85
Pc	25	Fv2	655	144	22	105	16	157	24	118	18	80
Pc	28	Fv2	692	166	24	132	19	152	22	138	20	85

Legendă: Pc-pui carne
Fn - fermă nevaccinată
Fv1-prima serie vaccinată
Fv2-a doua serie vaccinată

Trebuie menţionat faptul că, înainte de a începe vaccinarea contra micoplasmozei aviare, efectivele de tineret de reproducţie, rase grele Ross308, au fost testate serologic, prin reacţia de

seroaglutinare rapidă pe lamă şi testul imunoenzimatic Elisa. Rezultatele indicau prezenţa infecţiei cu *Mycoplasma gallisepticum*. Efectivele au fost seropozitive.

Distanţa dintre cele 2 ferme de reproducţie (F18şiF21) era mai mică de 100 metri. În momentul când s-a introdus efectivul de tineret vaccinat în ferma nr.21, păsările din F18 aveau 55-56 de săptămâni. Riscul de a se transmite infecţia pe calea aerului era foarte mare, iar presiunea infecţioasă în acest habitat crescuse.

Răspunsul imun postvaccinal obţinut în urma vaccinării cu vaccin inactivat este de tip umoral. Drept urmare, nu sunt blocaţi receptorii naturali, calea respiratorie rămânând o cale deschisă de contaminare a păsărilor cu *Mycoplasma gallisepticum*. Păsările vaccinate nu dezvoltă boala ca adulte, infecţia evoluează inaparent, fără semne clinice, însă transmit micoplasma pe verticală. Aceste ferme sunt o sursă sigură de infecţie pentru broiler. Odată infectată populaţia de păsări aceasta trebuie considerată infectată pe viaţă .

CONCLUZII

1. Vaccinul inactivat Mipravac poate fi folosit pentru a reduce incidenţa bolii, dar acesta nu poate opri infectarea păsărilor vaccinate. Populaţia de părinte este în pericol de infectare ,,tăcută'', rămânând o sursă sigură de infecţie pentru broiler.
2. Imunitatea obţinută în urma vaccinării cu Mipravac este de tip umoral. Păsările vaccinate transmit anticorpi maternali la progeni, care pot persista până la vârsta de 20 de zile, însă în acelaşi timp poate transmite şi mycoplasma.
3. Vaccinul este sigur, nu există riscul transmiterii pe verticală sau orizontală, acesta fiind inactivat .
4. Se pot vaccina cu vaccin Mipravac şi efectivele pozitive serologic neexistând riscul de a acţiona ca o suprainfecţie adăugată.
5. Vaccinul produce seroconversie, deci nu se pot monitoriza efectivele prin teste de seroaglutinare, nefiind posibilă diferenţierea între puii vaccinati şi cei infectaţi cu tulpini sălbatice de *Mycoplasma gallisepticum*.
6. Aplicarea vaccinului inactivat Mipravac este o soluţie bună pentru combaterea bolii în efectivele cu incidenţă scăzută la infecţia cu *Mycoplasma gallisepticum*; nu este o soluţie pentru efectivele intens contaminate, cu risc crescut de contaminare pe orizontală.
7. Când se concep programele de vaccinare, este absolut necesar să se cunoască situaţia serologică şi epidemilogică a populaţiei de părinţi ce urmează a fi vaccinaţi.

BIBLIOGRAFIE

1. **Butcher G D**,**DVM,PHD** (2002) Nutriţia managementul şi controlul bolilor la păsări. American Soybean Association ,Facultatea de medicnă veterinară, Universitatea din Florida 15-21
2. **Caputa CA ,Mohammad Newman JA(1999)** Interactions of *Mycoplasma gallisepticum* with the chicken traheal epithelium .Elsevier Science Publishers B.V Amsterdam .22-49
3. **Carp Cărare M.,Timofte Dorina** (2002) Imunologie şi imunopatologie,Ed.Venus Iaşi 247-259
4. **Cătoi Cornel** (2003) Diagnostic Necropsic Veterinar,Ed.Academicpres,390-392
5. **David H.Ley,Judith M .McLaren,Andrea M. Miles**,(1997) Transmissibility of live Mycoplasma gallisepticum .Avian Disesases 41:187
6. **Paul I**.,(1996) Etiomorfopatologie veterinară.Ed.ALL,Bucureşti
7. **Perianu T**.,(2004) Boli infectioase ale animalelor ,Bacterioze,vol I .530-
8. **Pierre-Marie Borne,Sylvain Comte** (2006) Vaccines and Vaccination in Poultry Production ,Ceva Sante Animale 58-72
9. **Yoder,H.W.Jr.(**1990) Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology.5th ed.G.R.Carter ,and J.R.Cole, Jr.,eds. Academic Press, San Diego ,California, 334-341
10. **Yoder,H.W.Jr. ,S.R Hopkins and B.W. Mitchell (**1984) Evaluation of inactivated Mycoplasma gallisepticum oil emulsion bacteriens for protection against airsacculitis in broilers .Avian Diseases 28:224-234
11. **Ross Tech** Avian Mycoplasmosis (2004,)Aviagen Limited Newbridge Midlothian Scotland , 1-6
12. **Shalash Ali** (1984) Contribuţii la studiul micoplasmozelor aviare .Teza de doctorat ,Iasi 30-57

IMPACTUL ECONOMIC AL SINDROMULUI RESPIRATOR ŞI DE REPRODUCŢIE ÎN CREŞTEREA SUINELOR

PRRS ECONOMIC IMPACT IN INTENSIVE BREADING SWINE HEARDS

TĂNASE Irina-Oana, PAVLI C., PERIANU T.
FMV Iaşi
tanase_oana@yahoo.com

We analyzed the main economic parameters before and after the emergence of PRRS in two breeding swine herds.

The investigations showed a decreased growth rate in piglets, the decrease of the fodder conversion parameter, the modification of the reproductive parameters, the growth of the morbidity and mortality and the economic impact of these parameters.

Exploatarea suinelor este într-o permanentă competiţie cu speciile de animale, pentru continua îmbunătăţire a calităţii şi reducerea costului cărnii, deoarece, în economia de piaţă se urmăreşte obţinerea unui profit brut şi substanţial.

Dintre bolile infecţioase cu implicaţii în creşterea suinelor, sindromul respirator şi de reproducţie ocupă un loc important în înregistrarea pierderilor economice, prin modificarea parametrilor de reproducţie, scăderea indecelui de conversie a furajelor, scăderea ratei de creştere a purceilor.

În lucrare, s-a analizat impactul economic pe care îl determină sindromul respirator şi de reproducţie, în unităţile de creştere a suinelor şi măsurile necesare micşorării pierderilor.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările au fost întreprinse în două unităţi de creştere intensivă a suinelor, unde se practică însămânţarea artificială a scroafelor. În ambele unităţi, s-au analizat comparativ, înaintea apariţiei şi după evoluţia sindromului respirator şi de reproducţie, principalii parametri economici reprezentaţi de: rata de creştere a purceilor, indicele de conversie a furajelor, parametri de reproducţie (natalitate, fertilitate, prolificitate) la scroafe, morbiditatea şi mortalitatea..

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În aprecierea participării infecţiei virale a PRRS asupra unor indicatori din sfera reproducţiei (natalitate, fertilitate, prolificitate) şi a pierderilor prin mortalitate, s-au luat în considerare datele monitorizate de unitate înainte, în perioada de evoluţie a bolii şi după, **(tabelul nr. 1)**.

Tabelul 1 Evoluţia indicilor natalităţii, întoarcerilor şi prolificităţii

Perioada	Luni	Natalitate	Întoarceri%	Prolificitate
Înainte de apariţia virusului	Ianuarie	68,8	-	9
	Februarie	71	-	8,9
	Martie	66,6	-	8,7
	Media	**68,8**	**-**	**8.86**
Perioada evoluţiei virusului	Aprilie	66,3	20	9,1
	Mai	65,9	19,5	8,5
	Iunie	65,7	19,7	8,4
	Iulie	65,5	18,8	8,7
	August	61,0	18,0	8,4
	Septembrie	61,2	20,0	6,4
	Octombrie	61,0	21,3	7,3
	Noembrie	55,5	23,0	7,2
	Decembrie	55,5	23,0	7,1
	Ianuarie	61,4	22,9	7,3
	Media	**61,9**	**20,62**	**7,84**

Din analiza datelor privind natalitatea a reieşit că anterior evoluţiei P.R.R.S., s-a înregistrat o natalitate medie de 68,8% cu minime şi maxime variind între 66,6-71,0%. În

perioada evoluției PRRS media a fost de 61,9% cu variații între 55,5% şi 66,3%, valori inferioare celor înregistrate anterior evoluției bolii.

Cât priveşte procentul de întoarceri, s-au înregistrat valori superioare în perioada evoluției bolii (20,62%).

De la data diagnosticul P.R.R.S. în unitate s-a constatat o reducere a procentului de natalitate (61,9%), a indicelui de prolificitate (7,84) şi o creştere a procentului de scroafe întoarse după montă, (20,62%).

Apariția şi evoluția sindromului P.R.R.S. a determinat un cadru patologic nou, iar pierderile prin mortalitate au crescut la toate categoriile şi în special la purceii sugari. La această categorie, mortalitatea în luna septembrie a înregistrat 49,24%, în octombrie 31,7%, ca după aceea să scadă până la 12,9%. La tineret mortalitatea a înregistrat o creştere începând cu luna septembrie (20,3%), s-a menținut în platou în lunile octombrie şi noiembrie (35-38%) cu un vârf maxim în luna decembrie (42,6%). La porcii graşi, comparativ cu lunile anterioare, mortalitatea a crescut începând cu luna septembrie (13,9%), cu scăderi nesemnificative în lunile următoare.

Exprimată în cifre absolute, mortalitatea a variat la purceii sugari de la 14.104 (luna a X-a) la aproximativ 3000 (luna I, anul următor), la tineret de la 11.199 (luna a XII-a) la 5.700 (luna I, anul următor), iar la porcii graşi de la 3.979 (luna a IX-a) la 1.227 (luna I, anul următor).

Totalul pierderilor pe unitate începând cu luna a IX-a, indiferent dacă acestea sunt prezentate procentual sau în cifre absolute, depăşesc de 3-4 ori pe cele înregistrate în primele 8 luni ale anului.

Din analiza datelor comparative privind sporul mediu zilnic la cele trei categorii de animale, după evoluția P.R.R.S. se constată o scădere cu 16 g la tineret şi 52 g la porcii graşi (**tabelul 2**).

Datorită afecțiunilor respiratorii, atingerea greutății de 95 kg, este întârziată cu până la 30 zile, iar mortalitatea de la înțărcare la sacrificare creşte cu 10-15%.

Pierderile directe datorate evoluției P.R.R.S. au fost evaluate la scroafe între 50-250 euro pe scroafă şi o pierdere de aproximativ 900 de euro pentru 100 scroafe de reproducție şi 4500 euro pierderi datorate conversiei furajelor.

De asemenea, performanțele de reproducție au revenit la normal după 3-5 luni (procentul de scroafe gestante la primul estru, rata de purcei fătați morți, indicele de natalitate).

Tabelul 2 Situația sporului mediu zilnic pe categorii de animale

Categoria de animale	**Media**	
	Pre-infecție	**Post-infecție**
Purcei sugari	156 g	151,8g
Tineret	355,1 g	339,1g
Porci graşi	580,4 g	528,4g

În funcție de categoria de animale afectată de P.R.R.S., pentru micşorarea pierderilor s-au aplicat am elaborat două tipuri de măsuri de eradicare:

a) eradicarea prin depopularea secvențială a adăposturilor post înțărcare. Bazată pe depopularea secvențială a adăposturilor post înțărcare, eliminarea şi deplasarea acestor porci în afara fermei, spălarea şi decontaminarea adăposturilor şi un vid sanitar de 14 zile, a permis eradicarea infecției.

Deşi virusul PRRS nu poate fi întotdeauna eliminat, metoda a permis reducerea presiunii microbiene. Ameliorarea a fost evidentă în ceea ce priveşte diminuarea mortalității la purceii înțărcați (de la 17% la 2-3%), creşterea numărului de porci comercializați şi diminuarea cheltuielilor veterinare (în principal antibioticele).

b) înţărcarea precoce, cu trasfer în alte adăposturi. Purceii în vârstă de 14-21 de zile au fost transferaţi în adăposturi separate, ceea ce a întrerupt ciclul de infecţie întreţinut prin contactul cu purceii mai în vârstă. Neexistând un ciclu de infecţie între mame şi purceii lor, animalele transferate au rămas indemne.

S-a demonstrat că este posibilă eliminarea progresivă a virusului şi fără depopulare, prin măsuri simpleca: interzicerea amestecului de purcei provenind de la scroafe diferite; respectarea principiului totul plin-totul gol la toate nivelurile de producţie; eliminarea porcilor subdezvoltaţi (minus variantele) şi bolnavi.

Indiferent de strategia de eradicare aplicată, considerăm că, pentru a asigura cele mai mari şanse de succes trebuiesc respectate cel puţin următoarele reguli minime:

- - intervenţiile să se facă timp de cel puţin 6 luni după infecţia iniţială, când imunitatea animalelor s-a instalat; introducerea de animale indemne numai după faza acută poate ajuta la limitatea circulaţiei virusului;
- - verificarea şi obţinerea unui profil serologic în fermă, care să ateste că virusul nu circulă printre reproducători;
- - determinarea, prin acelaşi profil serologic, a categoriei de porci care întreţine circulaţia virusului în unitate;
- - depopularea adăposturilor în care se găsesc animalele care întreţin circulaţia virală, cu spălarea şi decontaminarea acestora;
- - adoptarea unui sistem de creştere „în bandă”, limitând la minim amestecurile de animale;
- - respectarea tuturor regulilor de creştere, în special a celor de igienă.

CONCLUZII

Investigaţiile privind impactul economic al sindromului respirator şi de reproducţie în două unităţi de creşterea suinelor, au dus la desprinderea următoarelor concluzii:

1. Pierderile suplimentare înregistrate în perioada post infecţie PRRS, comparativ cu lunile anterioare evoluţiei bolii, au avut drept cauză principală acţiunea virusului, singur sau în asociaţie cu alţi germeni microbieni;
2. Valorilor procentuale privind natalitatea anterior diagnosticului P.R.R.S., a înregistrat o medie de 68,8% cu minime şi maxime între 66,6-71,0%.
3. În timpul evoluţiei PRRS media natalităţii a fost de 61,9% cu variaţii între 55,5% şi 66,3%, valori inferioare celor înregistrate anterior evoluţiei bolii.
4. La tineret mortalitatea a înregistrat o creştere pînă la 20,3%, s-a menţinut în platou la valorile de 35-38%, cu un vârf maxim 42,6%, iar la porcii graşi, comparativ cu lunile anterioare, mortalitatea a crescut începând cu 13,9%, cu scăderi nesemnificative în lunile următoare.
5. S-au aplicat măsuri complexe sanitare-veterinare (tratamente antiinfecţioase preventive şi curative, dezinfecţii, asigurarea de condiţii corespunzătoare de microclimat şi furajare etc.) stabilite de comun acord cu organele sanitare-veterinare şi institutele specializate.

BIBLIOGRAFIE

1. **BATISTA L., DEE S., ROSSOW K.D., DEEN J., PIJOAN C.**, (2002) - Assessing the duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence and shedding in a large population of breeding age female swine. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, pag. 357-359.
2. **CĂTANĂ N.**, **POPA VIRGILIA, HERMAN V.**, **FODOR IONICA,** (2007) – Cercetări epidemiologice într-un focar endemic de Sindrom Reproductiv şi Respirator Porcin. Revista Română de Medicină Veterinară, vol. 17, nr. 4, pag. 69-74.
3. **DEE SCOTT**, (2001) - Controllo ed eradicazione della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino. Large Animals Review, anul 7, nr. 2.
4. **MAGAR R.**, **LAROCHELLE R.,** (2004) – Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure. The Canadian Journal of Veterinary Research, nr. 68, pag. 259-266.
5. **MENGELING W.L., LAGER K.M., VORWALD A.C.,** (1998) – Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval. Am. J. Vet. Res. nr. 59, pag. 52-55.
6. **NODELIJK G.**, (2002) - Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis. A review, Vet. Q. nr. 24, pag. 95–100.

LAMINITELE – INDICATOR DE APRECIERE A BUNĂSTĂRII

ŢIBRU I., RĂDUCANU Andrada
FMV Timişoara
tibru_ioan@yahoo.com

The paper deals with the results obtained so far, fallowing the observations of the floor effect on cow hoofs in milk cow. The observations took place in four farms that have milking room and various resting conditions. The hoofs lesions have registered values that have been directly proportional to the individual resting surface and the floor quality.

The management of animals' welfare depends on the level of farmer's know-how and interest. The laminitis can be considered an accurate indicator of welfare of milk cow.

Producţia de lapte este într-o continuă schimbare, în multe ţări conducând, la o intensivizare a producţiei, creşterea amplorii operaţiunilor din lăptării şi apariţia a mai multor unităţi automate (roboţii pentru muls) (3). Aceasta duce la tratarea efectivului în detrimentul individului, iar efectele tehnopatiilor vor deveni probleme obişnuite ale efectivului. Rănile ongloanelor şi ale picioarelor, care determina şchiopături devin o preocupare majora în fermele de vaci de lapte. Factorii cu risc major în declanşarea laminitelor includ: modul de întreţinere, de furajare, fondul genetic şi nu în ultimul rând managementul (7).

Calitatea pardoselii şi managementul sunt determinanţi în menţinerea sănătăţii ongloanelor atât din punct de vedere fiziologic cât şi igienic. Indirect, confortul vacilor şi bunăstarea pe timpul deplasărilor expun ongloanele la diferite tipuri de pardoseli, iar îmbunătăţirea acestor factori sunt de bun augur pentru sănătatea, pe termen lung, a animalelor şi pentru o producţie crescută de lapte (8,7). Leziunile ongloanelor şi şchiopăturile au o prevalenţă mai ridicata în sistemele de creştere libera decât în cele legate, deoarece pardoseala este adesea mai tare şi mai mult sau mai puţin umedă şi alunecoasă, iar vacile intră în competiţie pentru un loc mai bun la frontul de furajare, la odihna şi la muls (1,5).

Rolul major în apariţia afecţiunilor ongloanelor îl are cutia de corn, dar în ciuda acestui fapt, cele mai frecvente leziuni apar la nivelul solei. Aceasta deoarece partea exterioara a onglonului este mărită în volum, sola este turtită şi datorită unei pardoselii neadecvate, prin contacul cu acea suprafaţă partea inferioara a onglonului şi pardoseală pot să apară afecţiuni traumatice pe suprafaţa solei. Dacă se modifică structura pardoselii, aceasta devenind mai elastică, va scădea presiunea de la nivelul onglonului şi astfel se vor reduce riscurile de apariţie a leziunilor (2).

Modificările de metabolism pot induce laminite, iar modificările hormonale din timpul gestaţiei scad adiţia osteocitelor în cutia de corn şi pot determina amplificarea leziunilor solei. Diferite tipuri de leziuni soleare ar avea aceeaşi origine, iar diferenţele în apariţia lor sunt determinate de interacţiunea dintre structura osoasă specifică fiecărei vaci, bunăstarea ei şi diferitele valori de microclimat.

Pardoseala din sala de muls este un factor determinant pentru sănătatea ongloanelor. Betonul este un material ieftin şi tare, uşor de realizat, uşor de curăţat, dar nu poate oferii condiţii optime pentru ongloanele vacilor (4,11). Manninen a constatat că şchiopăturile şi leziunile ongloanelor (ulcerele solei, sola dubla, leziunile liniei albe, dermatitele şi eroziunile părţii posterioare a onglonului) sunt asociate semnificativ cu sistemul de creştere liber, care se caracterizează prin pardoseli din beton şi o igienă deficitară(8,9). Cu toate prin folosirea covoarelor de cauciuc, în sistem legat, nu a asigurat o suprafaţă foarte elastică, totuşi s-a constatat o îmbunătăţire în sănătatea ongloanelor (mai puţine ulcere soleare, mai puţine hemoragii la nivelul solei) comparativ cu pardoseala din beton (6,11).

Nu se poate, întotdeauna, delimita clar dacă acesta este un efect direct al întreţinerii pe pardoseala confortabilă sau este un efect indirect al menţinerii un timp mai scurt al contactului onglonului cu betonul, compensând cu un pat mai confortabil (10).

Un studiu efectuat în Germania, pe sisteme de creştere liberă, a demonstrat că aşternuturile moi din covoare de cauciuc au îmbunătăţit semnificativ sănătatea ongloanelor şi abilităţile animalelor de a dezvolta un comportament natural în comparaţie cu vacile ţinute doar pe pardoseala din beton.

MATERIALE ŞI METODE

S-au luat în studiu patru ferme, în care vacile erau ţinute în stabulaţie liberă

- ferma A cu un efectiv de 62 de vaci în lactaţie întreţinute la cuşetă, fără aşternut, pardoseală din beton cu grătare, furajare în adăpost;
- ferma B cu un efectiv de 70 de vaci în lactaţie întreţinute pe aşternut de paie la cuşetă, pardoseală din beton, evacuarea dejecţiilor cu lama şi posibilitate de acces în padoc, furajare în padoc;
- C cu un efectiv de 400 de vaci în lactaţie pe aşternut permanent de paie fără cuşetă, pardoseală din beton, furajare la jgheabul din padoc, unde evacuarea dejecţiilor se făcea zilnic;
- ferma D având un efectiv de 580 de vaci pe aşternut permanent de paie, pardoseală din beton, furajare în adăpost.

În fiecare fermă s-au examinat, ongloanele, în timpul mulsului, s-a făcut o trecere în revistă a afecţiunilor existente şi s-a discutat strategia folosită pentru menţinerea stării de sănătate a onglonului.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După efectuarea inventarului s-a constatat că în fiecare fermă au existat vaci cu afecţiuni podale, diferenţele şi gravitatea lor fiind direct influenţate de sistemul de exploatare şi de managementul fermierului.

La ferma A 35% din animale nu aveau ongloanele corespunzătoare. Majoritatea, 75% din cele afectate aveau ongloanele de la membrele anterioare mai mari (neajustate) şi 65% prezentau o uşoară congestie la bureletul superior. Datorită conformaţiei solei de la membrele anterioare, s-a putut observa, în momentul începerii deplasării, o rotire spre exterior a membrului. Aceasta a dus la o întârziere a startului pentru deplasare, iar în momentul în care animalul urmărit (afectat), trebuie să se retragă din faţa unuia dominant, apare o agitare, care nu de puţine ori se finalizează cu o căzătură pe beton, cu toate urmările ei.

Putem spune că imposibilitatea manifestării unei locomoţii normale şi a comportamentului de cedare în faţa animalului dominant s-a regăsit în modul de manifestare a căldurilor şi de aici a întregii activităţi de reproducţie.

La ferma B situaţia a fost şi mai gravă deoarece 85 % din animale aveau afecţiuni podale, 50% din animale rumegau stând în picioare, şi toate acestea datorită unui management defectuos.

Animalele din ferma C datorită accesului în padoc cu suprafaţă parţial betonată, 36% din animale au prezentat leziuni ale ongloanelor. Prezenţa pământului a permis ca pe vreme bună şi uscată animalele să se poată odihni pe aceste suprafeţe.

La ferma D, unde se practică un trimaj organizat, prin ajustarea ongloanelor de două ori pe an, şi suplimentar la introducerea în repaus mamar şi în a doua lună de lactaţie s-au observat uşoare modificări ale cutiei de corn şi prezenţa aşternutului între cele două ongloane.

S-a mai observat faptul că 60 % din viţelele de 12-18 luni aveau leziuni, fenomen semnalat şi de O'Callaghan şi col., iar după diagnosticarea gestaţiei procentul a ajuns la 80%, valori similare cu Vermunt şi Greenough (1996). Toate acestea dovedesc că este obligatoriu un management continuu şi mereu adaptat la obiectivele propuse, dar şi în concordanţă cu asigurarea condiţiilor de odihnă a vacilor de lapte.

Aceasta ipoteza este susţinuta prin faptul că junincile crescute pe aşternut de paie în ultimele patru săptămâni de gestaţie şi primele opt săptămâni de lactaţie aveau mai puţine hemoragii ale solei şi leziuni ale liniei albe decât la junincile în staule libere în aceeaşi perioada (13).

Wechsler a observat ca junincile crescute în padocuri cu paie în ultimele patru săptămâni de gestaţie şi primele opt săptămâni de lactaţie aveau mai puţine hemoragii ale solei, chiar după 16 săptămâni după ce au fost mutate în boxe comune, ca şi cele ţinute în stabulaţie liberă cu aşternut permanent în ultimele patru săptămâni de gestaţie şi primele opt săptămâni de lactaţie.

S-a observat ca hrănirea cu fân de pajişte în loc de siloz de iarba pentru o perioada de 98 de zile la junincile aflate în gestaţia timpurie, au redus leziunile copitei în prima lactaţie.

Într-un studiu care l-a urmat, junincile au fost hrănite cu o dieta pe baza de siloz de iarba sau paie şi concentrate. Junincile hrănite cu siloz de iarba au avut o incidenţă mai mare ale leziunilor prezente la nivelul solei şi liniei albe, nu doar în timpul creşterii dar şi în timpul lactaţiei.

CONCLUZII

- Sistemul de creştere influenţează apariţia lezuinilor la ongloane.
- Managementul fermei, intertesul şi cunoştinţele fermierului infuenţează starea de sănătatea a animalelor.
- Laminitele pot fi un indicator de apreciere a bunăstării vacilor de lapte.
- Apariţia lezuinilor la viţele şi juninci predispun recidive după fătare.
- Junincile care suferă leziuni ale copitei în lactaţia timpurie au producţia de lapte mai redusă.
- Fermierii ar trebui să cunoască modul de prevenire a leziunilor ongloanelor şi să aibe un program de reducere a acestora.
- Aprecierea locomoţiei poate fi folosită în prevalenţa leziunilor ongloanelor la vaca de lapte.

BIBLIOGRAFIE

1. Cook, N.B. (2003) Prevalence of lameness among dairy cattle in Wisconsin as a function of housing type and stall surface. JAVMA 223, 1324-1328.
2. Fisher A.D., Stewart M., Verkerk G.A., Morrow C.J., Matthews L.R. (2003) The effects of surface type on lying behaviour and stress responses of dairy cows during periodic weather-induced removal from pasture. Applied Animal Behaviour Science 81, 1-11.
3. Fregonesi J.A., Leaver J.D. (2001) Behaviour, Performance and health indicators of welfare for dairy cows housed in strawyard or cubicle systems. Livestock Production Science 68, 205-216.
4. Fregonesi J.A., Leaver J.D. (2002) Influence of space allowance and milk yield level on behaviour, performance and health of dairy cows housed in strawyard and cubicle systems. Livestock Production Science 78, 245-247.
5. Manninen E., de Passille A.M., Rushen J., Norring M., Saloniemi H. (2002) Preferences of dairy cows kept in unheated buildings for different kind of cubicle flooring. Applied Animal Behaviour Science 75, 281-292.
6. O'Callaghan, K.A., Cripps, P.J., Downham, D.Y. and Murray, R.D. (2003) Subjective and objective assessment of pain and discomfort due to lameness in dairy cattle. Animal Welfare 12, 605-610.
7. Phillips C.J.C., Morris I.D. (2002) The ability of cattle to distinguish between, and their preference for, floors with different levels of friction, and their avoidance of floors contaminated with excreta. Animal Welfare, 11: 21-29.
8. Sprecher, D.J., Hostetler, D.E. and Kaneene, J.B. (1997) A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. Theriogenology 47, 1179-1187.
9. Warnick, L.D., Janssen, D., Guard, C.L. and Grohn, Y.T. (2001) The effect of lameness on milk production in dairy cows. Journal of Dairy Science 84, 1988-1997.
10. Wechsler B., Schaub J., Friedli K., Hauser R. (2000) Behaviour and leg injuries in dairy cows kept in cubicle systems with straw bedding or soft lying mats. Applied Animal Behaviour Science 69, 189-197.
11. Whay, H. (2002) Locomotion scoring and lameness detection in dairy cattle. In Practice 24, 444-449.
12. Whay, H.R., Main, D.C.J., Green, L.E. and Webster, A.J.F. (2003a) Animal-based measures for the assessment of welfare state of dairy cattle, pigs and laying hens: consensus of expert opinion. Animal Welfare 12, 205-217.
13. Whay, H.R., Main, D.C.J., Green, L.E. and Webster, A.J.F. (2003b) Assessment of the welfare of dairy cattle using animal-based measurements: direct observations and investigation of farm records. Veterinary Record 153, 197-202.

PROTECŢIA PUILOR DE CARNE CU AJUTORUL ACIDIFIANŢILOR

ŢIBRU I., CĂTANĂ N.
FMV Timişoara
tibru_ioan@yahoo.com

The paper deals with a synthesis of the results obtained so far, fallowing the observation of the protector effect of certain acidifiants: Sal Curb, Acid Pak 4 way, MULTI ACID P, FRA®BIOPHORCE şi FRA®SAL. Depanding on the epidemiologic situation, one or more acidifiants are recomanded to be used. In consideration of economy issues, the use of acidifiants is justified when there have been an alteration of the technological flux.

Regulamentul (CE) 2160/2003 al Parlamentului European şi al Consiliului din 17.11.2003, transpus prin Or. MAPDR nr. 23/31.01.06 publicat în MO 198/02.03.06 şi Or. MAPDR nr. 34/17.02.06 publicat în MO 199/02.03.06 prevede la articolul 5 (4) existenţa unor programe naţionale de control care să acopere cel puţin următoarele etape: (a) producţia hranei pentru animale, (b) producţia primară de animale şi (c) prelucrarea şi prepararea produselor de origine animală.

La Anexa 1, regulamentul, în conformitate cu articolul 4, prevede ca la toate efectivele de:

- *găini de reproducţie* să fie fixate la 12 luni după publicare obiectivele, iar la 18 luni de la acea dată să se poată efectua testul de supraveghere pentru zooneoze şi agenţii zoonotici;
- *găini ouă consum* la 24 respectiv la 18 luni;
- *la puii de carne* la 36 respectiv 18 luni.

Pentru a favoriza obţinerea de efective şi zone indemne la salmoneloză, propunem o alternativă prin care să se asigure protecţia efectivelor de pui de carne prin folosirea probioticelor.

MATERIAL SI METODE

Pentru fiecare experiment s-a folosit un lot de 100 de pui de carne de o zi, din hibridul Ross 308, ce au fost adăpostiţi, furajaţi şi adăpaţi în aceleaşi condiţii. De fiecare dată puii au împărţiţi în patru loturi, din care unul M martor, iar celelalte loturi experimentale în funcţie de acidifiantul utilizat. Un lot de pui a primit în apa de băut acidifiatul, un altul, pe lângă acidifiant a fost infectat cu o cultură de Salmonella, iar al patrule a fost doar infectat.

Pentru **Sal curb** s-a administrat în apa de băut 2‰ Sal Curb lichid, E_1 care pe lângă soluţia de Sal Curb a fost infectat pe cale orală cu o cultură de Salmonella de grup D (2 ml 700 UFC/ ml) şi E_2 care a fost doar infectat.

Pentru ***Acid Pak 4 way*** la o săptămâna de viaţă toţi puii au primit, dintr-o cultura de *Salmonella* de grup D, cate 1000000 UFC per os. Diferenţierea s-a produs la adăpare: puii din *lotul* L_1 au fost *martor* si au primit apa de la reţea, puii din *lotul* L_2 au primit în apă *0,5 g/litru Acid Pak 4 way,* puii din *lotul* L_3 au primit *Bio Mos 4 ‰ în furaj,* iar puii din *lotul* L_4 au primit o combinaţie de *0,5 g de Acid Pak 4 way /litru apă de băut* şi *Bio Mos 4 ‰ în furaj*.

La 7 si 14 zile după infecţia dirijată (id) s-au recoltat, prin tampoane cloacale, probe de fecale, pentru a se urmării şi verifica starea de purtător de salmonele. Tampoanele au fost puse în mediu cu selenit de sodiu, apoi s-a efectuat identificarea salmonelelor pe mediu selectiv Rambach, iar ulterior prin aglutinarea cu ser specific, tulpinile au fost încadrate serologic.

Pentru **Multiacid P** după două zile de acomodare s-au creat trei loturi a câte 25 de pui fiecare. Lotul 1 martor a primit furaj fără MULTI ACID P, lotul 2 şi 3, furaj cu MULTI ACID P 2 ‰, iar la vârsta de şapte zile lotul 3 a fost infectat pe cale orală cu *Salmonella enteritidis* $1,8 \times 10^6$

Pentru ***FRA®BIOPHORCE* şi *FRA®SAL*** după două zile de acomodare puii au primit apă şi acelaşi tip de furaj, diferenţa constând în *Lotul L1:* martor; *Lotul L2:* în apa de băut li s-au administrat *FRA®BIOPHORCE, Lotul L3:* în apa de băut li s-au administrat *FRA®SAL.*

Pentru a verifica capacitate de protecţie a produselor faţă de salmonele, s-au luat din fiecare lot câte 25 de pui, cărora li s-a făcut infecţia dirijată cu *Salmonella typhimurium S 104*, administrând câte $1,5 \times 10^9$ UFC/pui şi s-a urmărit apariţia eventualelor modificări de comportament, a semnelor de boală, precum şi durata stării de purtător de salmonele.

REZULTATE SI DISCUTII

La Sal curb nu s-a putut reproduce boala, doar urmărindu-se sporul mediu zilnic, consumul specific, greutatea finală şi randamentul la tăiere s-au constatat următoarele: lotul ce a beneficiat de Sal Curb, fără a fi fost contaminat a avut o greutatea mai mică decât lotul martor cu 8%; lotul contaminat şi care a beneficiat de Sal Curb a avut o greutate mai mare decât lotul contaminat cu 19 %. Consumul de furaje a fost mai mic la pui cu Sal Curb faţă de martor cu 14 %, iar la lotul contaminat, dar fără Sal Curb cu 5 % mai mare.

La Acid Pak 4 way după două ore după id puii din L_3 au prezentat fecale lichide de culoare gălbuie, iar la opt ore puii din L_1 prezentau adinamie, decubit, stare de somnolenţă, apatie, iar puii din celelalte trei loturi prezentau doar adinamie si fecale apoase.

După 24 de ore de la id puii din loturile L_1 L_2 L_4 au prezentat un consum mai mare de apă faţă de normal şi faţă de puii din lotul L_3, la care consumul de apă a rămas constant. Fecalele, la puii din toate loturile au fost moi si maronii. Trebuie specificat că puii şi-au revenit, au fost vioi si au început sa consume furaj.

La 48 de ore după id., fecalele încep să devină păstoase, puii au fost mai vioi, consumul de furaje a fost apropiat de normal, excepţie au făcut puii din lotul L_2 care nu au consumat nimic.

Din ziua a treia după id, fecalele au devenit păstoase, puii au început să consume apă şi furaje după grafic, iar din ziua a patra fecalele au început sa aibă un aspect normal.

Analiza probelor de fecale, recoltate in ziua 7 ai 14 post id a scos in evidenţă starea de purtător de *Salmonella grup D* a puilor din toate loturile, mai puţin puii din lotul L_4, la care, probele de fecale recoltate după 14 zile de la id. nu au mai prezentat culturi specifice de *Salmonella.*

- în prima săptămână 101, % pentru L_2, 83% pentru L_3 şi 107,9 % pentru L_4;
- în a doua săptămână 100,9 % pentru L_2, 94,5% pentru L_3 si 105,25 %pentruL_4;
- în a treia săptămână 104,9 % pentru L_2, 99,9% pentru L_3 şi 108,8 % pentru L_4;
- în a patra săptămână 108,6% pentru L_2,105,5% pentru L_3 şi 108,6% pentru L_4;
- în cincia săptămână 1003,1% pentru L_2,102,8% pentru L_3 şi 105,6 % pentru L_4.

La Multiacid P, după analiza valorilor se poate constata că toţi puii au ajuns la final, nu au existat morţi. Diferenţierea s-a făcut pe baza consumului specific şi a greutăţii la tăiere.

Lotul 1(martor) a avut un consum specific de 1,94 kg/kg şi o greutate medie la tăiere de 2,12kg;

Lotul 2, cel care a beneficiat de aportul produsului MULTI ACID P a avut un consum specific de 1,80 kg/kg şi o greutate medie de 2,29 kg.

Lotul 3, cel ce a fost infectat, dar şi protejat a avut un consum specific de 2kg/kg şi o greutatea medie la tăiere de 2,05 kg.

La ***FRA®BIOPHORCE*** **şi** ***FRA®SAL*** în prima săptămâna de acomodare s-a constatat o uniformitate atât în cea-ce priveşte greutatea medie cât şi consumul specific.

În a 2-a săptămână s-a constatat menţinerea echilibrului referitor la greutatea medie doar că apare o diferenţiere în consumul specific şi aceasta se poate pune pe seama utilizării a celor doi acidifianţi.

În săptămâna a 3-a s-a constatat aceeaşi situaţie ca la utilizarea altor acidifianţi, nu există diferenţe semnificative între loturi.

La finele săptămânii a 4-a situaţia se prezintă conform aşteptărilor, loturile ce au beneficiat de acidifiant au un consum specific mai mic, situaţie ce se menţine până la sfârşitul experimentului.

Trebuie menţionat că datorită condiţiilor bune de întreţinere a puilor între greutatea medie nu au fost diferenţe.

Analizând efectul protectiv a celor 2 acidifianţi în 1 săptămână post infecţie dirijată se constată că cele două loturi contaminate au o greutate medie cu 50 g până la 150 g diferenţă în minus.

La finele săptămânii a 2-a post infecţie dirijată se constată din nou o revenire a greutăţii specifice, diferenţe fiind doar la consumul specific, aceasta înseamnă că puterea de reacţie a puilor a fost mult îmbunătăţită de utilizarea acidifianţilor.

La finalul experimentului se poate concluziona că utilizarea celor doi acidifianţi este recomandată în situaţii epidemiologice de criză.

CONCLUZII

- La loturile de pui, unde sunt probleme de igienă se recomandă a se administra Sal Curb atât din punct de vedere epidemiologic cât şi din punct de vedere economic, în schimb nu se recomandă a se administra preventiv.
- Analizând şi din punct de vedere economic s-a constatat o creştere a cheltuielilor cu 430 lei pentru puii din lotul ce a primit Bio Mos; cu 7 568 lei pentru puii ce au primit *Acid Pak 4 way* şi cu 7 998 lei pentru puii ce au primit combinaţia.
- Analizând cele obţinute se poate concluziona că produsul MULTI ACID P asigură o conversie mai bună a furajului prin stimularea dezvoltarea microflorei normele, creşte absorbţie elementelor nutritive şi reduce numărul microorganismelor patogene.
- Se poate obţine o carne fără reziduuri de antibiotice şi se poate dicuta de o posibilitatea ideală de a produce carne ecologică.
- Folosirea acizilor organici, împreună sau nu cu uleiuri esenţiale s-a dovedit a asigura o protecţie antisalmonelică.
- Ambele produse au fost foarte bine tolerate de organismul puilor şi nu au apărut reacţii adverse.
- Folosirea acizilor organici, împreună sau nu cu uleiuri esenţiale duce la reducerea pH-ului în tubul digestiv.
- Prin distrugerea membranei bacteriene se realizează o modificare benefică în microbismul local.
- Modificarea apărută permite o selecţie a microorganismelor ceea ce permite asigurarea şi menţinerea sănătăţii tubului digestiv.
- Amestecul de acizi organici şi uleiuri esenţiale s-a dovedit a fi eficient şi la îmbunătăţirea performanţelor productive, scăzând consumul total de furaj şi apă, consumul specific, şi nu în ultimul rând a crescut greutatea carcaselor.

BIBLIOGRAFIE

1. Bolder, N., Palmu, M.L. (1995) - Effect of antibiotic treatment on competitive exclusion against Salmonella Enteritidis PT 4 in broilers, The Veterinary Record, September 30.
2. Clayton, Gill (2003) – Feed antibiotics; Risk assessment for the “real world”, Feed International, June.
3. Clayton, Gill (2003) – Hyigenic meal for poultry, Feed International; May.
4. Clayton, Gill (2003) – Eco-friendly ingredients, Feed International; May.
5. Fernandez, F., Hinton, M. & B. van Gils (2001) – Evaluation of the effect of mannan-ologosaccharides on the competieive exclusion of Salmonella Enteritidis colonization in broiler chicks, Avian Pathology, 29, 575-581.
6. Gast, R.K., Molt, P.S. (1998) – Persistance of Salmonella Enteritidis from one day of age until maturity in experimentaly infected layer chickens, Poultry Science; 77, 1759-1762.
7. Orlic, D., Tibru, I., Potkonjak, Dubravka, Kapetanov, M. (2006) - Influence of acidifier appliance on prevention of Salmonella enteritidis infection and production results in fattening chickens, The 5th International Symposium on biocides in public health and environment, Belgrade, Serbia, 128 – 129.
8. Ţibru, I., Cătană, N., Tăşădan, T. (2005) - Some acidifiers use in the antisalmonella protection of broilers, Simpozijum Stocarstvo, veterinrstvo i agrickonomija u tranzicionim procesima Herceg - Novi, 85.
9. Ţibru, I., Orlič, D., Cătană, N. (2007) - Possibilities of paratifosis prevention in broilers, XIII th International Congress in Animal Hygiene ISAH, Tartu, Estonia 762 – 764
10. Velhner, Maja., Stojanov, I., Potonzak, Dubravka, Kapetanov, M., Orlić, D., Raśić, Z. (2005) - Salmonella enteritidis isolation from broiler chickens infected with low doses, Acta Veterinaria, Beograd, 55, 2-3, 183-191.
11. *** - International Hatchery Practice – An insight into the issues of antibiotic resistance, 17, 8.

STUDY OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF SOME MYCOTOXINS ON BROILERS

TÎRZIU E., CUMPĂNĂŞOIU C., NICHITA Ileana, GROS R.V.
FMV Timişoara

The OTA and DON mycotoxins foraged in "Hybro" broilers feed for 42 days induce an immunologic deficiency status, characterized by a diminution of the specific resistance at vaccination against aviary bursitis virus, but also by quantitative and qualitative modifications of immune competent cells.

Modifications of specific antibodies concentration are directly influenced by the administered mycotoxins doses in broilers feed on the three experimental batches, the lower values being recorded on the batch which received the highest concentration of mycotoxins. Mycotoxins also determine a significant modification of the lymphocyte neutrophil ratio.

Key words: mycotoxins, broilers, immunosuppressive effect

Mycotoxins are secondary fungal metabolites, appearing in different stages of grains production. Main fungus genera which produce mycotoxins, with an important role in animal pathology, are *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Both ochratoxin A (OTA) and deoxynivalenol (DON) have extremely complex and detrimental effects for animal organisms, inducing economic losses by direct action, determining different diseases and affecting the specific and non-specific resistance (1, 2, 5, 6).

In this paper we studied the immunosuppressive effects of some different doses of ochratoxin and deoxynivalenol on umoral and cellular immunity on broilers (3, 4, 7).

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted at didactic station from USAMVB Timisoara, on 80 "Hybro" broilers, from 21 to 42 days of life, differently nourished with OTA and DON. The 80 broilers were distributed on four batches, as follows: the first experimental batch (E1), foraged with 1.000 ppb DON and 500 ppb OTA, the second experimental batch (E2), foraged with 700 ppb DON and 350 ppb OTA, the third experimental batch (E3), foraged with 500 ppb DON and 250 ppb OTA, and the fourth batch, the control batch, foraged with no mycotoxins.

Each batch was distributed on cages, on three different levels, with 20 broilers per cage. The foraging zones were individualized for each cage.

The specific defense function was tested by determining the titre of antibodies against infectious bursitis virus, the broilers being previously vaccinated against this disease, at the age of 9 days.

At the age of 8, 14, 28 and 42 days of life, from 10 broilers from each batch blood was sampled, with and without anticoagulant, from the axillary artery. The blood samples were analyzed in order to quantify the seric antibodies, also in order to determine the leukocyte formula. In order to establish the immunosuppressive effects of both mycotoxins, the modifications intervened in the leukocyte formula were assessed, the modifications of antibodies concentration against infectious bursitis virus were also appraised.

RESULTS AND DISCUSSIONS

General reactivity of the body is accomplished by specific (antibodies) and non specific (lysosime, properdine, complement, cytokine) umoral factors and cellular factors (lymphocytes, neutrophils, eosinophils, monocyte and macrophage), who, by producing antibodies and phagocytosis, ensure the defense of the organism.

Mycotoxins administered in chicken's ratio through a period of 42 days, induce an immunological deficiency characterized by the diminishing of specific resistance to experimental infection and by the alteration of sanguine parameters. When ingested in large dosages, mycotoxins have the ability to destroy the cellular wall by increasing lipid peroxidasys, inducing severe immunodeficiency.

Table 1 Immune response reflected as antibody concentration (average values)

Collection	Antibody titre			
	M	**E_1**	**E_2**	**E_2**
R_1	0,131*	0,109	0,110	0,101
R_2	0,184*	0,087	0,105	0,131*
R_3	0,276*	0,079	0,149*	0,193*
R_4	0,324*	0,099	0,168*	0,242*

*positive samples

Analyzing the obtained data following the experiments conducted by our staff, changes of the studied immunological parameters have been ascertained in all experimental batches (table 1 and 2).

Table 2 Leukocytary formula

Collection	Batch	L (%)	N (%)	E (%)	B (%)	M (%)
R_1	**M**	**58,8**	**32,2**	**3,2**	**1,8**	**4,0**
	E_1	62,3	31,1	1,8	2,1	2,7
	E_2	61,0	28,0	2,1	3,4	5,5
	E_3	58,6	30,9	3,0	3,5	4,0
R_2	**M**	**59,6**	**30,4**	**2,2**	**3,8**	**4,0**
	E_1	60,5	32,2	1,2	1,8	4,3
	E_2	58,5	30,8	3,1	2,9	4,7
	E_3	58,2	32,2	2,4	3,3	3,9
R_3	**M**	**66,6**	**27,2**	**1,8**	**1,2**	**3,2**
	E_1	54,7	36,4	2,2	1,7	5,0
	E_2	55,4	34,7	3,2	2,3	4,4
	E_3	57,2	34,2	2,3	3,1	4,2
R_4	**M**	**69,5**	**24,3**	**0,8**	**1,8**	**3,6**
	E_1	49,5	38,8	2,1	1,1	5,2
	E_2	54,9	36,2	3,3	1,9	3,7
	E_3	56,1	35,0	2,9	3,1	2,9

Thus, seric antibodies titre suffers important modification between the lots and the experimental stages. Compared to the witness lot, vaccinated and fed regularly and where the titre is positive in all the blood samples collected, in experimental lot 1, not even one sample was positive. Instead, in experimental lots E2 and E3, where the quantity of mycotoxins has been diminished, it have been registered two, respectively three positive samples, specifying that the maximum value in those two lots has been registered in the E3 lot in the last sampling.

In respect of the leukocyte formula (table 2), the results are pretty similar. Comparing the obtained results, important changes have been registered in the lymphocytes where, excepting the first and second sampling, at the third and fourth sampling the number is significantly lower that that of the witness lot, while the number of neutrophils and phagocytes grows in all sampling, correlating with the amount of mycotoxins administered. We ascertain also the presence of eosinophilya correlative with the presence of clinical signs.

CONCLUSIONS

Administering mycotoxins (DON and OTA) in the ratio of “Hybro” broiler chickens during a period of 42 days induces an obvious state of immunological deficiency.

Chronic intoxication of broiler chickens with DON and OTA affects seriously umoral immunity of the organism. The production of seric antibodies is diminished in all experimental lots, being directly influenced by the quantity of mycotoxins administered.

The function of natural cellular defense is meaningfully reduced ($p<0.05$) by DON and OTA and, paradoxically, it is ascertained a decrease in the lymphocyte and neutrophile number.

REFERENCES

1. *Bennett, J. W., Klich, M.* – Mycotoxins. Clinical microbiology, 2003; 16(3): 497-516.
2. ***Chowdhury, S. R.***, ***Smith, T. K.***, ***Boermans, H. J.***, ***Woodward, B.*** - Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on hematology and immunology of turkeys. **Poult. Sci. 2005 Nov; 84(11): 1698-706.**
3. ***Corrier, D. E.*** - Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. **Vet. Immunol. Immunopathol. 1991 Nov; 30(1): 73-87.**
4. *Moura, M. A., Machado, C. H., Porfírio, L. C., Freire, R. B.* - Effects of ochratoxin on broiler leukocytes, Rev. Bras. Cienc. Avic. 2004, vol. 6 no. 3.
5. ***Oswald, I. P.***, ***Marin, D. E.***, ***Bouhet, S.***, ***Pinton, P.***, ***Taranu, I.***, ***Accensi, F.*** - Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. **Food. Addit. Contam. 2005, 22 (4): 354-60**
6. *Pitt, J. I., Basílico, M. L., Abarca, M. L., Lopez, C.* – Mycotoxins and toxigenic fungi. Medical Mycology. 2002; 38(supplement L): 41-46.
7. *Shivachandra, S. B., Sah, R. L., Singh, S. D., Kataria, J. M., Manimaran, K.* - Immunosuppression in broiler chicks fed aflatoxin and inoculated with fowl adenovirus serotype-4 (FAV-4) associated with hydropericardium syndrome. Springer Netherlands. **Volume 27, Number 1 / January, 2003**, 39-51

THE EVALUATION OF IMMUNOGENIC CAPACITY OF AN INACTIVATED ANTI-*FUSOBACTERIUM NECROPHORUM* VACCINE

ŢOGOE I.[1], TUDOR L.[1], CRĂCIUN GABRIELA[2], TUDOR ANETA LAURA[3]
[1] The Faculty of Veterinary Medicine Bucharest
[2] INFLPR Bucharest
[3]The Faculty of Veterinary Medicine Spiru-Haret Bucharest

The research performed is part of a complex project which is carried out for many years now. The results concerning the comparative verification of the immunogenic capacity of 2 types of inactivated vaccines obtained by classical methods, using a standardized methodology and after the their administration on 2 plots of cows, there have been statistically analyzed in 2 consecutive stages: the verification of their innocuity, before the administration on animals from the same species with the species on which the vaccine can be administrated; the verification of the immunogenicity of the 2 types of biological products after administrating them to 2 plots of cows by marking out the specific titer of antibodies.

At the animals from A plot, after the first vaccine administration, the specific antibody titer marked out values between 1/64 and 1/256, while in case of the ones to which vaccine B was administrated, the values of the specific antibodies titers were between 1/128 and 1/512. After relapse, there was recorded a significant increase of specific antibodies titers, in animals from plot A, but also at the ones from plot B, but in the majority of the sera collected from cattle in plot B, the antibody titer was higher than 1/512 (between 1/1024 and 1/2408).

The research performed worldwide until the present day, concerning the specific prophylaxis of infections generated by *Fusobacterium necrophorum* in ruminants are numerous, but the practical results obtained after using several stems of vaccine haven't answered fully to the expectances, after inoculation these don't confer a solid immune status of the vaccinated animals, but contributes only to the reduction of the disease incidence or attenuates the clinical signs. The vaccines mostly used in many countries are constituted on fragments of the bacterial cellular wall (subunit vaccines), but, lately, also from integral cultures. The administration of every one of these types of vaccines on animals induces the synthesizing of specific antibodies, but with low titers, not sufficient for protecting the organism against the pathogenic action of the bacteria from *Fusobacterium necrophorum* species. The low titer of specific antibodies is due, to the high number of antigens which exist in a vaccine like this, towards the animal will produce specific antibodies, and on the other side, these ones cannot interfere with the synthesized toxins of the bacterium, involved in the pathogenesis of these diseases. The results of the research that we performed in initial stages of the project demonstrate that the prevention of the diseases produced by this bacterial species is possible only if the vaccine contains in its composition, as an antigen, the leucotoxin. In 1986, Emery D.L. and Vaughan demonstrated that the administration of rabbit or cattle serum with high titers of antileucotoxin antibodies, in mice was able to protect them from experimental infection with *Fusobacterium necrophorum*. After the research was performed, Smith and Wallace concluded that the specific prophylaxis towards the infections determined by *Fusobacterium necrophorum* in economical interest animals is dependent upon the management of the immunization process, but through their own chemical composition, the bacterial bodies are low immunogens. Taking these into account, the research performed in some of the activities from stage 4 of the proposed project followed the elaboration of a standardized technology of obtaining 2 inactivated vaccines, taking *Fusobacterium necrophorum* cultures, on as an anaculture, in which exists several types of antigens (the majority of those existent in the chemical composition of the cellular wall) and other of bacterial type (in which the majority of antigens are represented by the exotoxins which the bacterium synthesize during multiplication in liquid media), with them being vaccinated the plots of cattle.

MATERIAL AND METHODS

In order to evaluate the immunogenic capacity there have been used 2 types of inactivated vaccines, called A vaccine (prepared from integral cultures of *Fusobacterium necrophorum* inactivated by using phormol and heat, anaculture type) and B vaccine (obtained by precipitating the supernatant

of 407 stem of *Fusobacterium necrophorum* and inactivated through phormol and heat - bacterial type). Other materials: disposable syringes, iodine tincture, sterile test tubes. Plots of animals - 30 cows of different ages, distributed in 2 experimental plots, noted as plot A and plot B, on which the 2 types of vaccine have been administrated. The rest of the existent animals from the large group represented the witness plot.

The working technique - The technique for verifying the vaccine innocuity - the verification of the innocuity of the 2 types of inactivated vaccines was realized after the following protocol: 7 days before the beginning of the experiment, there have been inoculated 3 cows with a double dose from every type of vaccine. The inoculations were realized on subcutaneous way in several separate points, in the middle third, on the lateral sides of the neck. The inoculated animals were daily examined in order to observe the eventual modifications at the level of the inoculation spot or their general status. If after the administrations of the vaccine do not appear any sort of modifications in the general status of the animals, this may be administrated. Habitually, in case of the vaccines which contain in their composition aluminum hydroxide gel, at the inoculation spot it can appear a nodule of different dimensions which vanishes in almost 1 week.

The techniques of verifying the immunogenicity of the 2 types of vaccines - In order to evaluate the immunogen capacity of the 2 types of inactivated vaccines, these have been inoculated at the correspondent cow plots (plot A and plot B), by subcutaneous way, in 2 stages, at 14 days: for the first inoculation, no matter the type of vaccine, there has been used a dose of 5 ml and for the second one a dose of 3 ml; the cows from the witness plot (5 animals), were inoculated by subcutaneous way with 5 ml of Schaedler broth at the first stage and with 3 ml of Schaedler broth at the second one. From the cows from both experimental plots, and also from the ones in witness plot, before administrating the vaccines or the Schaedler broth, before second stage and after 14 days since the last inoculation there have been collected blood samples in order to determine the antibody titer. The presence of specific antibodies in blood serum of vaccinated animals and in the one of the animals from the witness plot was determined through serological qualitative tests (the reaction of double immunidiffusion on agar gel) and through the quantitative techniques in vitro (the reaction of seroflocculation) and in vivo (the reaction of neutralization on mouse).

The technique of performing the immunidiffusion reaction in agar gel - called also radial diffusion or Quchterlony technique, this method is based upon the diffusion of the 2 reagents (one of them is known and the other must be determined), placed in separate slides, practiced in a layer of pure agarose. The antigen molecule and the antibodies diffuse in the gel layer, and at the place of meeting, in the equivalence zone, they form a precipitation line.

The technique of seroflocculation performing (RAMON method) - This technique is used to treat in vitro the native antitoxic sera or purified and concentrated antitoxic sera and it is based upon the specific coupling between a given molecular antigen as a known element of the reaction, and the specific antibodies, eventually present in a sanguine sera for examination (as a unknown element of the reaction).

Pursuing this purpose, the serum for examination, the unknown element of the reaction was diluted with a physiological buffered solution, 1/100, and then in consecutive binary dilutions, afterwards in each test tube of serial dilutions is added 1 ml from the concentrated leucotoxin, which initially was diluted at 1/100 using a physiological buffered sterile solution. It is registered the time of flocculation Kf and it is expressed the quantity of specific antibodies from the serum for examination through dilution titer at which the first positive reaction appeared. The positive reaction appears most rapid in dilutions in which the toxin quantity is equivalent to the quantity of specific antibodies.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The results of the investigation performed in this activity have demonstrated that the 2 types of antigens from which the 2 types of vaccines inactivated with phormol and adsorbed on aluminum hydroxide gel have been prepared corresponded to the sterility and innocuity tests, the phormol in final concentration of 5% being capable of inactivating the bacterial bodies and transforming the toxic compounds synthesized by the bacterium present in the culture supernatant, in anatoxins, with the conservation of antigenity. The inoculation of the 2 types of vaccine, in cattle, by subcutaneous way in a dose of 10 ml, in order to test the innocuity, didn't determine any local reaction or changes in

general status of the inoculated animals, which may contraindicate the utilization of these in the specific prophylaxis towards the infections generated by Fusobacterium necrophorum in naturally receptive animals. Because of the phormol existence and the aluminum hydroxide gel in the composition of the vaccines, at the place of inoculation, after the first 24 hours, there have appeared local inflammatory reactions of low intensity, manifested by the apparition of some nodules, with a diameter of 2-3 cm, which vanished after 1 week. In the observation period, there haven't been recorded changes in the general status of the inoculated cattle. At the animals inoculated only with the Schaedler broth there haven't appeared inflammatory reactions or nodules at the place of the inoculation. In none of the sanguine sera collected from cattle belonging to the experimental plots and the ones from the witness plot, before the administration of the vaccines, there haven't been marked out specific antibodies, when the double immunodiffusion on agar gel reaction was used, meanwhile in all the collected sera after administration of the vaccines, using the same technique, there have been marked out one or more lines of precipitation, taking into account the type of the vaccine. The results of the determinations concerning the specific antibodies titers and the dynamic of their evolution, from the blood sera collected from the cattle in plot A, B and witnesses, depending upon the type of the vaccine, are presented synthetically in table 1.

Table 1 The specific antibodies titer from the blood sera of cattle from witness plot and vaccinated plots

Criteria number	Plot	The symbol of the serum	The specific antibodies titer		
			T_0	After 14 days from the first vaccine administration	After 14 days from the last vaccine administration
1	Witness	W1	0	0	0
		W2	0	0	0
		W3	0	0	0
		W4	0	0	0
		W5	0	0	0
2	A	A1	0	1/256	1/512
		A2	0	1/128	1/256
		A3	0	1/128	1/256
		A4	0	1/256	1/512
		A5	0	1/64	1/128
		A6	0	1/256	1/512
		A7	0	1/128	1/1024
		A8	0	1/128	1/512
		A9	0	1/128	1/512
		A10	0	1/256	1/1024
		A11	0	1/128	1/512
		A12	0	1/256	1/256
		A13	0	1/128	1/512
		A14	0	1/256	1/512
		A15	0	1/128	1/512
3	B	B1	0	1/128	1/512
		B2	0	1/256	1/1024
		B3	0	1/256	1/2408
		B4	0	1/256	1/2408
		B5	0	1/128	1/512
		B6	0	1/256	1/512
		B7	0	1/512	1/2408
		B8	0	1/128	1/512
		B9	0	1/256	1/2408
		B10	0	1/256	1/1024
		B11	0	1/128	1/1024
		B12	0	1/512	1/2408
		B13	0	1/512	1/2408
		B14	0	1/512	1/2408
		B15	0	1/128	1/1024

The analysis of statistical data from table 1 demonstrate that in the blood serum of cattle from the witness plot, inoculated with Schaedler broth, there haven't been marked out in the whole experimental period, specific antibodies towards the components existents in the composition of this medium.

It must be mentioned also that the absence of the specific antibodies has been recorded in the blood serum of every cattle in plot A and B, even when the serum was collected before the administration of the vaccines. In comparison to these ones, in the blood serum of every vaccinated animal have been marked out, through seroneutralization reaction, specific antibodies towards the existent antigens from the chemical composition of the vegetative cells, but also in the culture supernatants, concentrated through precipitation with ammonium sulphate.

The specific antibodies titer varied from an animal to another, even in the same plot, but especially from a type of vaccine to another, mostly after the second administration of vaccine.

Comparing the specific antibodies titers from the vaccinated animals in plot A and B, there can be concluded that in the blood serum of vaccinated animals, with B vaccine, even after the first administration of vaccine, the antibody titer is higher than in the case of animals vaccinated with A type.

CONCLUSIONS

The research made in the activity 4 from stage 4 followed through comparative analysis the determination of the immunogen value of 2 types of inactivated vaccines, one obtained from integral cultures of Fusobacterium necrophorum and the other one from the leucotoxin present in the culture supernatant, adsorbed on aluminum hydroxide gel, after administrating these on the 2 plots of cattle. The ensemble of investigations performed permitted the formulation of the following conclusions:

1. The phormol, in a final concentration of 0,5 % determined the inactivation of *Fusobacterium necrophorum* cells and the transforming of the exotoxins synthesized by the bacterium in anatoxins, with keeping the antigenity after maintaining these at 37°C, for 96 hours;
2. In the chemical composition of both types of vaccines there have been present sufficient quantities of antigens which determined after inoculation, the synthesis of specific antibodies in decelable titers through the double immunodiffusion in agar gel technique and also through the seroflocculation reaction;
3. After the first inoculation with vaccine, but also after the relapse, the specific antibodies titers were higher in animals from the vaccinated plot with the vaccine containing the leucotoxin present in the culture supernatant of *Fusobacterium necrophorum*, in comparison with the marked out antibodies titer from the animals serum to which has been inoculated the vaccine constituted from integral culture.
4. Through the double immunodiffusion on agar gel reaction, in case of the sera collected from vaccinated animals with A vaccine, there have been marked out at least 2 lines of precipitation, this aspect proving that in the chemical composition of this vaccine existed at least 2 typed of antigens with molecular constants and different specificity.

BIBLIOGRAPHY

1. Aliyu, S.H., Marriott, R.K., Curran, M.D., Parmar, S., Bentley, N., Brown, N.M., Brazier J.S., and Ludlam, H., 2004 - Real-time PCR investigation into the importance of Fusobacterium necrophorum as a cause of acute pharyngitis in general practice. Journal of Medical Microbiology, 53, 1029-1035.
2. Amoko K.K., Y. Goto and T. Shinjo, 1993. - Comparison of extracellular enzymes of Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum and Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme. J. Clin. Microbiol. 31; 2244-2247.
3. Berg, J. and Scanlan, C.M., 1982. - Studies of Fusobacterium necrophorum from bovine hepatic abscesses; biotypes, quantitation, virulence, and antibiotic susceptibility. Am. J. Vet. Res., 43, 1580-1586.
4. Brazier, J.S., 2002. - Fusobacterium necrophorum infections in man. Rev. Med. Microbiol., 13, 141-149.
5. Coyle-Dennis, J.E. and Lauerman, L.H., 1979. - Correlations between leukocidin production and virulence of two isolates of Fusobacterium necrophorum. Am. J. Vet. Res., 40, 274-276.
6. Emery D.L., J.A. Vaughan, B.L. Clark, J.H. Dufy and D.J. Stewart, 1985. - Cultural characteristics and virulence of strains of Fusobacterium necrophorum isolated from the feet of cattle and sheep. Aust. Vet. J. 62, 43–46.
7. Emery, D.L. and Vaughan, J.A., 1986 - Generation of immunity against **Fusobacterium necrophorum** in mice inoculated with extracts containing leukotoxin. Vet. Microbiol. 12, 255–268.

8. Hagelskjaer, L. Kristensen and J. Prag, 2000. - Human Necrobacillosis, with Emphasis on Lemierre's Syndrome. Clinical Infections Diseases, 1, 524-532.
9. Jang S.S. and Hirsh D.C., 1994. - Characterization, distribution, and microbiological associations of Fusobacterium spp. in clinical specimens of animal origin. J. Clin. Microbiol. 32, 384–387.
10. Langworth, B.F., 1977 - Fusobacterium necrophorum: Its characteristics and role as an animal pathogen. Bacteriol. Rev., 41, 373-390.
11. Ogi Okwumabua, Zilong Tan, Jacque Staats, R.D. Oberst, M.M. Chengappa and T.G. Nagaraja, 1996. - Ribotyping to differentiate Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum and F. necrophorum subsp. funduliforme isolated from bovine ruminal contents and liver abscesses.
12. Sanjeev Kumar Narayanan, T.G. Nagaraja, M.M. Chengappa and G.C. Stewart, 2001. - Cloning, Sequencing, and Expression of the Leukotoxin Gene from **Fusobacterium necrophorum.** Inf. and Immunity, 69, 7, 5447–5455.
13. Shinjo T., Fujisawa T. and Mitsuoka T., 1991 - Proposal of two subspecies of Fusobacterium necrophorum (Flügge) Moore and Holdeman: Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum subsp. nov., nom. rev. and Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme subsp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 395–397.
14. Shinjo T., Hiraiwa K. and Miyazato S., 1990 - Recognition of biovar C of Fusobacterium necrophorum (Flügge) Moore and Holdeman as Fusobacterium pseudonecrophorum sp. nov., nom. rev. (ex Prévot 1940). Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 71–73.
15. Tan Z.L., Nagaraja T.G., Chengappa M.M., 1992. - Factors affecting the leukotoxin activity of Fusobacterium necrophorum. Vet. Microbiol. 32, 15–28.
16. Tan Z.L., Nagaraja T.G., Chengappa M.M., 1994. - Biochemical and biological characterization of ruminal Fusobacterium necrophorum. FEMS Microbiol. Letl., 120, 81-86.

THE PHOTODYNAMIC INACTIVATION APPLICATION FOR GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE BACTERIA

TOGOE I.[1], TUDOR L.[1], GALIS Anca Maria[1], CALIN Mihaela Antonina[2]
[1]FMV Bucuresti
[2]National Institute of Research and Development for Optoelectronics INOE 2000

A possible method of non-invasive monitoring of the photodynamic action of light radiations on the bacteria is diffuse reflectance spectroscopy. The aim of this paper is to present our results regarding the application of the diffuse reflectance spectroscopy for the monitoring of the photodynamic effect induced by Toluidine Blue O as photosensitizer and laser radiation on the Gram-positive and Gram-negative bacteria. The cultures used in this study were Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa, on BHI broth, incubated for 18 hours at 37°C. The number of CFU, determined through the decimal dilutions method, was 2,5 x 10 ^{9} / ml for Staphylococcus aureus and 1,7 x 10 ^{9}/ ml for Pseudomonas aeruginosa. For photodynamic inactivation tests, there has been used the solution with the concentration: C_{TBO} = 8.67x10^{-3}M and pH = 7.4. The light source was a laser system SCL (INOE 2000, Bucharest, Romania) with P = 15 mW and emitting at wavelength λ = 635 nm. The flow used was of 8.654 J/cm^{2}. Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa cultures, were not affected by a 15 minutes-contact of the Toluidine Blue, at a concentration value of 8,67 x 10 -3 M. After the application of laser radiation for 20 minutes to the bacterial cultures in a permanent contact with the photosensitizer, there has been observed for both bacterial species involved in this experiment a reduction of more than a logarithm for CFU.

Key words: Pseudomonas, Staphylococcus, photodynamic, diffuse reflectance

The usage more and more frequently of the antibiotics in the treatment of infections had as an effect the apparition of an increasing number of bacterial stems resistant to a larger number of antibiotics. The result of this discovered phenomenon had been the continuous search of new antibiotics, capable of inactivation of resistant microorganisms to the existent antibiotics. Nevertheless, it had been seen that after a certain time from the introduction of a new antibiotic obtained by semi-synthesis, or a new class of antibiotics, it is possible an apparition of bacterial stems resistant to these even due to the fact that resistance to antibiotics is an evolutional phenomenon. Among the examples of continuous evolution and adaptation of pathogenetic bacteria to the newest antibiotics counted and all the frequencies cases of infections with Staphylococcus aureus resistant to methiciline (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus). In this context, actual research from the microbiology domain and from connected domains (biophysics, chemistry, medicine, physics, etc.) has been orientated towards development of some alternative methods from antimicrobial therapy, more quickly and more efficient, non-invasive and non-toxic and which applied repeatedly does not lead to the growth of the resistance of the bacteria [1]. Such non-invasive method, based on the utilization of the sources of luminous radiations, is currently entering in the investigatory programs of some institutes and universities from whole world, with the aim of developing a new method of treatment for infections, based on the inactivation of the bacteria through photodynamic effect. Photodynamic inactivation is based on administration of a photosensible agent that is located in the bacterial cell followed by exposure to luminous radiations with the wavelength corresponding with the maximum value of absorption of the photosensitizer. Although it is still in experimental phase, there are remarkable results obtained in the last years in the destruction through photodynamic inactivation of some bacteria capable of generating different types of infections. Thus, the studies in vitro concerning the photodynamic inactivation of species of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa by using different photosensitive substances, like methylen blue, toluidine blue O, rose bengal, phenotiazina and light radiations with the wavelengths $\lambda \in$ (350 – 800) nm had demonstrated a decrease of over 90% of viability of this cells [2– 11]. Photodynamic inactivation had been studied *in vitro* and in cases involving species of *S. mutans* and *P. gingivalis* sensitized with pink bengal and toluidine blue O and irradiated with luminous radiation at a wavelength value of λ_1 = 500 nm respective λ_2 = 632,8 nm and had been reported a meaningful decrease (90% - 100%) of viability of this two bacterial species [12-15]. In the case of wounds' contamination with Staphylococcus

aureus to mice, for the application of photodynamic inactivation, has been utilized the irradiation with coherent light with the wavelength λ_1 = 675 nm and as the photosensitizer PTMPP (meso-mono-phenyl-tri-N-methyl-4-pyridyl). Microbiological tests had demonstrated a decrease of viability of those bacteria over 98% and the clinical exam showed the total cure of wounds [16]. In all of these studies for the monitoring of biologic response have been used microbiological tests for the determination of the viability and/or colonies-forming units (CFU). In the case of in vivo applications, microbiological tests required the harvest of biopsical samples for these determinations. A possible method of non-invasive monitoring of the photodynamic action of light radiations on the bacteria is diffuse reflectance spectroscopy. This optical method has been used, in recent years, for non-invasive characterization and measurement of optical parameters of tissue. We used this method for determination of optical parameters of bacterial cultures.

The aim of this paper is to present our results regarding the application of the diffuse reflectance spectroscopy for the monitoring of the photodynamic effect induced by Toluidine Blue O as photosensitizer and laser radiation on the Gram-positive and Gram-negative bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial culture

The Gram-positive and Gram-negative bacteria used in this study were Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with large scorches. The cultures used in this study were Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa, on BHI broth, incubated for 18 hours at 37°C. The number of CFU, determined through the decimal dilutions method, was 2,5 x 10^9 / ml for Staphylococcus aureus and 1,7 x 10^9/ ml for Pseudomonas aeruginosa.

Photosensitizers and light sources

Toluidine Blue (Fluka)(TBO), an analytical grade reagent was used without further purification. Water redistilled from alkaline permanganate was used to prepare the solution. The dye was stored as aqueous stock solution for maximum 2 weeks (10^{-5}M) at 4° C in the dark, before use. For TBO dyes, only monomer forms are presumed to be present in solution (50 M TBO monomer is present in solution). Meanwhile, is not a restriction, because it is well known from the literature that this dye is active into photodynamic therapy [17]. For photodynamic inactivation tests, there has been used the solution with the concentration: C_{TBO} = 8.67x10^{-3}M and pH = 7.4. The light source was a laser system SCL (INOE 2000, Bucharest, Romania) with P = 15 mW and emitting at wavelength λ = 635 nm. The flow used was of 8.654 J/cm^2

Photodynamic inactivation

From the initial cultures of the 2 bacterial species there have been distributed 5 ml in each of the 5 Petri dishes, with a diameter of 10 cm. They were put in contact with 5 ml of TBO at a concentration value of 8,67 x 10 – 3 M and incubated in the dark for 15 minutes, and afterwards irradiated for 20 minutes at a distance of 1,5 cm. After finalizing the period of contact with the photosensitizer and after applying the laser radiation there has been determined the number of CFU through the method of decimal dilutions and through direct counting on Petri dishes.

The effectiveness of laser irradiation treatment was determined by both the diffuse reflectance spectroscopy and by determination of colonies-forming units.

Diffuse reflectance spectroscopy

Optical reflectance spectra in the wavelength range (500 – 1100) nm were obtained with AvaSpec spectrophotometer. This portable spectrophotometer is equipped with a tungsten halogen lamp, CCD detector array (2048 pixel) and a reflection probe tip FCR-7IR200-2 with one illuminating fiber in center surrounded by six fibers, which collect the light reflected from the sample. The photodynamic inactivation of bacteria was monitored just after applying TBO, before and after applying the laser irradiation. The optical properties of the bacterial culture (refractive index and absorption coefficient) indirect were determined by the Kramers-Kronig analysis of the reflectance spectra acquired with AvaSpec System.

RESULTS AND DISSCUTIONS

It is noticed that the Staphylococcus aureus culture has two main reflectance maxima, at λ_1 = 614, 15 nm and λ_2 = 681.07 nm, and Pseudomonas aeruginosa has three main reflectance maxima, localized at λ_1 = 546.61 nm λ_2 = 576.89 nm and λ_3 = 680.79 nm. The TBO photosensitizer has also two maxima at λ_1 = 613.59 nm and λ_2 = 702.13 nm. When the Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa cultures are incubated with TBO (c = 8.67×10^{-3} M) for 15 min in the dark, the reflectance spectra present some modifications.

The Staphylococcus aureus culture with TBO as added photosensitizer presents the reflectance maxima at λ_1 = 577, 89 nm and λ_2 = 708, 58 nm and a reflectance minimum $\lambda_{Sa\text{-}min}$ = 631, 02 nm. The Pseudomonas aeruginosa present also two reflectance maxima localized at λ_1 = 577, 61 nm and λ_2 = 713, 67 nm. The reflectance minimum is localized at $\lambda_{Pa\text{-}min}$ = 630.47 nm So, at the 631, 02 nm or 630.47 nm the absorption of the bacterial cultures treated with TBO is maximum and the photodynamic effect on the bacteria can be induced by laser radiation with corresponding wavelength. Therefore in this study we have used the laser system SCL-TR which emits radiation with λ = 635 nm.

At this wavelength, the values of reflectance for the Staphylococcus aureus cultures with TBO are $R_{Sa} \in$ (5.1149 – 7.2562) % with a medium value $R_{Sa\text{-}med}$ = 6.3495 %, and corresponding to 2.4 x 10^9 CFU/ ml. For Pseudomonas aeruginosa with TBO the values of reflectance are $R_{Pa} = \in$ (7.8891-10.0278) % with a medium value $R_{Pa\text{-}med}$ = 8.7681 %, and corresponding to 1.7 x 10^9 CFU / ml**.**

After exposure of the bacterial cultures treated with TBO at laser radiation for 20 min. (DE = 8.654 J/cm^2), appears a variation of the bacteria reflectance. We can observe that after laser irradiation for each sample the reflectance has been increased, more for Staphylococcus aureus and less for Pseudomonas aeruginosa. As an example, at λ = 635 nm, for the Staphylococcus aureus the variation of reflectance was $\Delta R_{med} = R_f - R_i$ = 5.4831 % and respectively ΔR_{med} = 0.6137 % for Pseudomonas aeruginosa. At this moment for Staphylococcus aureus cultures, we have 1.5 x 10^8 CFU/ ml and for Pseudomonas aeruginosa 1.3 x 10^8 CFU/ml.

This increase of the reflectance value means a decreased absorption of bacterial cultures and bacterial cells' death induced by photodynamic effect. Using Kramers-Kronig analysis of these reflectance spectra, we can determine the refractive index and absorption coefficient of the bacterial cultures. These optical parameters can be important for management and evaluation of the *in vivo* photodynamic inactivation of bacteria. Was constated that the refractive index of Staphylococcus aureus cultures (2.5 x 10^9 CFU/ ml) is n_{med} = 1.0729 at λ = 635 nm and absorbance k_{med} = 0.5345. After TBO administration, at the same wavelength, the refractive index of cultures decreased at n_{med} = 1.059. The laser irradiation induces a positive variation of refractive index while the colony-forming units decrease at 1.5 x 10^8 CFU/ ml. Therefore, there is a correlation between the number of bacterial colonies and refractive index of bacterial cultures. Based on a curve of calibration it can be determined the number of colonies from measurements of diffuse reflection. The optical parameters $n(\omega)$ and $k(\omega)$ of Pseudomonas aeruginosa at 635 nm present the same behavior like Staphylococcus aureus. In both cases, there is an inverse proportional dependence between the optical parameters of bacterial cultures and CFU after laser irradiation.

CONCLUSIONS

After concluding the investigations, the following conclusions can be drawn:

1. Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa cultures, obtained in BHI broth of 18 hours, were not affected by a 15 minutes-contact of the Toluidine Blue, at a concentration value of 8,67 x 10 -3 M.
2. After the application of laser radiation for 20 minutes to the bacterial cultures in a permanent contact with the photosensitizer, there has been observed for both bacterial species involved in this experiment a reduction of more than a logarithm for CFU.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by The Ministry of Education, Research and Youth by CEEX-Viasan 113/01.09.2006 Program.

BIBLIOGRAPHY

1. J. L. Nicholas, Photo(chemo)therapy: General Principles, *Clinics in Dermatology* **15**, 745-752, 1997;
2. Tegos G.P, Hamblin M.R, Phenothiazinium Antimicrobial Photosensitizers Are Substrates of Bacterial Multidrug Resistance Pumps Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(1), 196–203, 2006;
3. Demidova T. N., Hamblin M.R., Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation, Antimicrob.Agents. Chemotherapy, 49(6), 2329–2335, 2005;
4. Hsiao-Yin Lin, Chin-Tin Chen, Ching-Tsan Huang, Use of Merocyanine 540 for photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus planktonic and biofilm cells, Appl. And Environ. Microbiology, 70(11), 6453-6458, 2004;
5. Banfi S. E. Caruso[a], L. Buccafurni, V. Battini, S. Zazzaron, P. Barbieri, V. Orlandi, Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria , Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology , Vol. 85 (1), Pp. 28-38, 2006
6. Ashkenazi H, Yeshayahu N, Dezso G, Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on gram-positive and -negative bacteria. Photochem. Photobiol. 77(2):186-191, 2003
7. Embleton M.L, Nair P.S, Cookson D.B, Wilson M, Selective lethal photosensitization of methicillin – resistant Staphylococcus aureus using an igG-tin(IV) chlorin e6 conjugate, J. Antimicrob. Chemotherapy, 50, 857-864, 2002;
8. DeSimone N.A, Christiansen C., Dore D, Bactericidal effect of 0.95 mW Helium-Neon and 5-mW Indium-Gallium-Aluminium-Phosphate Laser Irradiation at Exposure Times of 30, 60, and 120 seconds on Photosensitized Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa In vitro, Physical Therapy, 7999), 839-846, 1999;
9. Embleton ML,Nair SP, Heywood W, Menon DC, Cookson BD, Wilson M., Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 49(9):3690-3696, 2005
10. Griffiths M.A, Wren B.W, Wilson M, Killing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro using aluminium disulphonated phtalocyanine, a light-activated antimicrobial agent, J. Antimicrobial Chemotherapy, 40, 873-876, 1997;
11. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho; Ana Paula da Costa Marques[I]; Felipe Abdalla dos Reis; Ana Carulina Guimarães Belchior; Iandara Schettert Silva; Carlos Alexandre Habitante; Daniela Aparecida Sussai, Photodynamic inactivation of *in vitro* bacterial cultures from pressure ulcers, Acta Cir. Bras. vol.21 suppl.4 São Paulo 2006
12. Osnat Feuerstein O., Moreinos D, Steinberg D, Synergic antibacterial effect between visible light and hydrogen peroxide on Streptococcus mutans, Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2006) 57, 872–876
13. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G, Lethal photosensitization of preriodontal pathogens by a red-filtered xenon lamp in vitro, J. Periodontal Res. 38 (4), pp: 428 – 435, 2003
14. Komerik N. Nakanishi H. Henderson B. Speight P. Wilson M. In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. Antimicrob Agent Chemother. 47 93). 932 – 940. 2003
15. You Chan, Chern-Hsiung Lai, Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy, Lasers in Medical Science, Vol 18, No 1, 51-55, 2003
16. Saskia A. G. Lambrechts, Tatiana N. Demidova, Maurice C. G. Aalders, Tayyaba Hasan and Michael R. Hamblin, Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice, *Photochem. Photobiol. Sci.*, , 4, 503 - 509, 2005
17. J.P.Tardivo, A.D.Giglio, C.S. de Oliveira, S.S.Gabrielli, H.C.Junqueira, D.B.Tada, D.Severino, R.de Fatima Turchiello, M.S.Baptista, Methylene Blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications, Photodiag.Photother. 2, 175-191(2005)
18. P. Grosse, V. Offermann, Appl. Phys. A **52**, 138 (1991).

OBSERVATION CONCERNING THE DEGREE OF POLLUTION WITH ARSENIC AND HEAVY METALS OF SHEEP AND GOAT MILK

TSOMPANELLIS E., FLORISTEAN V., ŞINDILAR E.V.
FMV Iaşi

The content of lead, cadmium, copper, zinc and arsenic of 20 samples of goat milk and 19 samples of sheep milk was determined using atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry.

Except cadmium and arsenic all the other evaluated elements were detected in milk samples. It was found variations of values of heavy metal concentration in relation with the origin of milk samples. The values of analyzed parameters were commonly higher in the sheep milk samples. However, the concentrations of evaluated elements in milk samples do not exceed the standards specifications.

Key words: sheep, goat, milk composition, milk quality, heavy metals, milk pollutants

Ca o consecinţă a industrializării şi urbanizării poluarea a devenit una dintre problemele cele mai acute şi actuale ale omenirii. Metalele grele, atât de utile în industrie pentru obţinerea de produse utile omenirii, scăpate în mediu, datorită stabilităţii lor mari, creează surse de contaminare directă şi indirectă pentru om care pot persista perioade mari de timp.

Arsenul, plumbul, cadmiul şi zincul au un efect complex asupra organismului uman, acesta nedezvoltând mecanisme de asigurare a homeostaziei. Cu toate că efectul nociv al acestor elemente, strâns legat de concentraţie, este binecunoscut faptul că expunerea cronică poate cauza efecte nedorite asupra sănătăţii consumatorului.

Laptele de oaie şi capră este expus în permanenţă surselor de poluare cu metale grele. Contaminarea laptelui se produce intravital dar mai ales după extragerea din glanda mamară. Studii efectuate de alţi autori arată că laptele şi produsele lactate sunt frecvent contaminate cu metale grele în cantităţi semnificative. De regulă, laptele provenit de la animalele din zonele intens industrializate este mai poluat decât laptele de la animalele din zonele rurale *(4, 5)*

Laptele de capră şi oaie precum şi produsele lactate intră frecvent în dieta omului şi ca urmare poate constitui o sursă importantă de contaminare cu metale grele.

Ţinând cont de eforturile susţinute, actuale de a se reduce nivelul concentraţiei elementelor cu potenţial toxic din mediul înconjurător, prezentul studiu îşi propune să stabilească nivelul actual de poluare a laptelui de capră şi a laptelui de oaie din Grecia, date care coroborate cu cele rezultate din alte studii vor putea fi folosite ulterior în evaluarea aportului de metale grele prin alimente şi, de asemenea, la evaluarea riscului pe care îl reprezintă prezenţa acestor toxice în laptele de oaie şi capră şi în produsele lactate rezultate din acestea separat sau în amestec.

MATERIAL ŞI METODĂ

În perioada ianuarie 2005 – decembrie 2007 au fost examinate pentru depistarea arsenului şi a metalelor grele (Cu, Cd, Pb şi Zn) un număr de 20 probe lapte de capră. 20 probe lapte de oaie şi 19 probe de amestec în diferite proporţii între laptele de oaie şi laptele de capră.

Probele au fost recoltate aleatoriu de la 4 ferme de profil din Grecia din zone cu potenţial de poluare diferit. Probele au fost recoltate, ambalate, transportate şi depozitate până la recoltare în condiţii care să reducă la minim posibilitatea contaminării suplimentare cu metale grele.

Determinarea metalelor grele vizate s-a efectuat prin metode acceptate de AOAC după cum urmează: arsenul, cadmiul şi plumbul a fost determinat prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv (Varian Vista MPX ICP-OES - SUA), iar zincul şi cuprul prin spectrofotometrie de absorbţie atomică cu flacără (Varian SpectrAA 600 - SUA). Citirea s-a făcut la lungimile de undă caracteristice iar precizia determinării a fost certificată cu materiale de referinţă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile medii ale obţinute în acest studiu variază în timp, în funcţie de specia de la care provine laptele şi de elementul evaluat.

Arsenul şi cadmiul nu au fost evidenţiate în niciuna din probele examinate. În ceea ce priveşte arsenul rezultatele sunt diferite de rezultatele publicate de alţi autori care găsesc în laptele examinat cantităţi mici de arsen are au variat între 0,05 mg/kg în regiunile puternic industrializate şi cu trafic intens şi 0,0002 mg/kg în zonele rurale ale Turciei *(8)* (*Tabel nr. 1*).

Din totalul celor 59 de probe examinate pentru determinarea metalelor grele, 34 (57,63%) au fost libere de plumb. În probele pozitive plumbul a variat între 0,02 şi 0,03 ppm.

Pe categorii de probe, plumbul a fost identificat în 75% din probele de lapte de oaie examinate, în 5% din probele de lapte de capră şi în 47,37 % din probele de lapte amestec. În medie valorile cele mai mari au fost constatate la probele recoltate de la oi în anul 2006 iar cele mai mici la probele recoltate de la capre în anul 2005 şi 2007. Probele de lapte de oaie au avut în mod constant un conţinut ridicat de plumb. La polul opus s-au situat probele din lapte de capră care au avut un conţinut mic de plumb *(Fig. nr.1)*.

Plumbul datorită utilizării masive în industrie, este unul dintre cele mai răspândite metale grele în natură ceea ce face ca acesta să se găsească frecvent în alimente şi să fie strict reglementat.

Prezenţa plumbului în lapte, chiar la valori sub limita admisă constituie un risc pentru consumatori, deoarece acesta se concentrează în produsele lactate (în special în brânzeturi) *(1)*.

Tabel nr 1

Nivelul contaminării cu arsen şi metale grele a probelor de lapte de oaie, capră şi amestec examinate în perioada 2005 - 2007

An	Categoria	Nr. Probe	Arsen si metale grele (ppm)														
			As			Zn			Cu			Pb			Cd		
			Min	Max	Media	Min	Max	Media	Min	Max	Media	Min	Max	Media	Min	Max	Media
2005	oaie	7	-	-	-	2,8	4,1	3,2	0,1	0,4	0,19	0	0,03	0,01	-	-	-
	capra	7	-	-	-	2,7	3,9	3,41	0	0,3	0,14	0	0	0	-	-	-
	amestec	6	-	-	-	2,5	4	2,9	0	0,3	0,1	0	0,02	0,01	-	-	-
	Total	20	-	-	-	2,5	4,1	3,32	0,1	0,4	0,145	0	0,03	0,007	-	-	-
2006	oaie	6	-	-	-	2,9	4,2	3,13	0	0,3	0,12	0	0,02	0,012	-	-	-
	capra	6	-	-	-	2,5	4	3,2	0	0,25	0,09	0	0,02	0,003	-	-	-
	amestec	6	-	-	-	2	3,5	2,82	0	0,2	0,075	0	0,02	0,005	-	-	-
	Total	18	-	-	-	2	4,2	3,09	0	0,3	0,094	0	0,03	0,006	-	-	-
2007	oaie	7	-	-	-	2,3	3,5	2,82	0	0,3	0,13	0	0,02	0,01	-	-	-
	capra	7	-	-	-	2,1	2,9	3,36	0	0,2	0,07	0	0	0	-	-	-
	amestec	7	-	-	-	2	3	2,33	0	0,3	0,078	0	0,02	0,005	-	-	-
	Total	21	-	-	-	2	3,5	2,5	0	0,4	0,093	0	0,02	0,005	-	-	-
Total	oaie	20	-	-	-	2,3	4,2	3,05	0	0,4	0,135	0	0,03	0,01	-	-	-
	capra	20	-	-	-	2,5	4	2,98	0	0,3	0,102	0	0,02	0,001	-	-	-
	amestec	19	-	-	-	2	4	2,66	0	0,3	0,084	0	0,02	0,007	-	-	-

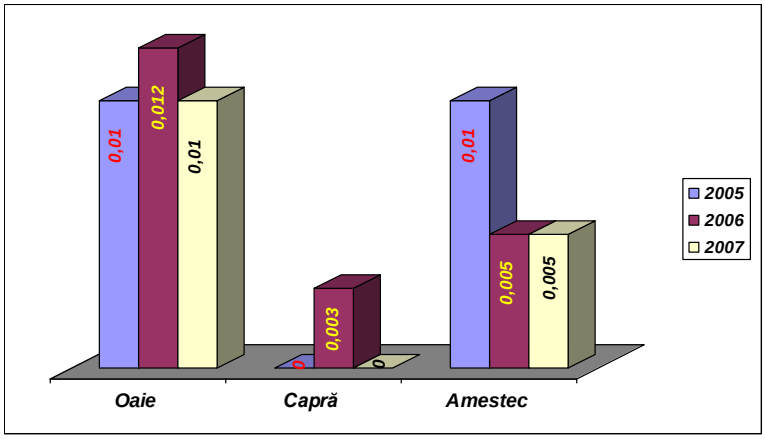


Fig. 1 – Nivelul contaminării cu plumb a probelor de lapte examinate în perioada 2005 - 2007

Cuprul a fost evidenţiat în 40 (67,8%) din probele examinate. Conţinutul de cupru din probele pozitive a variat între 0,1 şi 0,4 ppm. Simsek şi col., 2000 obţine valori similare în cazul probelor de

lapte recoltate din zonele rurale cu un potenţial mic de contaminare. În zonele industrializate cantitatea de cupru din lapte a ajuns la 0,96 ppm *(8)*.

Valorile medii cele mai mari au fost obţinute în anul 2005, la toate categoriile de probe examinate, în anii următori valorile evoluând diferit la cele trei categorii examinate. Şi în acest caz valorile medii cele mai mari au fost obţinute la laptele de oaie (*Fig. nr. 2*).

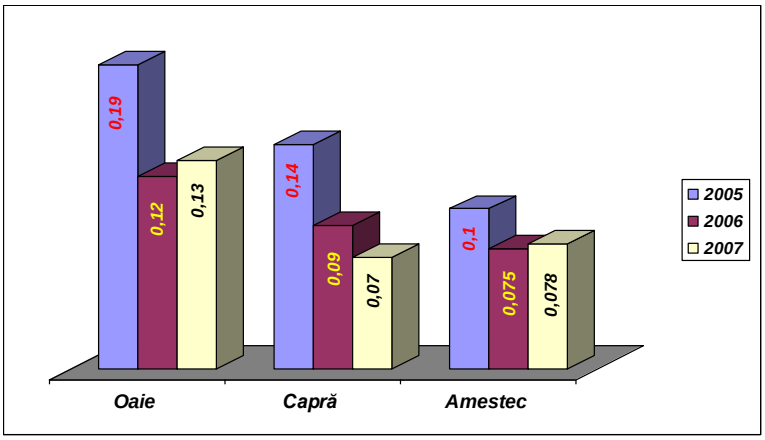


Fig. 2 – Nivelul contaminării cu cupru a probelor de lapte examinate în perioada 2005 - 2007

Cuprul este un component normal al laptelui fiind necesar pentru buna desfăşurare a metabolismului. Prezenţa cuprului în organism favorizează metabolismul fierului şi, de asemenea, participă la metabolismul glucozei şi la sinteza hemoglobinei, ţesutului conjunctiv şi a fosfolipidelor. Deficitul de cupru este rar întâlnit la om însă laptele nu este o sursă importantă de cupru pentru om. Se consideră că absorbţia cuprului din lapte este extrem de redusă *(2, 7)*.

Zincul a fost prezent în toate probele examinate având valori cuprinse între 2 şi 4,2 ppm. Valorile medii au variat între 2,33 şi 3,63 ppm şi sunt în linii mari asemănătoare cu cele publicate de către alţi autori *(3, 6, 8)*. În cazul zincului variaţiile valorilor medii au fost mult mai mici decât în cazul celorlalte metale determinate (*Fig. 3*).

Zincul este un metal care se găseşte în mod normal în lapte având un rol important în organism în maturitatea sexuală şi în mecanismele de imunitate. Este component al insulinei şi favorizează acţiunea unor hormoni. Deficitul de zinc din raţie conduce la piticism. Laptele şi produsele lactate sunt o sursă moderată de zinc contribuind în procent de 19 – 31% la aportul zilnic de zinc din dietă.

Din analiza rezultatelor se poate observa că majoritatea metalelor studiate se găsesc în cantitate mai mare în laptele de oaie fapt care se poate explica prin particularităţile de alimentaţie a oilor.

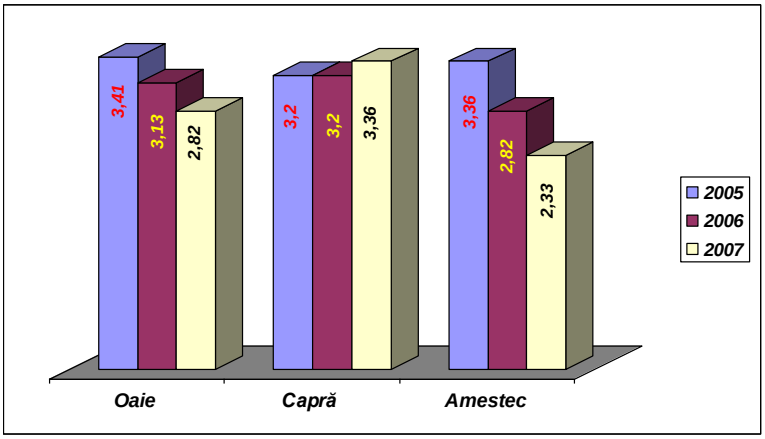


Fig. 3 – Nivelul contaminării cu plumb a probelor de lapte examinate în perioada 2005 – 2006

Compararea rezultatelor obţinute cu rezultatele publicate de alţi cercetători în urma unor studii efectuate şi pe laptele de vacă, relevă diferenţe între laptele de colectură de la cele trei specii. Se poate observa că în laptele de vacă se găseşte o cantitate mai mare de cupru decât în laptele de oaie sau de capră. Din nou, şi în acest caz, având în vedere că nu există diferenţe majore între raţiile furajere la cele trei specii, diferenţele trebuie explicate prin particularităţile metabolice ale celor trei specii (absorbţie, transport, acumulare, excreţie etc.) ceea ce face ca la un aport exogen asemănător laptele să aibă conţinut diferit.

Un alt element care trebuie luat în calcul este mediul de viaţă care poate fi mai mult sau mai puţin poluat cu metale grele de unde aceste ajung în organismul animal şi mai apoi în excreţiile acestuia. Prin urmare, pentru o interpretare corespunzătoare a nivelului de metale grele în lapte şi a variaţiilor acestora este necesară o cunoaştere a calităţii mediului în care trăiesc acestea.

CONCLUZII

1. În probele de lapte de oaie şi capră examinate concentraţia elementelor analizate s-a încadrat în limitele stabilite prin legislaţia în vigoare;
2. Arsenul şi cadmiul nu au fost prezente în probele de lapte de capră şi oaie examinate;
3. Conţinutul în metale grele a probelor examinate nu a depăşit limitele maxim admise stabilite prin legislaţia din domeniu;
4. Probele de lapte de oaie au conţinut, în mod constant cantităţi mai mari de metale grele în comparaţie cu probele din lapte de capră. Acest fapt pate fi explicat prin unele particularităţi de alimentaţie şi de metabolism a celor două specii.

BIBLIOGRAFIE

1. Anastasio, A., Caggiano, R., Macchiato, M., Catellani, P., Ragosta, M., Paino, S., Cortesi, M. L. 2006. Heavy Metal Concentrations in Dairy Products from Sheep Milk Collected in Two Regions of Southern Italy. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 47:69-74.
2. Cashman, K. D. 2003. Trace elements, nutritional significance. p. 2058-2065. *In* Roginski, H., Fuquay, J. W., Fox, F. P. (ed.), Encyclopedia of Dairy Science Academic-Press, Amsterdam.
3. Coni, E., Bocca, A., Coppolelli, P., Caroli, S., Cavallucci, C., Marinucci, M. T. 1996. Minor and trace element content in sheep and goat milk and dairy products. *Food Chemistry*. 57:253-260.
4. Corrao, A., Caracappa, S., Gallo, C. 1985. Contaminazione da metalli pesanti e composizione chimica del latte.; Heavy metal contamination and milk composition. *Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie*. 39:596-599.
5. Jeng, S. L., Lee, S. J., Lin, S. Y. 1994. Determination of cadmium and lead in raw milk by graphite furnace atomic absorption spectrophotometer. *Journal of Dairy Science*. 77:945-949.
6. Krelowska-Kulas, M., Kedzior, W., Popek, S. 1999. Content of some metals in goat's milk from southern Poland. *Nahrung-Food*. 43:317-319.
7. Park, Y. W. 2006. Goat milk - chemistry and nutrition. p. 393-406. *In* Park, Y. W., Haenlein, G. F. W. (ed.), Handbook of milk of non-bovine mammals Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK, Iowa.
8. Simsek, O., Gultekin, R., Oksuz, O., Kurultay, S. 2000. The effect of environmental pollution on the heavy metal content of raw milk. *Nahrung-Food*. 44:360-363.

OBSERVATIONS CONCERNING SEASONAL VARIATION OF SOMATIC CELL COUNT IN SHEEP AND GOAT MILK

TSOMPANELLIS E. [1], FLORISTEAN V.[1], ŞINDILAR E.V. [1]
FMV Iaşi

During the 2005 – 2007 period, the somatic cell count (SCC) from 580 goat and 670 sheep milk samples was determined, in order to better understand the factors that contribute to normal variations of SCC.

Mean values of SCC were 463.25 x 10^3 somatic cells/ml for sheep milk and 528.32 x 10^3 somatic cells/ml for goat milk. Counts for sheep were lower than counts for goats. During this study there were little variations of annual mean values of SCC. The seasonal variation of SCC values was evident for goat and less pronounced for sheep. The highest values of SCC in goat milk samples have been detected on summer period whereas in sheep milk the highest values were detected in spring although the variation interval was small.

Key words: sheep, goat, somatic cell count, milk composition, milk quality, milk hygiene

Numărul celulelor somatice din lapte este un parametru important cu ajutorul căruia se evaluează starea de sănătate a glandei mamare şi calitatea laptelui. Laptele anormal, provenit dintr-o glandă mamară suferindă prezintă modificări de compoziţie care afectează negativ randamentul la prelucrare a acestuia şi, de asemenea, conduce la obţinerea de produse cu devieri ale caracteristicilor senzoriale. Determinarea numărului de celule somatice reprezintă la ora actuală principalul mijloc de control şi de prevenire a introducerii la procesare a laptelui anormal *(2, 14, 15, 16, 17)*.

Legislaţia europeană nu a stabilit încă o limită maximă pentru numărul de celule somatice din laptele de capră şi cel de oaie. Pentru laptele de vacă, prin Directiva 92/46 EEC s-a stabilit o limită maximă admisă de 400.000 celule somatice/ml. În SUA, FDA a stabilit ca limită maximă admisă pentru laptele de vacă 750.000 celule somatice/ml şi de 1000.000 celule somatice/ml pentru laptele de oaie şi cel de capră *(10, 14)*.

MATERIAL ŞI METODĂ

Numărul de celule somatice a fost determinat la un număr de 670 probe de lapte de oaie şi 580 probe de lapte de capră. Probele au fost recoltate în recipiente speciale şi conservate cu bronopol (2 bromo-2-nitropropan– 1,3 diol) până în momentul efectuării determinării. Determinarea numărului de celule somatice s-a efectuat cu ajutorul unui aparat Fossomatic 5000 (Foss - Danemarca).

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic cu ajutorul programului Microsoft Excel 2003, calculându-se media şi deviaţia standard.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În probele de lapte de oaie numărul total de celule somatice a variat pe parcursul perioadei în care s-a efectuat studiul între 112,71 x 10^3 şi 841,75 x 10^3 CS/ml, media fiind de 463,25 x 10^3 CS/ml *(Tabel nr. 1)*.

Tabel nr. 1 - Variaţia numărului total de celule somatice din laptele de oaie în perioada 2005-2007

An	Nr. probe	NTCS/ml (x 10^3)	
2005	200	Min.	174,25
		Max.	721,11
		Media ± SD	432,25 ± 81,62
2006	200	Min.	112, 71
		Max.	784,09
		Media ± SD	468,7 ± 105,61
2007	270	Min.	181,20
		Max.	841,75
		Media ± SD	521,85 ± 76,18
Total	670	Min.	112,71
		Max.	841,75
		Media ± SD	463,25 ± 136,84

În dinamică, în perioada 2005 – 2007 a fost înregistrată o creştere progresivă a valorilor numărului de celule somatice cu toate că incidenţa mamitelor nu a înregistrat modificări semnificative în această perioadă (*Fig nr. 1*).

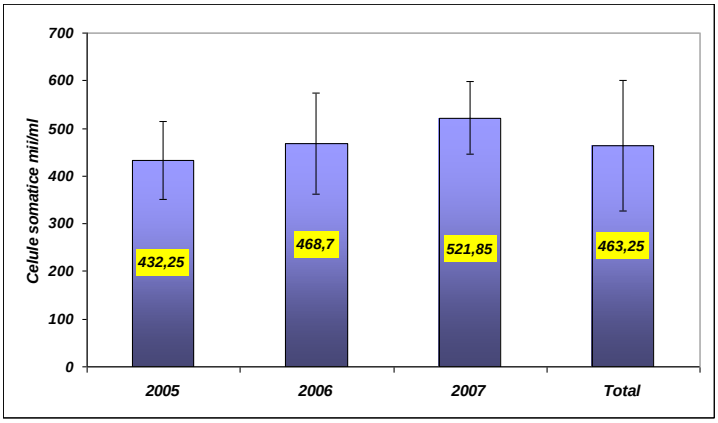


Fig. 1 – Variaţia valorilor medii ale NTCS din laptele de oaie în perioada 2005-2007

Pe perioada studiului valorile medii lunare ale numărului total de celule somatice din laptele de oaie au variat în limite relativ restrânse. Valorile medii lunare ale numărului de celule somatice din laptele de oaie au variat între 411 x 10^3 şi 518,75 x10^3. Valorile cele mai mici au fost depistate în lunile de început de an (ianuarie – februarie) iar cele mai mari în lunile martie-aprilie (Fig.2).

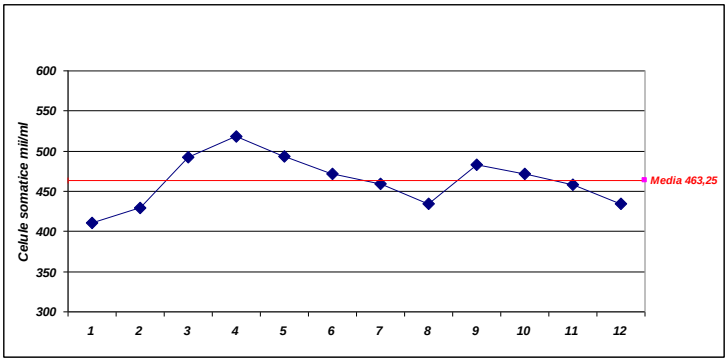


Fig. 2 – Variaţia sezonieră a NTCS din laptele de oaie în perioada 2005-2007

Numărul de celule somatice din laptele de oaie este influenţat de o multitudine de factori infecţioşi şi non infecţioşi. Cei mai importanţi factori ne-infecţioşi sunt: stadiul lactaţiei, numărul

lactaţiei, sezonul şi sistemul de creştere *(6, 7)*. În cazul glandei mamare sănătoase numărul de celule somatice este ridicat imediat după parturiţie după care scade progresiv concomitent cu trecerea de la colostru la secreţia lactată propriu-zisă şi ajunge la valori apropiate de normal (aprox. 200.000) la 5-12 zile de la parturiţie. În mod normal, şi după această perioadă numărul de celule somatice scade şi atinge punctul minim în a 5 a săptămână de lactaţie moment care coincide cu maximul lactaţiei.

Rezultatele obţinute în acest studiu sunt similare cu cel obţinute de Romeo şi col. *(13)*, care la oile sănătoase obţin valori medii lunare care nu depăşesc 477.000 celule somatice, în timp ce la oile cu mamită obţin valori care depăşesc întotdeauna 1,5 x 10^6 celule somatice/ml de lapte. Creşterea sezonieră a numărului de celule somatice în laptele de oaie este strâns legată de momentul fătărilor şi de curba lactaţiei care scade în lunile de vară. Alimentaţia ca factor de influenţă al numărului de celule somatice nu a fost bine studiat dar s-ar părea că schimbările de alimentaţie antrenează modificări ale numărului de celule somatice. De asemenea, rasa constituie un alt factor care afectează numărul de celule somatice din laptele de oaie *(5)*.

Se consideră că numărul maximim de celule somatice caracteristic unor animale sănătoase este de 250.000/ml, animalele în a căror lapte se găseşte un număr mai mare de celule somatice sunt suspecte de mamită. În condiţiile studiului efectuat valorile medii se situează deasupra acestei valori maxime ceea ce sugerează faptul că o parte din probele examinate proveneau de la animale cu mamite subclinice. În condiţiile studiului efectuat cel mai important factor care au determinat variaţia numărului de calule somatice au fost stadiul lactaţiei. Efectul temperaturilor ridicate din sezonul cald asupra numărului de celule somatice nu a fost evident, în lunile de vară numărul de celule somatice fiind sub media anuală.

La laptele de capră, determinarea numărului total de celule somatice a relevat pentru perioada studiului o valoare medie de 528,32 x 10^3/ml cu valori individuale cuprinse între 179,83 x 10^3/ml şi 932,11 x 10^3/ml. Pe parcursul celor trei ani valorile medii anuale au variat între 502,13 x 10^3CS/ml în 2007 şi 542,73 x 10^3 CS/ml în anul 2006 (*Tabel nr. 2*).

Tabel nr. 2 - Variaţia numărului total de celule somatice din laptele de capră în perioada 2005-2007

Anul	**Nr. probe**	**NTCS/ml (x 10^3)**	
2005	200	Min.	192,83
		Max.	853,42
		Media ± SD	529,41± 32,12
2006	200	Min.	202,71
		Max.	881,23
		Media ± SD	542,73 ± 48,20
2007	180	Min.	179,83
		Max.	932,11
		Media ± SD	502,13 ± 73,11
Total	580	Min.	179,83
		Max.	932,11
		Media ± SD	528,32 ± 51,93

Valorile deviaţiei standard ne arată că nu au existat diferenţe foarte mari între valorile individuale sau dacă au fost acestea au constituit excepţii *(Fig. 3)*.

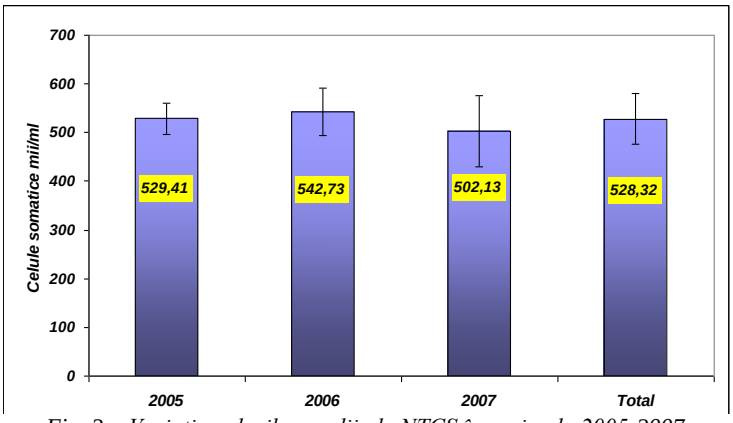


Fig. 3 – Variaţia valorilor medii ale NTCS în perioada 2005-2007

Valorile medii lunare pe perioada studiului au variat între 236,19 x 10^3 CS/ml şi 897,22 x 10^3 CS/ml. Valorile cele mai mici au fost înregistrate în lunile de la începutul anului şi în cele de la sfârşitul anului iar cele mai mari valori au fost depistate în sezonul călduros *(Fig. 4)*.

Valorile NCS din laptele de capră obţinute în acest studiu sunt apropiate de cele obţinute de Zeng şi col. *(17)* care au obţinut valori medii de 0,61 x 10^6 aceştia utilizând tehnici şi metode asemănătoare. Valoarea medie din acest studiu a fost inferioară celor obţinute de Pettersen *(12)* şi a cel0r obţinute de Andrade şi col. *(2)*, însă aceştia au folosit ca metodă de determinare, metoda clasică a numărării directe cu albastru de metilen care nu este specifică pentru materialul nuclear şi nu este recomandată pentru determinarea celulelor somatice la capră, în laptele căreia există corpi citoplasmatici care interferează numărătoarea *(3, 9, 11)*.

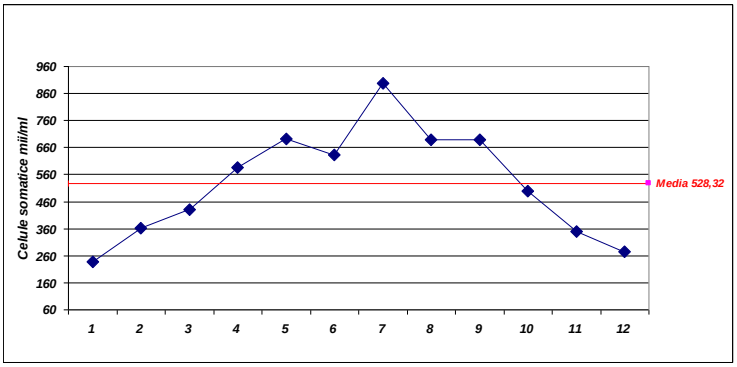


Fig. 4 – Variaţia sezonieră a NTCS din laptele de capră în perioada 2005-2007

La capră se constată în mod normal o creştere progresivă a numărului celulelor somatice mai evidentă la începutul lactaţiei şi în intervalul dintre luna a 5 a şi luna a 8 a de lactaţie. Valoarea maximă a NCS se atinge în perioada de vară fapt constat şi de alţi autori *(4)*. Acest vârf al valorilor este explicat de către cercetători prin influenţa combinată a factorilor de mediu şi a creşterii concentraţiei estrogenilor în sânge *(1)*.

Kalogridou-Vassiliadou şi col. *(8)* observă acelaşi efect de creştere şi respectiv descreştere a NCS pe parcursul lactaţiei folosind ca metodă de detecţie testul CMT însă reacţiile pozitive obţinute de aceştia sunt rezultatul unor stări patologice a glandei mamare şi ca urmare nu se recomandă folosirea acestui test la caprine mai ales în această perioadă de creştere normală a numărului de celule somatice.

Valorile obţinute în acest studiu nu au fost caracteristice stării de mamită dacă se iau în considerare variaţiile normale ale NCS. Totuşi, pentru o mai bună supraveghere a stării de sănătate a glandei mamare şi a calităţii laptelui materie primă, se recomandă efectuarea de teste combinate.

CONCLUZII

1. Valorile numărului total de celule somatice din laptele de capră şi laptele de oaie au variat în limite normale, dacă se face comparaţia cu datele publicate în literatura de specialitate;
2. În laptele de oaie numărul de celule somatice s-a păstrat în limite relativ constante pe tot parcursul lactaţiei cu două maxime (aprilie şi octombrie) şi un minim în luna august;
3. În laptele de capră numărul de celule somatice a crescut progresiv pe tot parcursul lactaţiei, atingând maximul în lunile de vară;
4. Valorile medii obţinute în acest studiu nu sunt caracteristice stării de mamită, dacă se face interpretarea în conformitatea cu variaţiile normale ale numărului de celule somatice, aşa cum rezultă din literatura de specialitate;

BIBLIOGRAFIE

1. Aleandri, M., Fagiolo, A., Calderini, P., Colafrancesco, R., Giangolini, G., Rosati, R., De Michelis, F. 1994. Studies conducted on somatic cells count of goat milk. *In: Proceedings of the Symposium on Somatic Cells, Milk of Small Ruminant, 1994, Bella, Italy.* :25 -27.
2. Andrade, P. V. D., Souza, M. R., Borges, I., Penna, C. 2001. Enumeration of somatic cells in goat milk. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*. 53:396-400.
3. Dulin, A. M., Paape, M. J., Wergin, W. P. 1982. Differentiation and Enumeration of Somatic-Cells in Goat Milk. *Journal of Food Protection*. 45:435-439.
4. Gomes, V., Libera, A. M. M. P. D., Paiva, M., Madureira, K. M., Araújo, W. P. 2006. Effect of the stage of lactation on somatic cell counts in healthy goats (Caprae hircus) breed in Brazil. *Small Ruminant Research*. 64:30-34.
5. Gonzalez Rodriguez, M. C., Gonzalo, C., San Primitivo, F., Carmenes, P. 1995. Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*. 78:2753-2759.
6. Gonzalo, C., Carriedo, J. A., Baro, J. A., San Primitivo, F. 1994. Factors influencing variation of test day milk yield, somatic cell count, fat, and protein in dairy sheep. *Journal of Dairy Science*. 77:1537-1542.
7. Gonzalo, C., Carriedo, J. A., Blanco, M. A., Beneitez, E., Juarez, M. T., Fuente, L. F. d. l., San Primitivo, F. 2005. Factors of variation influencing bulk tank somatic cell count in dairy sheep. *Journal of Dairy Science*. 88:969-974.
8. Kalogridou-Vassiliadou, D., Manolkidis, K., Tsigoida, A. 1992. Somatic cell counts in relation to infection status of the goat udder. *Journal of Dairy Research*. 59:21-28.
9. Paape, M. J., Dulin, A. M., Wergin, W. P., Guidry, A. J., Weinland, B. T. 1980. Differentiation and Enumeration of Somatic-Cells in Goat Milk. *Journal of Dairy Science*. 63:123-124.
10. Paape, M. J., Wiggans, G. R., Bannerman, D. D., Thomas, D. L., Sanders, A. H., Contreras, A., Moroni, P., Miller, R. H. 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*. 68:114-125.
11. Perrin, G. G., Baudry, C. 1993. Somatic cell counts in goat milk. *Lait*. 73:489-497.
12. Pettersen, K. 1981. Cell content in goat's milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 22:226-237.
13. Romeo, M., Esnal, A., Contreras, A., Aduriz, J. J., Gonzalez, L., Marco, J. C. 1996. Evolution of milk somatic cell counts along the lactation period in sheep of the Latxa breed. *Somatic cells and milk of small ruminants Proceedings Bella, Italy, 25 27 September 1993*.
14. Sabau, D., Rotaru, O. 2006. Evolutia s semnificatia numarului si configuratiei celulelor din lapte la oaie si capra.; The evolution and significance of the somatic cell number and configurance from goat and sheep milk. *Lucrai Stiinifice Medicina Veterinara, Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara "Ion Ionescu de la Brad" Iasi*. 49:621-625.
15. Silva, E. R. d., Araújo, A. M. d., Pinheiro, R. R., Alves, F. S. F. 2005. Effect of stage of lactation and parity order on the milk cell content in crossbreed goats. *Efeito do estágio de lactação e da ordem de parto sobre o conteúdo celular do leite de cabras mestiças*. 11:81-86.
16. Zeng, S. S., Escobar, E. N. 1996. Effect of breed and milking method on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. *Small Ruminant Research*. 19:169-175.
17. Zeng, S. S., Escobar, E. N., Popham, T. 1997. Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. *Small Ruminant Research*. 26:253-260.

THE ASSESSMENT OF MICROBIOLOGICAL QUALITY OF SOME CHEESE ASSORTMENTS

TUDOR L., ŢOGOE I., MITRĂNESCU Elena, FURNARIS F., GONCEAROV Magdalena
FMV Bucureşti
donlorenzofmv@yahoo.com

It has been analyzed a total number of 954 cheese samples. The samples have been harvested from 9 types of cheese in different market places. The obtained statistical analyzed results have led to the conclusion that all types of cheese have been recorded unconformingly samples. It has been noticed either the getting over of some microbial parameters (coliforms, coagulase-positive staphylococci, sulphite-reducing bacteria) or the presence of some pathogen and opportunistic bacteria (Clostridium perfringens has been isolated from 1.68% samples; Proteus sp. has been isolated from 0.84% samples).

Key words: cheeses, bacterial, yeast, moulds, parameters

Microbiological quality of cheeses is a part of food safety field, due to the fact that there can be generated a range of diseases to consumers by the presence into the alimentary products of pathogen and opportunistic bacterial species, or by the degradation of nutritive substratum resulting toxic metabolites [2, 4, 5]. Based on this, in the recent years there have been run large programs of milk processing units modernization and there has been purchased high-quality equipment in order to ensure a decreasing of the contaminants number in the final product, for the same purpose being imported and adapted new technologies and processing chains, more efficient and conformingly to the up-to-date hygienic requirements in processing [5, 8].

Firstly, the direct effect of these measures was the milk products quality improvement generally, as well as the improvement of the microbiological and physical-chemical parameters of the intermediary and final products, but there has been no significant influence on the quality of the final products analyzed in the selling points. Especially the cheeses are marketed, even in some super-market selling points, in inadequate conditions: different types of cheese are presented (with or without moulds in the paste) with no complying with the minimal conditions of cross-contamination preventing, there are presented products without being prepackaged, many products are displayed in open shop windows, the products slicing is made with no complying with minimal hygienic standards. It is important that the economical representatives with interest in food industry assimilate the new concepts in alimentary hygiene and focus on the entire food-chain: raw material – final product – merchandise. Only a dynamic analysis of milk products will provide to the market healthy products, which would totally preserve their hygienic characteristics.

MATERIAL AND METHOD

There have been harvested cheeses samples from various selling points in Bucharest, the present study aiming to cover many different types of cheese, made by different economic units and marketed in different selling units. The types of cheese were: green cheese, salted cheese (cottage cheese) and cheese with scalded and spun paste, fermented cheese. The harvested samples were delivered in sterile containers in optimal temperature conditions. The samples processing was made in the alimentary microbiology laboratory according to the microbiological STAS regulations and standardized ISO methods [10, 11].

The study was made during a period of one year (during 2005), being analyzed 954 samples (125 green cheese samples, 114 salted cow cheese samples, 96 salted sheep cheese samples, 89 salted mixed cheese samples, 128 Dalia pressed cheese samples, 157 Rucar pressed cheese samples), 79 mozarella samples, 54 Tilsit samples and 112 samples of smoked pressed cheese). In order to establish the total aerobic heterotrophic mezophilic bacteria (TAHMB) there have been made decimal dilutions in peptonated water. From each dilution it was distributed, with sterile dropper, 1 ccm in each of the 2 Petri plates. In each Petri plates was mold agar melted and cooled at 40 – 45°C, it was stirred and incubated for 24 hours at 37°C. It was assessed the mean of CFU/g product [1, 3, 11]. In order to establish the probable number of coliform bacteria there were made decimal dilutions; from each of them 1 ml was put in 3 tubes with BGBB medium (brilliant green bile broth) and 1 Durham

tube. It has been incubated for 24-48 hours at 37°C. The interpretation was made based on gas production and following 3 numbers mean calculation (according to the score for each of the three tubes with BGBB medium), the obtained mean being read following Mac Grady table. In addition, there has been used the method of establishing coliform bacteria number by colonies counting (ISO 4832). From the decimal dilutions it is distributed 1 ml in two Petri plates. In each plate is mold VRB agar (agar and lactose, bile salts, crystal violet and indicator), melted and cooled at 45°C. The above prepared plates are incubated at 35°C for 24 hours. After the incubation the red-purple colonies are counted and the mean value is calculated with the formula: $N = \Sigma c/(n_1 + 0,1\ n_2)\ d$ (where Σ c is the sum of counted colonies; n_1 is the number of plates to be counted from the first dilution; n_2 is the number of plates to be counted from the second dilution; d is the dilution rate corresponding to the first used dilution) [1, 3, 11].

In order to establish the pathogen and opportunistic germs species there were used standardized ISO methods: SR ISO 6597 for identifying Salmonella bacteria, STAS ISO 6888 for identifying coagulase-positive staphylococci, SR 2356/1 for identifying Proteus bacteria, STAS ISO 4832 for identifying Escherichia coli bacteria, SR ISO 7251 for establishing the probable number of E. coli, SR ISO 7932 for identifying Bacillus cereus species, STAS 12965-91 for establishing the moulds number, STAS 12964-91 for establishing the yeasts number etc. [1, 11].

All the isolated bacterial strains presumptively identified as pathogen or opportunistic were biochemically tested for confirmation diagnosis; the scientific data obtained being thus rigorously demonstrated.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to compare and to understand the meaning of the obtained results, in the results interpretation it was used the 975/1998 Health Ministry Order with respect to sanitary hygienic regulations for aliments. The microbiological parameters provided in this order are shown in table 1.

Table no. 1 Microbiological requirements for food and raw materials (Health Ministry Order 975/1998)

No.	Product	Coliform bacteria	E. coli	Salmonella	CPS	TNYM
	Fresh cheeses made from pasteurized milk	100	10	absent	10	-
	Fresh cheeses made from unpasteurized milk	1’000	100	absent	10	-
	Fresh cheeses: green cheese, fresh cottage cheese from pasteurized milk	10	1	absent	10	100
	Fresh cheeses: green cheese, fresh cottage cheese from unpasteurized milk	100	10	absent	100	300
	Fresh cheese from whey (urda)	1’000	100	absent	10	-
	Cheeses ripened in drain: green cheese, cottage cheese from pasteurized milk	10	absent	absent	10	1’000
	Cheeses ripened in drain: green cheese, cottage cheese from unpasteurized milk	100	10	absent	100	2’000
	Fermented cheeses	10	absent	absent	10	2’000
	Cheeses with scalded and spun paste	10	absent	absent	10	1’000
	Kneaded cheeses	100	10	absent	10	200

CPS – coagulase positive staphylococci
TNYM – total number of yeast and moulds

Table no. 2 The microbiological analysis results for cheeses products samples

Product type	Bacteriologic parameter studied									
	Coliform bacteria		E. coli		CPS		B. cereus		SR bacteria	
	No. of samples	%	No. of samples	%	No. of samples	%	No. of samples	%	No. of samples	%
Green cheeses	12	9.68	4	3.22	15	12.09	4	3.23	1	0.81
Salted cheeses (cow's milk)	17	14.78	7	6.09	21	18.26	2	1.74	5	4.35
Salted cheeses (sheep milk)	5	5.10	1	1.02	5	5.10	2	2.04	-	-
Salted cheeses (mixed milk)	4	4.59	-	-	2	2.29	1	1.15	2	2.29
Dalia pressed cheese	2	1.57	-	-	1	0.79	1	0.79	-	-
Rucar pressed cheese	28	17.83	11	7.01	22	14.01	4	2.55	10	6.37
Mozzarella	-	-	-	-	14	17.95	-	-	-	-
Tilsit cheese	-	-	-	-	2	3.57	-	-	-	-
Smoked pressed cheese	-	-	-	-	7	6.25	-	-	-	-

CPS – coagulase – positive staphylococci
SR bacteria – suphite-reducing bacteria

The results obtained following the complete bacteriological analysis of each harvested and processed sample were statistically processed and average values are calculated for each type of product. The total aerobic heterotrophic mezophilic bacteria had mean value between relatively large limits: green cheeses – 2.4 x 10^3; cottage cheeses made from diary unpasteurized milk – 1.7 x 10^4; ewe cottage cheeses – 1.2 x 10^2; fresh cottage cheeses made from mixed milk - 2.9 x 10^2; Dalia pressed cheese – 2.1 x 10^2; Rucar pressed cheese – 4.8 x 10^4; mozzarella – 6.7 x 10^3; Tilsit cheese – 2.1 x 10^2; smoked pressed cheese – 2.7 x 10^2. Although for the different types of analyzed cheese this parameter is not regulated, we consider that the obtained values reveal an important number of contaminants.

Table no. 3 The microbiological analysis results for cheeses products samples

Product type	Bacteriological parameter studied									
	Proteus		Clostridium perfringens		Total Number of Fungi		Aspergillus sp.		Mucor sp.	
	No. of samples	%	No. of samples	%	No. of samples	%	No. of samples	%	No. of samples	%
Green cheeses	-	-	2	1.61	2	1.61	-	-	-	-
Salted cheeses (cow's milk)	-	-	4	3.48	-	-	-	-	-	-
Salted cheeses (sheep milk)	-	-	1	1.02	-	-	-	-	-	-
Salted cheeses (mixed milk)	-	-	-	-	1	1.15	-	-	-	-
Dalia pressed cheese	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rucar pressed cheese	1	0.64	2	1.27	4	2.55	1	0.64	-	-
Mozzarella	2	2.56	4	5.13	-	-	4	5.13	7	8.97
Tilsit cheese	1	1.79	1	1.79	4	7.15	2	3.57	-	-
Smoked pressed cheese	4	3.57	2	1.79	2	1.79	2	1.79	1	0.89

The microbiological analysis for assessing the number of coliform bacteria, Escherichia coli and coagulase-positive staphylococci has proved a range of exceeds comparatively to the maximum allowed values. The microbiological analysis for assessing the number of sulphite reducing bacteria and Bacillus cereus has proved the presence of these bacterial species in the studied samples; although the above germs numbers are not regulated, the samples that recorded higher values than admitted limits in EU were considered inadequate. The statistical analysis of the results led to the conclusion that the majority of products recorded a number of unconforming samples.

The number of samples which recorded exceeds and the percent of unconforming samples are shown in table 2.

From all the analyzed samples there have been not isolated bacteria belonging to Salmonella genus. Alternatively, there have been isolated bacteria belonging to Proteus genus, Clostridium genus and some samples were overloaded with yeasts and moulds (more that 1 x 10^4). There has been noticed also, in the case of some cheeses, the presence of certain moulds species either producing toxic metabolites (Aspergillus), or degrading the biochemical structure of proteins and lipids and altering organoleptic indicators (Mucor sp.). The number of positive samples and their percent from all the analyzed samples for each type of aliment are shown in table 3.

Based on the obtained results following the bacteriological analysis it is proved that a range of products are contaminated either during transportation, or directly in market, due to the inadequate storage conditions or temperature for a certain product.

The presence of the Aspergillus and Mucor species was noticed in Rucar and smoked pressed cheese maintained on refrigeration temperatures (0 – 6°C), which leads to the protection layer moisture and allows moulds spore spreading (frequently noticed in pressed cheese kept in low temperatures for several weeks) [4, 5, 6, 7].

CONCLUSIONS

1. All types of cheese analyzed have recorded unconforming samples concerning microbiological parameters. There are 3 types of cheese to be noticed: green cheeses, salted cheeses (cottage cheese) made from cow's milk, and Rucar pressed cheese, which have recorded the highest number of unconforming samples, for the majority of the analyzed microbiological parameters.
2. Following microbiological analysis none of the products has recorded samples contaminated with germs belonging to Salmonella genus.
3. Microbiological examination conducted in order to identify bacteria belonging to Proteus genus revealed such bacteria presence in eight samples, four of them in a single type of product (smoked pressed cheese).
4. Clostridium perfringens sp. was identified in 16 samples (1.68% from the total number of analyzed samples), the highest number of positive samples being recorded in the following types of cheese: salted cheeses (cottage cheese) made from cow's milk (3.48%), and mozzarella (5.13%).

BIBLIOGRAPHY

1. Barzoi D., 1985, Microbiologia produselor alimentare de origine animala. Ed. Ceres, Bucuresti
2. Barzoi D., S. Meica, M. Negut, 1999, Toxiinfectiile alimentare. Ed. Diacon Coresi, Bucuresti
3. Barzoi D., S. Apostu, 2002, Microbiologia produselor alimentare. Ed. Risoprint, Cluj-Napoca
4. Bondoc I., E.V. Sindilar, 2002 ,Controlul sanitar veterinar al calitatii si salubritatii alimentelor, Vol I. Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iasi
5. Popa G., V. Stanescu, 1981, Controlul sanitar veterinar al produselor de origine animala. Ed. didactica si pedagogica, Bucuresti
6. Popescu N., S. Meica, 1995, Bazele controlului sanitar veterinar al produselor de origine animala. Ed. Diacon Coresi, Bucuresti
7. Rotaru O., M. Mihaiu, 2001, Igiena veterinara a produselor alimentare. Ed. Risoprint, Cluj-Napoca
8. Savu C., Carmen Petcu, 2002, Igiena şi controlul produselor de origine animală. Ed. SemnE, Bucuresti
9. Tudor L., 2005, Sanitary veterinary control and technology of animal origin products. Ed. Printech, Bucuresti
10. *** SR – ISO – Standarde de analize microbiologice pentru produsele de origine animala

YERSINIA ENTEROCOLITICA RAPID METHOD FOR ISOLATION AND IDENTIFICATION FROM FOOD PRODUCTS

TUDOR L.[1], ŢOGOE I.[1], MITRĂNESCU Elena[1], TUDOR Laura Aneta[2]
[1] FMV Bucureşti
[2]FMV Spiru-Haret Bucureşti

The research was performed to optimize the methodology diagnosis of Yersinia enterocolitica from different categories of samples. Following this objective, in the first stage the general technique of collecting and processing the samples was adapted and optimized, raising the diagnosis rapidity. In a second stage of research there have been artificially contaminated different types of samples with Yersinia enterocolitica stems, checking the efficiency and accuracy of optimized method.

The last stage of research was directed to constituting a methodological scheme to assure rapidity and identification diagnosis for Yersinia enterocolitica species.

The actuality and the interest exercised by the *Yersinia sp.* are determined by the fact that these bacterial species generate a series of morbid entities which are under the attention of many bacteriologists, epidemiologists and doctors. On the theme of the infections produces by these bacteria in the latest years have been published numerous studies, and the research in this domain acquired a special amplitude. In the last decade of the passed millennium, numerous researches pulled the attention that the bacterial species in *Yersinia genus* are frequently involved, in case of human beings, in production of alimentary toxic infections manifested by diarrheas acute syndrome.

From a clinical point of view these yersinioses do not present special complications and are efficiently treated, the epidemiological risk is important, being observed episodes that comprised hundreds of cases (3, 8, 11, and 12). Initially, *Yersinia pestis* species was considered to have the most important epidemiological risk. Afterwards, many groups of research observed that they are involved in food toxic infections in humans and other species of animals. In present days, although there have been discovered and comprised taxonomically many species of Yersinia, are considered principal pathogenic for humans 3 species: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. Taking into account that the contamination sources, for human beings, are represented generally by food products which are not thermally processed or subjected for short periods of time to thermic processing and at values of temperature of maximum 70°C, we considered adequate the performing of several investigation which could reveal the optimal values of temperatures for conservation and growing of *Yersinia enterocolitica* stems, the period of surviving of this bacterial species at low values of temperatures (in refrigerated or deep-frozen food products) or at raised values of temperature (in food products subjected to a thermal treatment).

MATERIAL AND METHODS

The adapted method that we used to collect and primary processing the samples include a series of differential elements concerning the biological type of products which is subjected to complex bacteriological investigations in order to diagnose the presence of bacterial species from Yersinia genus.

In case of the samples constituted of intestinal mass, integrally collected, there must be performed the aseptically opening of the caecum of swine and fowl like this: it is collected caecal content using the culture loop and it is seeded directly on the surface of CIN medium and SSDC medium (Wauters). The incubation is realized in a thermostat at the temperature of 30°C for 24-48 hours. The same samples are diluted in 10 ml of physiological serum (the cecum content left on the culture loop is introduced in test tubes with diluent's), and after the dilution and homogenizing 1 ml in this suspension it is introduced in 9 ml KOH solution 0,25 % in 0.85 % NaCl and it is agitated for 10 seconds. The content of a loop (0,1) ml is passed over the surface of the selective isolation media (CIN, SSDC). The seeded dishes are incubated for 24-48 hours at 30°C in aerobic conditions.

In case of organs collected integrally (liver, kidney, gizzards and fowl hearts) and samples of muscle tissue: 10 g of product are weighed aseptically, introduced in sterile bags; over the sample are introduced 10 ml of diluent (physiological peptonate serum); it is realized the grinding and the

homogenization in a stomacher model 400 for 2-3 minutes; from the homogenized are taken 10 ml and introduced in a vial with 90 ml of enrichment broth PSB (percentage of 1/10). The incubation of the seeded enrichment broths is realized at 25°C, for 5 days, and after the addition of the selective agents (irgasan and ticarcylin) at the used medium, the incubation is continued at 12°C for another 24 hours. For the selective isolation media directly seeded or after decontamination with KOH, the incubation is realized in aerobiosis, at 30°C, for 24-48 hours. At the end of specific incubation periods of each enrichment medium used a loop full of culture obtained is passed over the CIN and SSDC gelose, and the dishes are incubated in the same temperature conditions.

In case of samples collected through stippling of the surface and interior of the carcasses: the swabs are introduced aseptically in test tubes with 5 ml PSB medium, for homogenizing and movement of the germs by hitting with energy the test tube against the palm for 30 times, until the swab is deteriorated; the content of a loop from the homogenized preparates is passed over the dishes with selective media (CIN, SSDC), incubating 24-48 hours at 30°C. Another technique used by the authors is the enrichment of the same swabs for 5 days for the suspensioned ones in PSB medium, respectively for 24 hours, adding the selective supplements, followed by a reincubation for 24 hours at 12°C, in case of using ITC medium. After enrichment, a loop with culture is passed over the surface of selective isolation media. The seeded dishes are incubated at 30°C for 24-48 hours. After 48 hours incubation the dishes are examined in order to establish the presence of characteristic colonies. The Gram dyeing method is realized from the characteristic colonies (using 1 ml of physiological serum for dilution); from the dilutions retained it is sectorially seeded the ITC medium. After incubation in the conditions described earlier, the pure cultures serving for performing of some biochemical tests, as it follows: after 24-48 hours from the incubation it is done the test for marking out the urease and ornithin-decarboxylase, the absence test for lysin-decarboxylase and oxidase, the absence test of citrate utilization and for producing H_2S, the test of esculin hydrolyze, the test for using some saccharides (glucose) and the absence of using others (lactose) on Kligler medium and the test of using saccharose, salicin and rhamnose.

For milk samples: after collecting the product in strict aseptically conditions, the pH is adjusted at 7,4 units; the samples are introduced in a centrifuge, at 2500 rpm, for 15 minutes (centrifugation is realized at refrigeration temperatures, in centrifuge tubes of 25 ml capacity, in which are introduced 10 ml of sample); the supernatant is separated from the deposit and this last one is used for seeding directly on the selective isolation media, but especially in case of thermal or chemical treated milk, besides the direct seeding on selective media is realized also the enrichment in percentage of 1/10, afterwards the other stages to follow in the way described earlier.

RESULTS AND DISCUSSIONS

In case of using the method ISO 10273/1994, the collecting of the samples from animal food products is realized in strictly aseptic conditions. Form each sample to examine are taken 10 g of muscle tissue for the samples of meat, or, in case of any other situation, 10 ml of milk or milk product which are introduced in the two enrichment media, obtaining this way a percentage of 1/10 or 1/100 (percentage mass/volume or volume/volume).

The enrichment is realized on two selective liquid media:

- - 10 g (ml) of sample are introduced in 90 ml of PSB medium (peptone-sorbitol-biliar salts broth), obtaining a percentage of 1/10. The incubation is performed at 25°C for 5 days.
- - 0,1 g (ml) of sample are introduced in 90 ml of ITC medium (irgasan-ticarcylin-potassium chlorate broth), obtaining a percentage of 1/100. The incubation is performed at 25°C for 2 days.

In order to isolate and identify, a culture loop from the enrichment broth PSB is seeded directly on the surface of CIN agar and 0,5 ml of culture from the same medium is transferred in 4,5 ml KOH, saline solution 0,25 % and it is homogenized for 10-20 seconds. After homogenization a culture loop is passed over the surface of CIN agar. In parallel a loop with culture obtained in the enrichment broth ITC is passed over an SSDC gelose (Salmonella-Shigella, with sodium desoxycholate and calcium chloride). The dishes incubation is realized at 30°C, in aerobiosisi, for 24 hours. After 24 hours the dishes are examined with a magnifying glass or in oblique light for examining the presence

of characteristic colonies of Yersinia enterocolitica. On the surface of CIN gelose, the characteristic colonies are small (1 mm), flat, with a red center, surrounded by a pink margin, semitransparent (characteristic aspect of an "ox eye") and bile precipitate, and, at examination under oblique light, are tiny granulated and noniridescent. On the surface of Wauters gelose (SSDC), the characteristic colonies are small (1 mm), grey, with a thin margin, and by examining in oblique light, are tiny granulated and noniridescent.

For confirmation, it is selected a number of 5 characteristic colonies and/or suspect ones from the dishes with selective culture media, which were reintroduced on the surface of some dishes containing nutritive gelose in order to obtain a pure culture for confirmation through biochemical tests. The dishes with seeded nutritive agar are incubated at 30°C for 24 hours.

In case of using the Identification System API 20E, it is permitted the identification in 24 hours of germs from Yersinia genus, and also of other enteric bacteria, but it is necessary the initial obtaining of a purified subculture, the methodology comprising a period of minimum 48 hours. The gallery presents 20 microtubes which contain dehydrated substrates for marking out enzymes, assimilation of carbohydrates or inhibitions tests. The gallery comprises 2 parts: the first one contains the enzymatic tests and the conventional ones and the second part contains the assimilation and inhibitions tests.

The dehydrated substrates were inoculated with a germ suspension which helped rehydrating these ones. The reactions showed during incubation period (at 37°C, in aerobiosis) manifested spontaneous modifications of color, or marking out color by adding some reagents. After 24 hours incubation at 37°C, the reading of reactions was performed visually, using the reading and identifying table or the identification catalogue API 20E. The gallery can offer and realize: an enzymatic reaction that marks out the beta-galactosidase (ONPG); 5 classical chemical reactions: urease (URE); the reduction of nitrates in nitrites (NO_2); the production of H_2S; the indole production (IND); the acetoin production (VP); 10 assimilation reactions: glucose assimilation (GLU); mannitol assimilation (MAN); inositol assimilation (INO); sorbitol assimilation (SOR); rhamnose assimilation (RHA); saccharose assimilation (SAC); melibiose assimilation (MEL); amygdaline assimilation (AMY); arabinose assimilation (ARA); citrate assimilation (CIT); an enzymatic reaction which marks out the gelitinase (GEL); an enzymatic reaction which marks out dehydrolase: arginin-dehydrolase (ADH); 2 enzymatic reactions which mark out decarboxylase: lysin-decarboxylase (LDC); ornitin-decarboxylase (ODC); an enzymatic reaction which marks out cytoxhrome-oxidase (OX); an enzymatic reaction for marking out tryptophane-desaminase (TDA).

It is initially realized a Gram dyeing technique on all the analyzed stems, and afterwards, reactions for betagalactosidase, urease, H_2S, for verifying the aparthenence of the germ to Yersinia enterocolitica species. A culture is prepared on a dish with agar CIN; the dishes are incubated at 30°C for 24-48 hours; it is verified the presence on the slideof Gram-negative cocobacilli, bipolar dyed; it is collected culture from the dish with an isolated selective medium, using a sterile swab (carefully, in order to avoid the penetrating of the medium) and it is realized a suspension in 3 ml of medium with NaOH 0,85 %, bringing the suspension at a turbidity equal to 6 on McFarland scale. The dehydrated substrates of the gallery are inoculated with the bacterial suspension, and the incubation is realized at 37°C in aerobiosis. Afterwards, the results are interpreted, using the reading table of the gallery.

The differences between the 2 methods presented initially and our optimized method can be remarked from the way of collecting and processing of samples.

In comparison with ISO 273/1994 method, in the optimized method is observed rapidity in obtaining a presumptive diagnosis, in 48 hours from the collection of the sample being determined the aparthenence to Yersinia genus. In case of using the identification galleries API 20E is necessary the obtaining in the first phase of several primary pure subcultures, this needing a minimum period of 48 hours (frequently 72-96 hours), in which it is realized the primary processing of the sample, the incubation in a liquid enrichment medium, the passing over on a solid medium surface, the forming of subcultures from isolated colonies, considered presumptively as pertaining to Yersinia genus. In case of the optimized method, the species confirmation is realized by using a battery of biochemical tests which include a series of stages and in which it is revealed also the pathogenic traits of the isolated stem.

THE RAPID SCHEME FOR IDENTIFYING YERSINIA ENTEROCOLITICA

Aseptic collection of the samples

Meat and organs
a. 10 g sample + 10 ml of physiological serum
b. grinding in Stomacher 2-3 minutes or erasing of 10 cm^2 swine carcass or fowl

Milk
a. Adjusting the pH at 7.4
b. centrifgation under refrigeration
10 ml sample at 2500 rpm for 15 minutes
c. separation of supernatant and striking 0,1 ml

The intestinal mass
a. the cecum content that remained on the loop is diluated in 10 ml physiological serum
b. 1 ml from suspension is introduced in 9 ml saline solution KOH 0,25 % and agitated for 10 seconds
c. from this suspension have been striked 0.1 ml

The direct inoculation on ITC medium
after initial decontamination with KOH
In parallel enrichment in medium adapted for 24 hours at 12°C and reincubated to 24 hours at the same temperature, after adding the selective supplement

Incubation in an aerobiosis atmosphere
at 30°C, 24-30 hours

Identification 5 or less than 5 typical colonies for:
- the test of glucose fermentation on Kligler medium
- the test lactose fermentation on Kligler medium
- the test of the H_2S production absence on Kligler medium
- incubation at 30°C, 24 hours, in aerobiosis

Confirmation on minimal tests
- urease test
- oxidase test
- ornitin-decarboxylase production test
- lysin-decarboxylase production test
- citrate utilisation test
- esculin hydrolyze
- saccharose fermentation test
- salicin fermentation test
- rhamnose fermentation test
- hemolysis test

For the presumptive confirmation tests are chosen a number of 5 colonies obtained on the surface of nutritive gelose and are tested for: morphology (a fragment was taken from each isolated colony on every dish and a Gram dyeing was performed; from each separate colony was realized a suspension in 1 ml of nutritive broth; for later observation, all the suspensions in which the Gram negative germs were observed, bacilli or cocobacilli, with round heads bipolar dyed); the indole production (a part of the isolated colonies are seeded by using a loop in a test tube containing triptone broth; the test tubes are incubated at 30°C for 24 hours, afterwards several drops of Erlich-Kovacs are added; a red color signifies the presence of a positive reaction); the urease production (by using the seeding loop or needle, a fraction from the isolated colony is taken and seeded through passing over on the slope of a Christensen agar; the incubation is realizedat 30°C for 24 hours; a pink-red color of the medium after incubation for 24 hours at 30°C signifies the presence of a positive reaction); oxidase elaboration (by using a platinum loop or a glass wand a fraction of the isolated

colony is taken and deposited or passed over a filter paper imbibed in oxidase reagent. the apparition of a violet-purple color or intense blue one in 10 seconds is interpreted as a positive reaction); the utilization of saccharides on Kligler medium (Kligler gelose is seeded with each of the colonies selected until now, by puncturing the column and striking the slope). The incubation is realized at 30°C for 24 hours and it is prolonged until 48 hours in aerophilic atmosphere; the interpretation of the reaction is performed concerning the color of the column and slope of the incubated medium, and also by the presence or absence of gases on Kligler agar the column is yellow (fermented glucose), without H_2S or gases from glucose, and the slope remains unchanged (lactose negative).

For biochemical confirmation tests, there were selected only the colonies which behaved as it follows: urease positive, indole production negative, acid from glucose positive; gas from glucose negative; acid from lactose negative; H_2S production negative; oxidase negative. Lysin decarboxylation - using a loop, a fragment of a colony is seeded on each dish, with lysin liquid medium distributed in test tubes. The incubation is performed at 30°C for 24 hours. The apparition of a violet color indicates a positive reaction, meanwhile a yellow one indicated a negative reaction. Ornitin decarboxylation - by using a loop, a fraction is taken from an isolated colony and seeded in a test tube with liquid medium containing ornitin; the apparition of a violet color after 24 hours incubation at 30°C is considered a positive reaction. The utilization of the citrate as unique source of carbon - the slope of Simmons gelose is striked with a fragment of the isolated colony. The incubation is performed at 30°C for 24 hours. The changing of the color in blue is considered a positive reaction. The utilization of carbohydrates - the liquid medium is seeded (peptonated water with phenol red or bromtimole blue), supplemented with saccharose and rhamnose. The test tubes containinh the medium are incubated at 30°C, 24 hours. The apparition of a yellow color after the incubation indicated a positive reaction, meanwhile the red color is considered a negative reaction.

For the presumptive test of pathogenity are retained only the colonies which showed the following reactions: lysin-decarboxylase negative; ornitin-decarboxylase positive; rhamnose negative; saccharose negative; citrate hydrolyze negative and the following issues are verified: the fermentation of salicin (the liquid medium is seeded - peptonated water with salicin, with a fragment of an isolated colony; the test tube with the liquid medium is incubated at 30°C for 24 hours; the apparition of a yellow color indicates a positive reaction, meanwhile a red color is considered a negative reaction); the esculin hydrolyze - using a loop, the slope of a bile-esculine agar is striked with a fragment of an isolated colony. The incubation is performed at 30°C for 24 hours; when the medium become black around the colonies, the reaction is a positive one; the Yersinia enterocolitica stems are virulent, possess plasmydes, esculin-negative, but not the biotype 1A (american), which respond in a positive way to this test; the production of pyrazinamidase - a fragment of an isolated colony is taken with a loop and passed over the slope of a cassein-soya gelose, containing pyrazinamid; after 48 hours of incubation at 30°C, 1 ml of sulphate fero-amoniacal 1 % is added; the apparition of a red-brown color indicates a positive reaction; the calcium dependence at 37°C - by using a loop it is seeded a quantity of 0,1 ml from a suspension of 10^3 cells/ml on the surface of 2 Petri dishes with cassein-soya gelose, with magnesium and oxalate; the incubation is performed at 25°C for 48 hours (a dish with cassein-soy gelose and a dish with cassein-soya gelose, with magnesium and oxalate) respectively at 37°C for 48 hours, in a similar way for the other 2 dishes; the result is considered positive, if, at 25°C, the colonies present a homogenous waist and if, at 37°C, in the presence of magnesium and oxalate, it is observed an inhibition of the culture, obtaining in the end 2 types of colonies: ones tiny, with a diameter of 0,1 mm and others large, with a diameter of 0.5-1 mm, with a percentage of the small colonies of 20 %; the point colonies are calcium-dependent and virulent, supposedly pathogens).

CONCLUSIONS

1. The collecting and primary processing of the samples for presumptive diagnosis of bacterial species pertaining to Yersinia genus, is of 48 hours maximum in case of using the optimized method, comparative with the classical methods which need a period of time relatively larger, of over 72 hours.
2. For a presumptive diagnosis of confirmation for the species, the utilization of the optimized methods offers a higher accuracy of the results in comparison with the ISO 10273 method and the revealing of pathogenity traits, in comparison to API 20E.
3. The rapid scheme for identifying Yersinia enterocolitica species from different types of samples, by using the obtained results after the research made by the authors, assures a rapid diagnosis and offers the possibility of therapeutical intervention in an optimal period of time or the withdrawing in real time from commerce, processing or direct consume of the products contaminated.

BIBLIOGRAPHY

1. Aulisio C.G., Mehlman, Sanders A.C.–Alkali method for rapid recovery of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis from foods, Appl. Env. Microbiology, 39(1): 135–140, 1980.
2. Bhaduri S., Turner-Jones C.O., Buchanan RL., Phillips J.G.–Response surface model of the effect of pH, sodium chloride and sodium nitrite on growth of Yersinia enterocolitica at low temperatures - International Journal of Food Microbiology, 23(3 -4):333-343, nov. 1994.
3. Borch E., Nesbakken T., Christensen H.– Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria - International Journal of Food Microbiology, 30(1 -2): 9- 25, iun 1996.
4. Brocklehurst T.F., Parker M.L, Gunning P.A., Coleman H.P., Robins M.M.– Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in –water emulsions:II- Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth- Journal of Applied Bacteriology, 78(6), :609- 615, iun 1995.
5. Buiuc D. –Microbiologie Medicală, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1992, 327.
6. Buiuc D., Neguţ M. –Microbiologie clinică, Ed. Medicală, 1999.
7. De Zutter L., Le Mort L., Janssens M., Wauters G.–Short–comings of irgasan ticarcilin chlorate broth for the enrichment of Yersinia enterocolitica biotype 2, serotype 9, from meat, International Journal of Food Microbiology, 23, (2), p. 231 – 237, oct 1994.
8. De Zutter L., Janssens M., Wauters G. –Detection of Yersinia enterocolitica serogroupYersinia enterocolitica serogroup O_3 using different inoculation methods of the enrichment medium irgasan ticarcilin chlorate - Contributions to Microbiology & Immunology, 13, p. 123 – 125, 1995.
9. El-Ziney M.G., De Meyer H., Debevere J.M. – Kinetics of interactions of lactic acid, pH and atmosphere on the growth and survival of Yersinia enterocolitica 383 IP O_9 at 4 degrees C- International Journal of Food Microbiology, 27, (2- 3): 229 – 244, oct 1995.
10. Erkmen O. – Survival of virulent Yersinia enterocolitica during the manufacture and storage of Turkish Feta cheese- International Journal of Food Microbiology, 33(2 -3):285-292, dec. 1996.
11. Fukushima H., Gomyoda M.- Growth of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica biotype 3B serotype O:3 inhibited on cefsulodin-irgasan-novobiocin agar, Journal of Clinical Microbiology, 24: 116–120, 1986.
12. Greer G.G., Dilts B.D. – Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork - International Journal of Food Microbiology, 25, (2): 141- 151., apr. 1995.
13. Hartung M., Gerigk K.–Yersinia in effluents from the food- processing industry. (Review)- Revue Scientifique et Technique, 10(3):799- 811, sep. 1991.
14. Highsmith A.K., Feeley J.C., Skaliy P. et al. – Isolation of Yersinia enterocolitica from weel water and growth in distilled water- Appl. Env. Microbiology, 34(6):745, 1977.
15. Little C.L., Knochel S. – Growth and survival of Yersinia enterocolitica, Salmonella and Bacillus cereus in Brie stored at 4, 8 and 20 degrees C-International Journal of Food Microbiology, 24 (1- 2): 137 – 145, dec. 1994 .
16. Ramirez E.I., Vazquez –Salinas C., Rodas–Suarez O.R, Pedroche F.F.–Isolation of Yersinia from raw meat (pork and chicken) and precooked meat (porcine tongues and sausages) collected from comercial establishments in Mexico City–Journal of Food Protection, 63(4): 542 – 544, apr. 2000.
17. Zutter L., Hermann L. – Isolation of Yersinia enterocolitica serogroup O:3 using different modified enrichment and selective media-Nederl. Tijdsch. Med. Microbiol., suppl. II, (6): 46, 1998.

EVALUAREA TEHNICILOR DE BIOLOGIE MOLECULARĂ PENTRU IDENTIFICAREA VARIABILITĂŢII GENETICE A PROTEINEI PRIONICE LA EFECTIVELE DE OVINE

EVALUATION OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR PRIONIC PROTEIN GENETIC VARIABILITY IDENTIFICATION IN SHEEPS

TURCITU M.A.[1], COSTE Handan [1], ALEXANDRU N.[1], CODREANU Iuliana[2], CODREANU M.D.[2], OLARU Irina[1], TAMBA Paula[1], ZYBACZYNSKI Iulia[1]
[1]IDSA, Bucureşti
[2]FMV Bucureşti
Turcitu.Mihai@idah.ro

Alelic variant characterisation at prionic protein level, especially for codons 136, 154 and 171 and consequently identification of scrapie resistant or various susceptibility degrees genotypes is an important point in selection program of sheep breeds. The purpose of this paper is to evaluate two of the methods used for this reason for establishing a national protocol of scrapie eradication.

Key words: scrapie, prion protein, genotyping

Etiologia scrapie a fost intens dezbătută de-a lungul deceniilor. În anul 1962, Parry concluzionează faptul că boala are origine genetică, fiind cauzată de o genă recesivă autozomală, transmisibilă pe cale experimentală. Ulterior a fost demonstrată transmiterea maternală şi orizontală a bolii, cu suspiciunea unei etiologii infecţioase (2). Actualmente, este recunoscută importanţa factorilor genetici ca sursă de risc în producerea bolii, nefiind vorba totuşi de o afecţiune pur genetică. În acest sens, genotipul proteinei prionice pare să fie un factor primar asociat cu incidenţa bolii, în special prin apariţia mutaţiilor la nivelul codonilor 136, 154 şi 171 (1).

Stabilirea cu exactitate a genotipurilor se poate face numai prin utilizarea tehnicilor de biologie moleculară. În lucrarea de faţă ne-am propus evaluarea a două metode dezvoltate în acest sens şi anume analiza curbelor de topire rezultate în urma amplificării unui segment din gena proteinei prionice, prin folosirea de primeri şi sonde marcate fluorescent, respectiv identificarea variantelor alelice prin secvenţiere.

MATERIALE ŞI METODE

Materialul biologic supus investigaţiei a fost reprezentat cu precădere de probe de sânge integral recoltat pe anticoagulant (EDTA) şi într-o mai mică măsură de omogenat creier, provenite de la efectivele de ovine indigene.

Extracţia ADN-ului genomic s-a realizat prin utilizarea sistemului automat *MagNA Pure LC - Roche Applied Science*, împreună cu kit-ul *MagNA Pure LC DNA Isolation Kit* I - *Roche Applied Science*, special conceput pentru obţinerea ADN din probe de sânge şi culturi celulare. Volumul de probă a fost reprezentat după caz de 200µl sânge integral sau 200µl omogenat creier, cu suspensia finală a acizilor nucleici în 100µl tampon de eluţie.

Tehnologia de extracţie se bazează pe folosirea particulelor magnetice, fiind una de ultimă generaţie, cu obţinerea de ADN liber de contaminanţi specifici (proteine, săruri, Dnaze etc).

În continuare, ADN-ul obţinut a fost prelucrat prin cele două tehnici supuse evaluării.

1. Analiza curbelor de topire

Principiul metodei: Metoda se bazează pe amplificarea unui segment genic de 212 perechi de baze al proteinei prionice (PrP) din genomul ovin, prin utilizarea primerilor specifici kit-ului de amplificare (*Light Typer Sheep PrP gene Mutation Detection Kit - Roche Applied Science*). Ampliconii sunt detectaţi prin fluorescenţă folosind perechi specifice de sonde de hibridizare; acestea constau în două oligonucleotide diferite care hibridizează (sunt complementare) la o secvenţă internă a produsului amplificat. Una dintre sonde este marcată la capătul 5' cu fluoroforul *LightCycler Red 640* şi fosforilată la capătul 3' pentru evitarea extensiei. Cea de-a doua sondă este marcată la capătul 3' cu *LightCycler Fluorescein*. În momentul hibridizării la fragmentul de ADN ţintă, cele două sonde se află în strânsă proximitate, rezultând transferul de energie prin rezonanţă fluorescentă (*fluorescence*

resonance energy transfer - FRET). În timpul acestui proces, *LightCycler Fluorescein*, sonda donor, este excitată; o parte din această energie de excitaţie este transferată către *LightCycler Red 640*, sonda acceptor. Luminiscenţa emisă de către sonda acceptor este citită automat de către instrumentul Light Typer.

Determinarea genotipului este posibilă prin analiza curbelor de topire după formarea ampliconilor. Astfel, una din sonde (sonda ancoră) hibridizează la o regiune genică cu potenţial mutagenic redus. Secvenţa celei de-a doua sonde este complementară cu situsul mutagen. De asemenea, sonda ancoră beneficiază de o temperatură de topire (Tm) mai mare, astfel că semnalul fluorescent emis în timpul analizei curbelor de topire este dat strict de sonda ce cuprinde situsul mutant. Temperatura de topire (Tm) a acesteia din urmă este influenţată, pe lângă conţinutul de *Adenină* şi *Guanină* (raportul A-T/G-C), de gradul de complementaritate dintre aceasta şi situsul de hibridare; astfel, în cazul prezenţei unei perechi de baze care nu este complementară (mutaţie punctiformă), Tm este mai mică (Fig 1) (3).

Amplificarea segmentului genic de interes s-a realizat conform protocolului recomandat de producător, cu folosirea a 4µl ADN genomic (aproximativ 120ng) şi a instrumentului *GeneAmp PCR System 9700- Applied Biosystem*, format 384 godeuri.

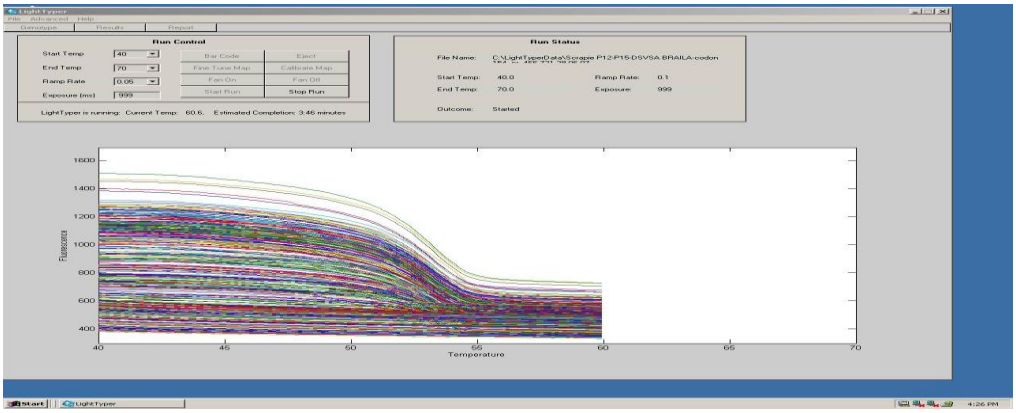


Figura 1: Curbele de topire rezultate în urma analizei probelor pe instrumentul Light Typer

Analiza segmentului amplificat s-a realizat prin utilizarea instrumentului *Light Typer- Roche Applied Science*, conform protocolului din Tabelul 1.

Tabelul 1: protocolul de rulare al probelor pe instrumentul Light Typer

Etapă	Valoare
Temperatură iniţială	40ºC
Temperatură finală	70ºC
Viteza de creştere a temperaturii	0,05ºC

Identificarea variantelor alelice s-a realizat prin analiza curbelor de topire generate de produşii de amplificare, respectiv în funcţie de temperatura de topire a sondelor complementare cu situsul mutagen şi în comparaţie cu standarde kit-ului. Astfel, în funcţie de localizarea semnalului (peak-ului) se construieşte genotipul pentru fiecare probă în parte la nivelul celor trei codoni supuşi analizei (Fig. 2).

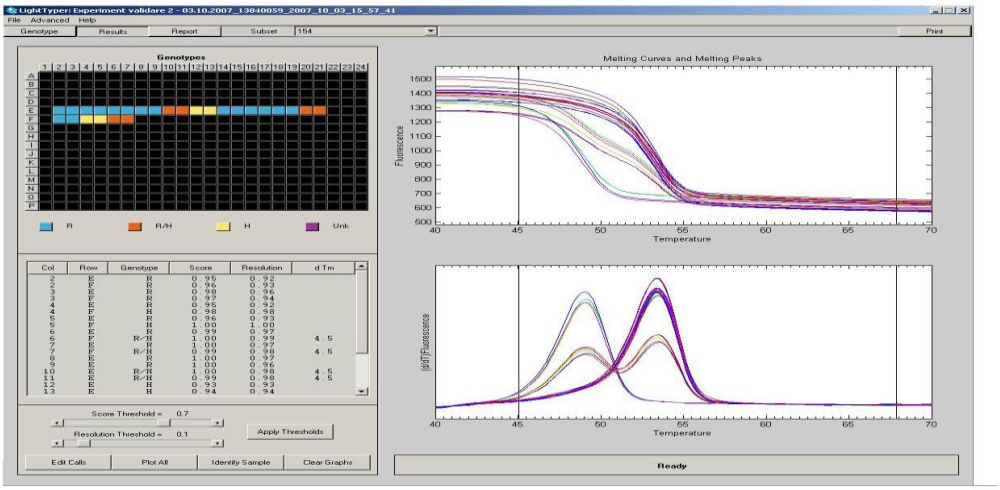


Figura 2: Analiza curbelor de topire şi identificarea genotipurilor

2. Secvenţierea unui fragment al genei proteinei prionice

Amplificarea segmentului genic de interes s-a realizat prin utilizarea a 5µl ADN genomic (aproximativ 60ng) şi a primerilor specifici pentru gena proteinei prionice (primeri recomandaţi de Institutul pentru Ştiinţe şi Sănătatea Animală Lelystad, Olanda). Pentru amplificare s-a utilizat kit-ul *GoTaq DNA Polymerase - Promega*, conform tabelului 2.

Tabelul 2: protocolul de amplificare a segmentului genic

MIX PCR (kit GoTaq DNA Polymerase, Promega)			
Reagenti	**µl/proba**		
Apa ultrapură	30.75		
Tampon 5× Green (Promega)	10		
dNTP 10 mM (Qiagen)	1		
Primer p3 20 pmol/µl (Tib MolBiol)	1.5		
Primer p4 20 pmol/µl (Tib MolBiol)	1.5		
Enzima GoTaq (Promega)	0.25		
AND	5		
Program PCR:	**95°C - 2′**	**1x;**	
	95°C - 30″, 58°C - 45″, 72°C - 1′	**40x;**	
	72°C - 7′	**1x;**	
	4°C - ∞		

Principiul metodei: spre deosebire de reacţia clasică de PCR, pentru secvenţiere mix-ul de reacţie diferă prin existenţa nucleotidelor marcate fluorescent (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP – di-deoxi -nucleotide), care se deosebesc de nucleotidele obişnuite prin lipsa grupării hidroxil (-OH) la poziţia 3’(denumite astfel şi nucleotide ’’STOP’’, deoarece după inserarea acestora la nivelul catenei extensia încetează), astfel că la final se obţin catene de ADN care diferă printr-o singură nucleotidă şi anume cea fluorescentă. Totodată, fiecare din cele patru baze azotate este marcată cu un anumit fluorocrom, care emite semnalul fluorescent la o lungime de undă specifică. De asemenea, se foloseşte un singur primer pentru fiecare reacţie.

Pentru reacţia de PCR secvenţiere s-a folosit kit-ul “*BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit-Applied Biosystems*” – protocolul recomandat de producător, cu temperatura de aliniere **58ºC**.

Purificarea ampliconilor rezultaţi s-a efectuat pe coloniţe de purificare (*Centri-Sep Columns-Princeton Separations*)- protocolul recomandat de producător, urmată de precipitarea (obţinerea peletelor) acizilor nucleici cu etanol şi resuspendarea acestora în reagentul de secvenţiere (*Hi-Di Formamide - Applied Biosystems*).

Ulterior, prin supunerea fragmentelor de ADN de mărimi diferite la electroforeză în poliacrilamidă (*POP 4 - Applied Biosystems*), are loc separarea acestora în funcţie de dimensiuni,

citirea automată a fluorescenţei şi transpunerea acesteia sub formă de "peak-uri" pe grafic. În funcţie de lungimea de undă citită de aparat, peak-ul va corespunde uneia din bazele azotate ale ADN.

Prelucrarea secvenţelor de nucleotide obţinute s-a efectuat prin utilizarea de programe dedicate (*BioEdit Sequence Alignment Editor Company-Isis Pharmaceuticals Inc, ClustalW Multiple Alignment, Mega Software versiunea 3.1*) (4), cu evidenţierea nucleotidelor pentru codonii supuşi investigaţiei şi caracterizarea acestora (Fig. 3).

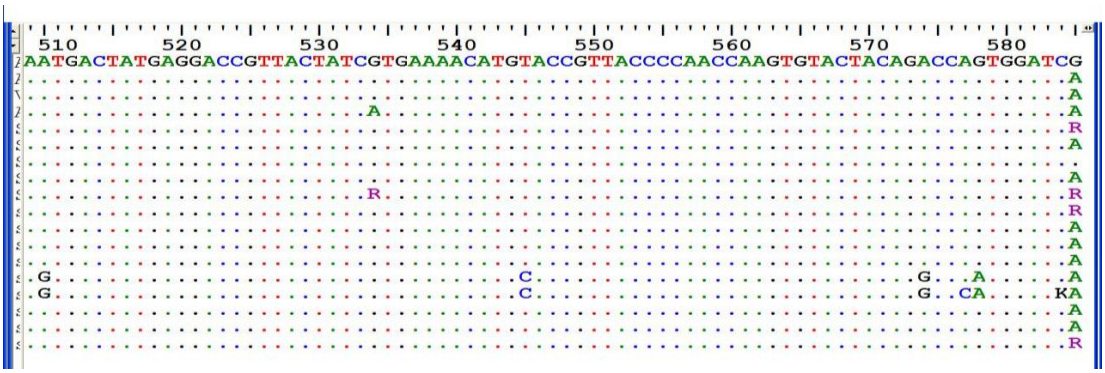


Figura 3: Evidenţierea mutaţiilor punctiforme la nivelul codonilor 154 şi 171

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Ambele tehnici utilizate s-au dovedit a fi extrem de utile pentru identificarea variantelor alelice la nivelul celor trei codoni (136, 154 şi 171). Totuşi, datorită deosebirilor de ordin tehnic, există unele diferenţe în ceea ce priveşte obţinerea rezultatelor finale, care se dovedesc esenţiale în alegerea metodei de lucru (legate în special de sensibilitatea metodei, a numărului de probe procesate în unitatea de timp, complexitatea manoperelor efectuate etc), astfel:

- Identificarea genotipurilor prin analiza curbelor de topire este o tehnică rapidă (se pot analiza simultan 124 probe pe o placă format 384 godeuri, pentru toţi cei trei codoni), mai puţin laborioasă (raportat la timpul necesar procesării pentru fiecare probă în parte, incluzând realizarea a trei variante de mix de amplificare, câte una pentru fiecare dintre codoni), cu un risc scăzut de intercontaminare a probelor, prin sensibilitatea redusă în comparaţie cu cea de-a doua metodă.

Totuşi, metoda prezintă şi unele neajunsuri. Astfel, cantitatea de ADN necesară pentru fiecare probă este destul de mare, metoda având o sensibilitate scăzută (120-150ng), fiind ideală pentru analiza probelor de sânge, unde există un număr mare de celule purtătoare de informaţie genetică (leucocite), dar cu un randament scăzut pentru probele de omogenat creier, unde celularitatea şi implicit cantitatea de ADN este redusă. Mai mult, existenţa unei mutaţii la nivelul codonilor adiacenţi celor supuşi investigaţiei are ca rezultat modificarea temperaturii de topire pentru sonda complementară cu regiunea mutagenă şi consecutiv obţinerea unor curbe de topire diferite de cele uzuale, cu imposibilitatea validării reacţiei (în special adiacent codonului 136 - Fig. 4).

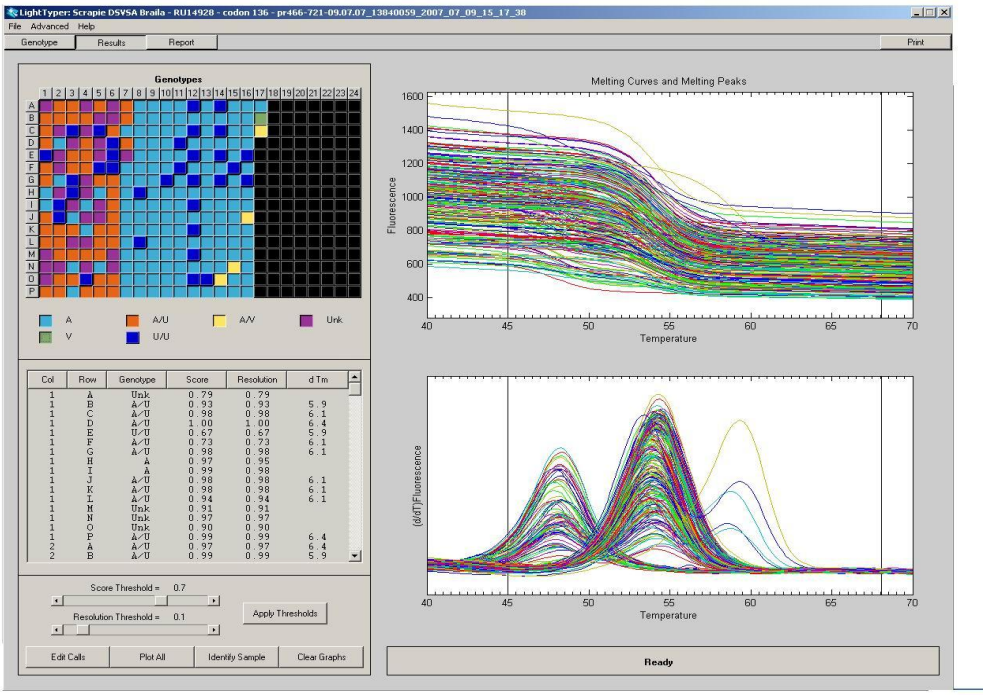


Figura 4: Prezenţa de mutaţii suplimentare adiacente codonului 136 (peak-urile din stânga graficului)

- Analiza genotipurilor prin secvenţierea unui fragment al genei proteinei prionice este o tehnică extrem de sensibilă (atât datorită etapelor premergătoare de PCR, dar şi prin cantitatea redusă de produs necesar reacţiei) şi exactă (se evidenţiază prezenţa mutaţiilor punctiforme pentru tot fragmentul genic supus analizei).

În categoria neajunsurilor se remarcă timpul mare necesar pentru prelucrarea unei probe în comparaţie cu tehnica descrisă anterior (existenţa unor etape laborioase de procesare pe tot parcursul fluxului tehnologic), riscul crescut de intercontaminare a probelor (în special în cazul unui număr mare de probe ce trebuiesc procesate) şi nu în ultimul rând numărul redus de probe ce pot fi analizate în unitatea de timp.

CONCLUZII

Alegerea metodei de lucru depinde în mare măsură de materialul biologic supus investigaţiei, astfel că, în cazul în care probele sunt constituite de sânge integral, metoda recomandată a fi folosită este cea a analizei curbelor de topire, datorită rapidităţii în generarea rezultatelor, prin numărul mare de probe ce pot fi procesate. Totuşi, în condiţii normale de lucru a probelor provenite de la rasele indigene (rase la care s-a constatat un polimorfism remarcabil la nivelul codonilor adiacenţi celor investigaţi), reacţia nu va putea fi validată pentru aproximativ 2% dintre acestea, pentru care tehnica secvenţierii este metoda finală de investigaţie. Dimpotrivă, atunci când materialul biologic supus investigaţiei este reprezentat de omogenat creier (provenit de la exemplarele la care s-a diagnosticat prezenţa bolii şi pentru care este necesară stabilirea genotipului şi respectiv al gradului de rezistenţă/susceptibilitate la boală), secvenţierea este metoda capabilă să clarifice aceste aspecte, datorită sensibilităţii remarcabile şi exactităţii în diagnostic.

BIBLIOGRAFIE

1. Alex Bossers - Prion diseases: Susceptibility and Transmissbility, 1999
2. Bram E.C. Schreuder - Epidemiological Aspects of scrapie and BSE including a risk assessment study, 1998
3. Light Typer Sheep PrP gene Mutation Detection Kit Protocol - Roche Applied Science.
4. S Kumar, K Tamura, and M Nei (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163.

USE OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

TURCITU M.A. [1]., COSTE Handan [1], CIORANU Raluca [1], NICOLAE Şt.[1], BĂRBOI Gh., ONIŢĂ Iuliana [1], NEAGOE Graziela [1], NEICUŢ Adriana [1], SANDU Ana[2]

[1]IDSA, Bucureşti

[2]Institutul pentru Controlul Produselor Biologice şi Medicamentelor de uz Veterinar

Turcitu.Mihai@idah.ro

Newcastle disease virus identification by PCR complete the diagnostic methods, through an remarcable sensitivity and speed in obtaining the results. Fusion gene cleavage site analysis at nucleotide level as well as aminoacid translation offer important data regarding virus isolates pathogenicity. In this manner, molecular biology techniques complete the diagnostic and characterisation of virus strains, beeing used for flocks surveillance. This study consist in molecular characterisation of 47 virus strain isolated between 2002 and 2007, as well as vaccinal strains used for disease contrlol and challenge strain "Craiova", used for vaccin efficacy control.

Key words: Newcastle disease, PCR, cleavage site, molecular characterization, pathotyping

Pseudopesta aviară (boala de Newcastle) joacă un rol important în pierderile din sectorul avicol din România, datorită indicilor mari de morbiditate şi mortalitate înregistraţi în sectorul industrial şi cel extensiv de creştere, restricţiilor care se impun consecutiv focarului de boală şi al măsurilor instituite în limitarea difuzării bolii. Diagnosticului bolii trebuie să fie rapid şi exact pentru a se putea genera un răspuns prompt la situaţiile nou apărute; în acest sens, tehnicile de biologie moleculară vin în completarea metodelor virusologice de identificare şi caracterizare virală.

Virusul bolii de Newcastle (membru al familiei *Paramixoviridae*), este un paramixovirus aviar de tip 1. Genomul este compus dintr-un ARN de sens negativ, monocatenar, cu dimensiuni de aproximativ 15 kilobaze, care codifică 6 proteine şi anume polimeraza, proteina hemaglutininei-neuraminidazei, proteina de fuzionare, proteina matrix, fosfoproteina şi proteina nucleocapsidei (1, 4).

Bazele moleculare ale patogenităţii virusului sunt dependente de secvenţa de aminoacizi de la nivelul situsului de clivare al genei F şi concomitent de abilitatea proteazelor celulare de clivare a precursorului. Astfel, în timpul replicării, particulele virale sunt produse cu un precursor al glicoproteinei (F0), care trebuie clivat în segmentele F1 şi F2 pentru ca virusul să capete proprietăţi infecţioase. Această clivare post-translaţională este mediată de proteazele celulare ale organismului gazdă. Se pare că moleculele F0 ce aparţin virusurilor din categoria velogenă/mezogenă pot fi clivate de proteazele ubiquitare ale organismului gazdă, astfel că se poate vorbi de o diseminare virală sistemică, cu afectarea organelor vitale şi apariţia semnelor clinice de boală. Pentru virusurile din categoria lentogenă, clivarea F0 este restricţionată de prezenţa tripsinei în celulele organismului gazdă, astfel că localizarea virală este posibilă numai acolo unde beneficiază de existenţa acestei enzime (predominant la nivel de intestin) (3).

MATERIALE ŞI METODE

Virusul. Materialul supus investigaţiei a fost reprezentat de 47 tulpini de NDV identificate cu ser pozitiv de referinta, izolate în perioada 2002-2008 din diverse focare de boală din sectorul industrial şi extensiv (gospodăriile populaţiei). De asemenea, s-au supus investigaţiilor tulpina vaccinală *Ceva New L (Ceva Sante Animale)*, antigenul provenit din trusa *ND-TEST* (*Romvac Company*), precum şi tulpina cu indicativul "*Craiova*" folosită pentru testarea eficacităţii vaccinurilor (proprietatea Institutului pentru Controlul Produselor Biologice şi Medicamentelor de uz Veterinar - ICBMV Bucureşti).

Extracţia ARN. Extracţia s-a efectuat cu kit-uri specifice – "*QIAmp Viral RNA Mini Kit – Qiagen*", conform protocolului recomandat de producător, prin utilizarea a 200µl supernatant probă şi eluţia ARN în 50 µl volum final.

Reacţia Real Time RT-PCR. Revers transcripţia şi amplificarea s-au bazat pe folosirea de primeri şi sondă complementare genei matrix, conform protocoalelor descrise în literatură (2), prin folosirea kit-ului *One Step RT-PCR – Qiagen* şi a instrumentului *Smart Cycler – Cepheid*.

Reacţia RT-PCR. S-a utilizat kit-ul *One Step RT-PCR - Qiagen*, cu efectuarea etapei de revers transcripţie (RT) şi a celei de PCR într-o singură reacţie, conform protocolului recomandat de producător. Primerii folosiţi au fost cei recomandaţi de Laboratorul Internaţionalde Referinţă Padova, Italia, cu amplificarea unui fragment al genei F care cuprinde şi situsul de clivare.

Electroforeza şi purificarea produşilor de reacţie. Pentru vizualizarea benzilor specifice s-a efectuat electroforeza în gel de agaroză, cu identificarea fragmentelor de interes pe baza dimensiunilor specifice de 320 perechi de baze (Fig. 1). În continuare, ampliconii sunt supuşi unui proces de purificare din gelul de agaroză, folosind kit-ul *''MinElute Gel Extraction Kit – Qiagen''*, conform protocolului recomandat de producător.

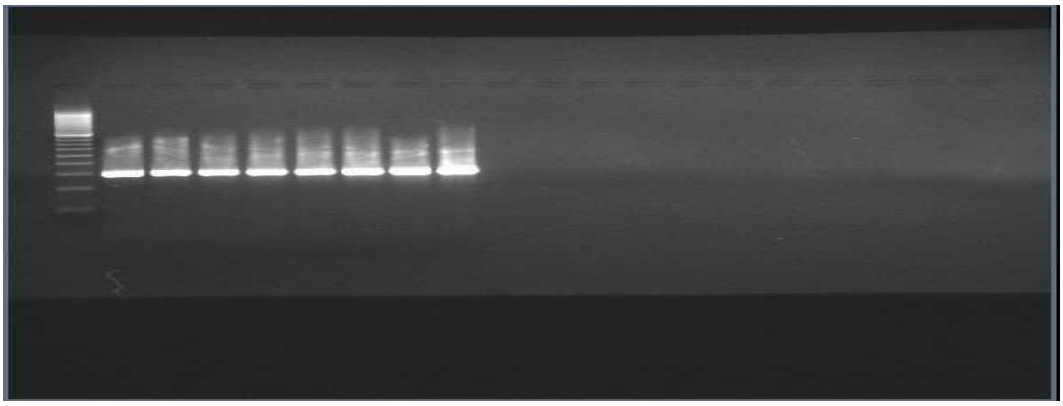


Figura 1 - Electroforeza produşilor de amplificare (linia 1 marker molecular 100 pb, liniile 2-8 probe supuse analizei, linia 9 martor pozitiv, liniile 10 şi 11 martori negativi de extracţie şi amplificare)

Secvenţierea directă a produşilor de amplificare. Pentru reacţia de PCR s-a folosit kit-ul "*BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit- Applied Biosystems*", protocolul recomandat de producător, cu temperatura de aliniere 58ºC.

Purificarea ampliconilor rezultaţi s-a efectuat pe coloniţe de purificare (*Centri-Sep Columns- Princeton Separations*), protocolul recomandat de producător, urmată de precipitarea (obţinerea peletelor) acizilor nucleici cu etanol şi resuspendarea acestora în agenţi denaturanţi (*Hi-Di Formamide - Applied Biosystems*).

Electroforeza capilară a fost efectuată pe analizorul genetic model *3130- Applied Biosystems*, folosind poliacrilamidă ca matrice de separare (*POP 4 - Applied Biosystems)*.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Tehnica Real Time RT-PCR permite identificarea rapidă a antigenului viral (rezultatele sunt obţinute în aproximativ 3 ore), un risc de intercontaminare al probelor redus (prin lipsa etapei de electroforeză, efectuarea într-o singură reacţie a revers transcripţiei şi amplificării segmentului genic).

Sensibilitatea tehnicii a fost evaluată prin compararea acesteia cu reacţia RT-PCR convenţional, folosind o tulpină de virus cu titru de 1:512 la reacţia de inhibare a hemaglutinării, din care s-au efectuat diluţii seriale zecimale. Din compararea rezultatelor obţinute se remarcă superioritatea acestei metode faţă de cea convenţională, fiind capabilă să identifice prezenţa ARN viral până la diluţia 10^{-7} (Fig. 2).

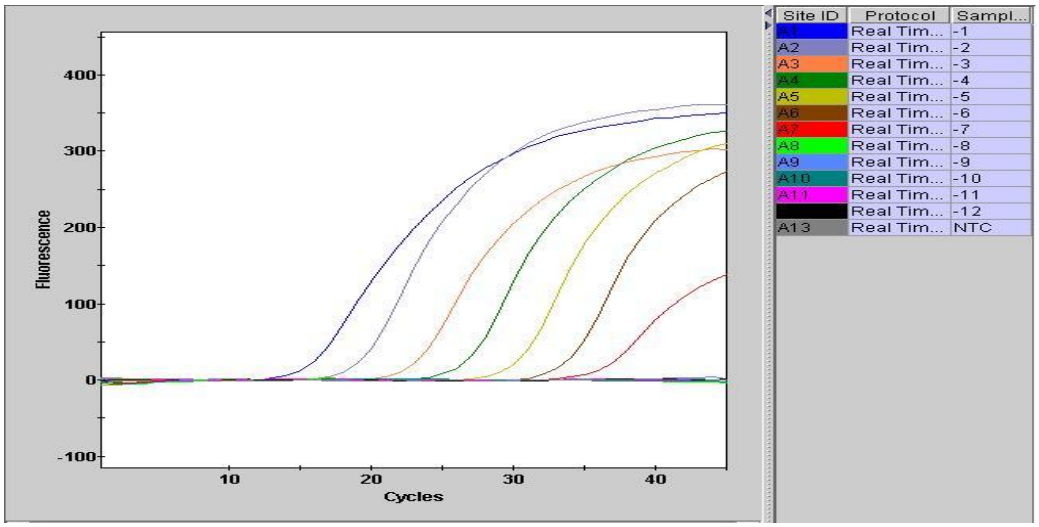


Figura 2 – Rezultatele testului Real Time RT-PCR efectuat pe diluţii seriale zecimale

Secvenţele de nucleotide obţinute au fost aliniate folosind programe dedicate (*Mega Software versiunea 3.1, ClustalW Multiple Alignment*), cu evidenţierea situsului de clivare (Fig. 3) (5).

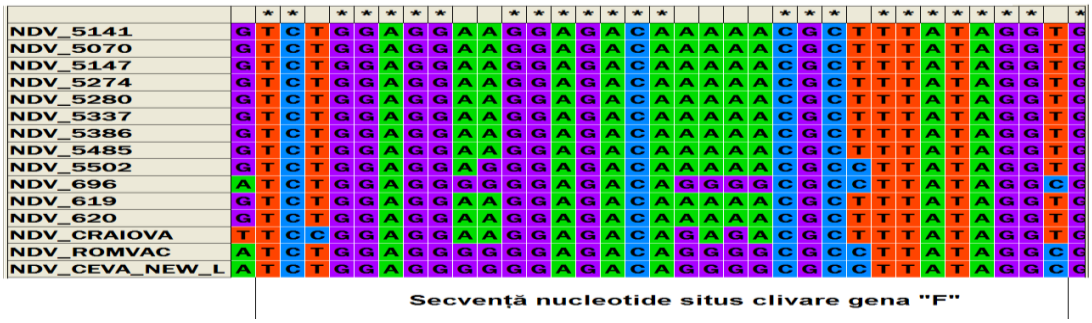


Figura 3 - situsul de clivare al genei proteinei de fuzionare (pentru claritatea imaginii, nu au fost introduse toate secvenţele obţinute)

Din punct de vedere molecular, situsul de clivare al genei F prezintă o secvenţă de nucleotide alcătuită majoritar din adenină – A şi guanină – G, care prin exprimarea fenotipică post-translaţională dau naştere unei secvenţe specifice de aminoacizi. În acest sens, o pereche de aminoacizi esenţiali în poziţiile 112 şi 113, respectiv 115 şi 116, plus aminoacidul fenilalanină (F) în poziţia 117, determină o recunoaştere a situsului de către proteazele ubiquitare, cu replicarea virală sistemică şi apartenenţa tulpinii la categoria mezogenă / velogenă.

Aminoacizii ce se regăsesc în poziţiile 112 şi 113, respectiv 115 şi 116 sunt reprezentaţi în acest caz de lizină (K) şi/sau arginină (R) în combinaţiile teoretic posibile. În cazul în care în cele două poziţii este prezentă doar arginina (R) se poate spune că izolatul aparţine categoriei velogene. În contrast, tulpinile lentogene prezintă în poziţiile 112 şi 113, respectiv 115 şi 116, pe lângă aminoacizii mai sus menţionaţi, şi aminoacidul glicină (G) în combinaţiile teoretic posibile. Mai mult, în poziţia 117, în locul fenilalaninei, este prezentă leucina (L) (Fig. 4).

Astfel, din analiza rezultatelor se poate observa că, pentru majoritatea tulpinilor izolate din teren, secvenţa de aminoacizi a fost 109SGGRRQKRFIG119, fiind vorba de tulpini ce aparţin categoriei mezogenă/velogenă. Dimpotrivă, pentru câteva izolate (NDV 5502, 696), secvenţa de aminoacizi a fost 109SGGGRQG(K)RLIG119, fiind vorba de tulpini izolate de la păsări vaccinate contra pseudopestei şi deci cu o secvenţă de aminoacizi compatibilă cu categoria lentogenă, demonstrând originea vaccinală a tulpinilor izolate.

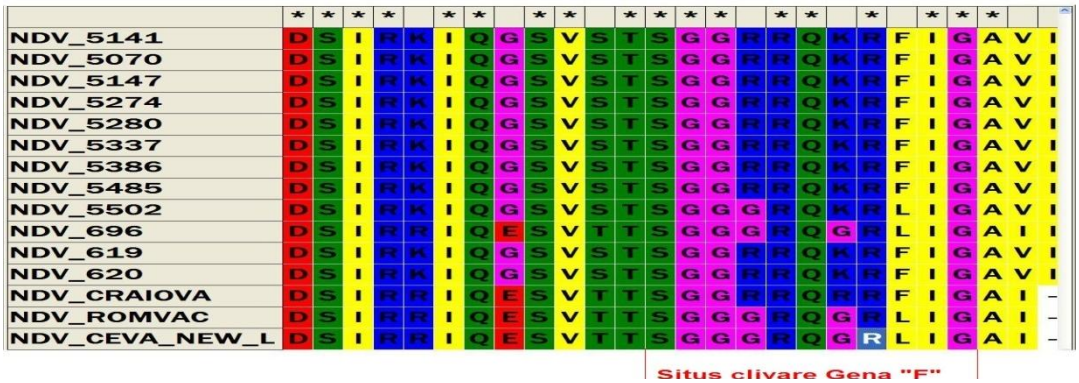


Figura 4 - secvenţa de aminoacizi rezultată prin translaţia nucleotidelor de la nivelul situsului de clivare(pentru claritatea imaginii, nu au fost introduse toate secvenţele obţinute)

În ceea ce priveşte tulpina cu indicativul "Craiova", secvenţa de aminoacizi 109SGGRRQRRFIG119 situează izolatul viral în categoria tulpinilor cu cel mai înalt grad de virulenţă (categoria velogenă). Dimpotrivă, pentru antigenul Romvac, dar şi în cazul tulpinii vaccinale Ceva, secvenţa de aminoacizi 109SGGGRQGRLIG119, compatibilă cu categoria lentogenă, certifică utilizarea acestora în scopurile desemnate.

CONCLUZII

1. Tehnica Real Time RT-PCR poate fi folosită cu succes în strategia de supraveghere a bolii, datorită avantajelor generate de sensibilitate (atât faţă de metodele virusologice, cât şi faţă de RT-PCR convenţional), rapiditate în generarea rezultatelor, uşurinţa obţinerii materialului biologic supus investigaţiei (în special pentru păsările sălbatice - probe de fecale, tampoane cloacale etc).
2. Analiza moleculară a situsului de clivare şi consecutiv încadrarea izolatului viral în una din cele trei categorii existente (lentogenă, mezogenă/velogenă şi velogenă) constituie una dintre cele mai exacte tehnici de caracterizare virală în vederea stabilirii patogenităţii (patotipare). Astfel, metoda poate fi aplicată cu succes pentru confirmare, rezultatele se obţin intr-un timp mai scurt comparativ cu metodele virusologice; de asemenea, în cazurile în care, din diferite motive, izolarea şi caracterizarea virusului nu pot fi realizate, fiind posibilă doar amplificarea acizilor nucleici specifici, tehnica se constituie într-o alternativă viabilă pentru realizarea acestor deziderate.

BIBLIOGRAFIE

1. Bruce S. Seal, Daniel J. King, Joyce D. Bennet - Characterization of Newcastle Disease Virus Isolates by Reverse Transcription PCR Coupled to Direct Nucleotide Sequencing and Development of Sequence Database for Pathotype Prediction and Molecular Epidemiological Analysis - Journal of Clinical Microbiology, vol. 33, Nr 10, 1995.
2. Mark G. Wise, David L. Suarez, Bruce S. Seal, Janice C. Pedersen, Dennis A. Senne, Daniel J. King, Darrell R. Kapczynski, and Erica Spackman - Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples - Journal of Clinical Microbiology, January 2004, p. 329-338, Vol. 42, Nr. 1.
3. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines, ediţia 2004, secţiunea 2.1, capitolul 2.1.15
4. O. Zorman ROJS, U. Krapez, J. Grom, D. Barlic-Maganja - Molecular Detection and Pathotyping ofParamixovirus Type 1 isolates (Newcastle Disease Virus) - Slov Vet Res 2002.
5. S. Kumar, K. Tamura, M. Nei (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163.

ROMANIAN DAIRY CATTLE GENOTYPES

VĂTĂŞESCU-BALCAN R.A., GEORGESCU S.E., MANEA Maria Adina, DINISCHIOTU Anca, TESIO C.D., COSTACHE Marieta
University of Bucharest, Faculty of Biology, Molecular Biology Center, Bucharest
marietacostache@yahoo.com

Alpha-lactalbumin (α-La) is a major milk protein essential for the biosynthesis of lactose at the level of mammary glands. α-La directly influences the quality and the volume of the milk since it is directly involved in the lactose synthesis (Ashwell et al., 1997). We performed PCR-RFLP test to make a distinction between the different alleles in a population of Romanian Spotted cattle breed. Genetic polymorphism was detected by digestion with the endonuclease MnlI, followed by electrophoresis in high resolution agarose gel stained with ethidium bromide. Fifty DNA samples from Romanian Spotted cattle breed were analyzed for A and B variants. The PCR-RFLP test makes feasible the inclusion of α-La genotypes in breeding plans and cattle selection.

α-La is a component of lactose-synthetase, the enzyme responsible of the synthesis of lactose, in the final step where glucose is linked to galactose. The quantity of lactose released into the milk is a condition for its quality (Voelker Jr. et al., 1999).

Lactose synthase synthesizes lactose which is released into the milk along with α-La. Because of its association with lactose production, α-La is thought to play a role in regulating milk volume. Bleck and Bremel (1993) discovered a variation in the control region of the α-La gene. The A variant of this gene is only found in Holstein cattle while other breeds studied all contained the B variant. Through milk production trait analysis, they showed that this α-La variant is associated with significant differences in milk production within Holsteins.

The objective of our work was to develop a fast and simple method to distinguish the allelic variants of α-La in Romanian Spotted breed and to evaluate the favourable genotypes for the production of milk quality.

MATERIALS AND METHODS

DNA extraction: blood samples for DNA genotyping were supplied by fifty cows from Romanian Spotted breed (SC Saris com 96 SRL farm, Argeş County). Genomic DNA isolation was done with Wizard Genomic DNA Extraction Kit (Promega) from fresh blood samples (300 µl).

PCR – RFLP test: for α-La genotyping we performed a simple polymerase chain reaction (GeneAmp® PCR System 9700) followed by enzymatic restriction. Genomic DNA was amplified for 45 cycles in a 25µl reaction containing: PCR buffer, $MgCl_2$, dNTPs, AmpliTaq DNA Polymerase and nuclease-free water, sense and antisense primers (Table 1).

Table 1: *Primer sequences and annealing temperature.*

	Primer sequences	**Protocol**
α-La	for. 5'-CTCTTCCTGGATGTAAGGCTT-3' rev. 5'-AGCCTGGGTGGCATGGAATA-3'	95°C/30 sec; 58°C/30 sec; 72°C/1 min.

The first denaturation step was performed at 95ºC (10 min) and the last extension was 30 minutes (72°C).

PCR products were digested with restriction endonuclease (Table 2) at 37ºC for 3h. Restricted products were analyzed by electrophoresis in 2% high resolution agarose gel stained with ethidium bromide.

Table 2: *Restriction enzymes used to digest the PCR amplicons and the restriction products.*

Length of PCR products bp	**Restriction enzymes**	**AA genotype restriction fragments bp**	**BB genotype restriction fragments bp**	**AB genotype restriction fragments bp**	**References**
α-La 166	*Mnl I*	78/52/36	114/52	114/78/52/36	Bleck and Bremel, 1993 Mao, 1994

The most widely used method to distinguish between AA, BB and AB genotypes of α-La gene is to cut the 166 bp PCR products (obtained using primers in Table 1) with *Mnl I* endonuclease at the recognition site GAGG$(N)_6$↓ The normal lengths of the fragments are 78/52/36 bp for AA, 114/52 bp for BB and 114/78/52/36 bp for AB. In our study we detect only BB. To confirm the α-La genotypes detected we decided to perform sequencing.

For sequencing the amplified fragments (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction) were purified with the Wizard PCR Preps DNA Purification System Kit (Promega) and run on ABI Prism 310 Genetic Analyzer. DNA Sequencing Analysis 5.1 Software (AppliedBiosytems) was used to process the sequences which were aligned with the Clustal X multiple alignment program and refined manually.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The milk-specific protein α-La is a key part of the lactose synthase complex in mammary epithelial cells. This enzyme complex is responsible for the production of lactose, the major osmole in milk and a major determinant of milk volume. In our study, fifty Romanian Spotted cattle were genotyped and analyzed for any potential effect on milk production traits. To confirm the lengths of PCR products of 166pb we performed electrophoresis in agarose gel stained with ethidium bromide (Figure 1).

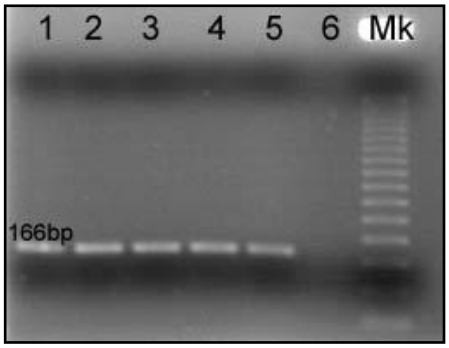


Figure 1. Electrophoresis pattern of amplified bovine genomic DNA with α-La specific primers separated in 2% agarose gel. *Lanes 1-5: fragments amplified for α-La locus. Lane 6: negative control. Lane 7: molecular size marker (50 bp DNA Step Ladder).*

Detection of the genetic polymorphism of the bovine α-La locus has been done by digestion of the PCR products with *Mnl I* restriction endonuclease (Bleck and Bremel, 1993; Mao, 1994), but only BB variant (114/52 bp) was detected (Figure 2).

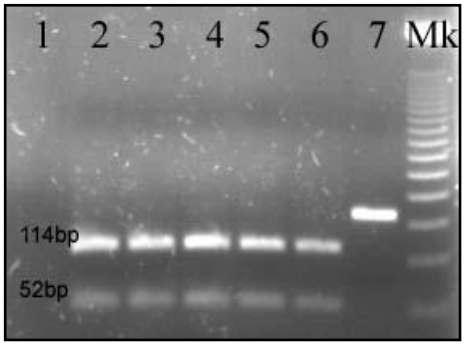


Figure 2. Electrophoresis pattern of amplified fragments after digestion with Mnl I enzyme. *Lane 1: negative control. Lanes 2-6: BB homozygous cattle, two fragments of 114 and 52bp. Lane 7, molecular size marker (50bp DNA Step Ladder).*

Sequencing was performed in order to confirm the sequences of amplified fragments from the α-La gene but also to strengthen the diagnostic method taking into account that we found only BB genotype in the specimens analyzed by us. We identified and validated the presence of the restriction site for *MnlI* enzyme in the α-La gene (Fig. 3, 4).

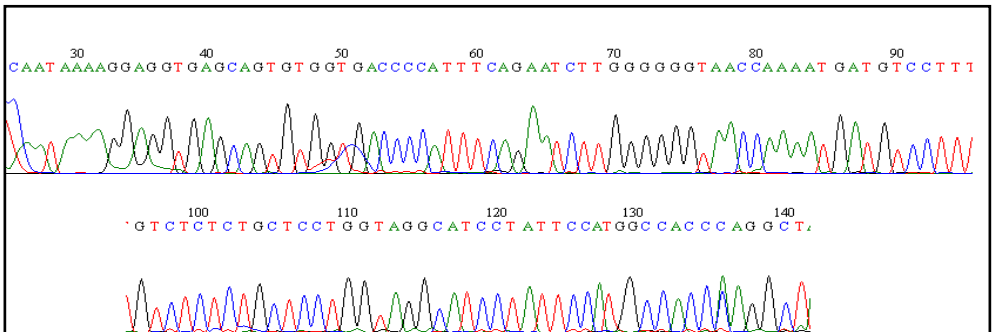


Figure 3. The sequence of the PCR products for a normal cow containing Mnl I restriction site.

In Figure 4, a region of a PCR fragment of the sequenced α-La gene is shown. Restriction site for *Mnl I* (left), normally used to detect different α-La genotypes was identified.

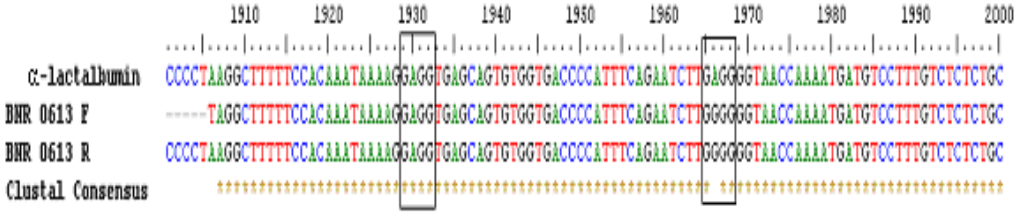


Figure 4. Clustal X alignment between a Gene Bank fragment from the α-La gene and our PCR products.

CONCLUSIONS

The results of RFLP analysis showed that of all the three genotypes (AA, BB and AB) we expected to find in the population studied for α-La gene, we detected only the BB genotype.

Detection methods based on PCR amplification and RFLP analysis are powerful tools to determine the presence of polymorphism of gene coding for α-La gene.

Using the PCR-RFLP technique, we established an easy, low-cost and efficient method that can be used to determine the genotype of dairy cattle.

BIBLIOGRAPHY

1. **Ashwell M. S., Rexroad Jr. C.E., Miller R.H., Van Raden P. M., Da Y.** (1997) - Detection of loci affecting milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers, Animal Genetics 28:216-222.
2. **Bleck, G.T., Bremel R. D.** (1993) - Gene, 126, 213-218.
3. **Mao F.C.** (1994) - Rapid Communication: A Bovine a-Lactalbumin Gene MnlI Restriction Fragment Length Polymorphism, J. Anim. Sci., 72:529.
4. **Voelker Jr. G.R., Bleck G.T., Wheeler M. B.** (1999) - Identification of Variations in the α-Lactalbumin Gene in Cattle and Potential Correlation to Milk Production Traits, Illini Dairy Net Papers, University of Illinois Extension.

PROFILAXIA SPECIFICĂ A PODODERMATITEI INFECŢIOASE LA RUMEGĂTOARE, PRODUSĂ DE FUSOBACTERIUM NECROPHORUM, PRIN UTILIZAREA ELECTRONILOR ACCELERAŢI ŞI A MICROUNDELOR

THE SPECIFIC PROPHYLAXIS FOR THE INFECTION WITH FUSOBACTERIUM NECROPHORUM IN BOVINES, USING ACCELERATED ELECTRONS AND MICROWAVES

VELESCU Elena , PERIANU T. , TĂNASE Irina-Oana, PAVLI C., ANIŢĂ D. C., ANIŢĂ Adriana Elena, MIHALACHI Simona
FMV Iaşi
elenavelescu@yahoo.com

The purpose of the research was to determine the immunogenic power of two inactivated vaccines using a comparative analysis. The first vaccine was obtained from integral cultures of Fusobacterium necrophorum and the second one from the leucotoxin present in the liquid culture.
The specific antibody titers were high in the animals inoculated with the leucotoxin.

Cercetările efectuate referitoare la verificarea comparativă a capacităţii imunogene a două tipuri de vaccinuri inactivate după administrarea acestora la două loturi de vaci, a fost realizată în două etape succesive şi anume:

- verificarea inocuităţii acestora, înainte de administrare pe animale din aceeaşi specie cu specia la care vaccinurile se vor administra;
- verificarea imunogenicităţii celor două tipuri de produse biologice după administrarea lor la două loturi de vaci prin evidenţierea titrului anticorpilor specifici.

MATERIALE ŞI METODE

Pentru evaluarea capacităţii imunogene au fost utilizate două tipuri de vaccinuri inactivate, denumite vaccinul A (preparat din culturi integrale de Fusobacterium necrophorum inactivate prin formol şi căldură, tip anacultură) şi vaccinul B (obţinut prin precipitarea supernatantului de cultură al tulpinii 407 de Fusobacterium necrophorum şi inactivat prin formol şi căldură – tip bacterină).

Alte materiale: seringi de unică folosinţă, tinctură de iod, eprubete sterile.

Loturi de animale

30 vaci de vârstă diferită, repartizate în două loturi experimentale, notate Lot A şi Lot B, la care s-a administrat cele două tipuri de vaccinuri. Restul animalelor existente în efectiv au reprezentat lotul martor.

Pentru evaluarea capacităţii imunogene a celor două tipuri de vaccinuri inactivate, acestea au fost inoculate la loturile de vaci corespondente (lotul A şi, respectiv, lotul B), pe cale subcutanată, în două reprize, la interval de 14 zile:

- pentru prima inoculare, indiferent de tipul vaccinului, s-a utilizat doza de 5 ml, iar pentru a doua inoculare (rapel) doza de 3 ml;
- vacile din lotul martor (5 animale) au fost inoculate pe cale subcutanată cu câte 5 ml bulion Schaedler la prima administrare şi cu câte 3 ml bulion Scahadler la cea de a doua administrare.

Atât de la vacile din loturile experimentale, cât şi la cele din lotul martor, înainte de administrarea vaccinurilor sau a bulionului Schaedler, înainte de rapel şi după 14 zile de la ultima inoculare s-au recoltat probe de sânge în scopul determinării titrului de anticicorpi.

Prezenţa anticorpilor specifici în serul sanguin al animalelor vaccinate şi în cel al animalelor din lotul martor a fost determinată prin reacţii serologice calitative (reacţia de imunodofuzie dublă în gel de agar) şi prin tehnici cantitative in vitro (reacţia de serofloculare) şi in vivo (reacţia de neutralizare pe şoarece).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele investigaţiilor efectuate au demonstrat că cele două tipuri de antigene din care au fost preparate cele două tipuri de vaccinuri inactivate cu formol şi adsorbite pe gel de hidroxid de aluminiu au corespuns testelor de sterilitate şi inocuitate, formolul în concentratie finală de 5‰ fiind capabil să inactiveze corpii bacterieni şi să transforme componentele toxice sintetizate de bacterie prezente în supernatantul de cultură, în anatoxine, cu conservarea antigenităţii.

Comparând titrurile anticorpilor specifici din serurile animalelor vaccinate din loturile A şi B s-a constatat că în serul sangvin al animalelor vaccinate cu vaccinul B, chiar după prima administrare de vaccin, titrul anticorpilor este mai mare decât în cazul animalelor vaccinate cu vaccinul A.

La animalele din lotul A, după prima adminstrare de vaccin, titrul anticorpilor specifici a evidenţiat valori cuprinse între 1/64 şi 1/256 în timp ce la cele cărora li s-a administrat vaccinul B, valorile titrurilor anticorpilor specifici a fost cuprins între 1/128 şi 1/512.

După rapel, s-a constatat o creştere semnificativă a titrurilor anticorpilor specifici, atât la animalele din lotul A, cât şi la cele din lotul B, dar la majoritatea serurilor recoltate de la vacile din lotul B, titrul anticorpilor a fost mai mare de 1/512 (cuprins între 1/1024 şi 1/ 2048).

CONCLUZII

Cercetările efectuate au urmărit prin analiză comparativă determinarea valorii imunogene a două tipuri de vaccinuri inactivate, unul obţinut din culturi integrale de *Fusobacterium necrophorum* şi altul din leucotoxina prezentă în supernatantul de cultură, adsorbite pe gel de hidroxid de aluminiu, după administrarea acestora la două loturi de vaci.

Ansamblul investigaţiilor întreprinse au permis formularea următoarelor concluzii:

1. În compoziţia chimică a ambelor tipuri de vaccinuri au fost prezente cantităţi suficiente de antigene care au determinat după inoculare, sinteza de anticorpi specifici în titruri decelabile atât prin tehnica de imundifuzie dublă în gel de agar, cât şi prin reacţia de serofloculare.
2. Atât după prima inoculare de vaccin, cât şi după rapel, titrurile de anticorpi specifici au fost mai mari în cazul animalelor din lotul vaccinat cu vaccinul constituit din leucotoxina prezentă în supernatantul culturii de *Fusobacterium necrophorum*, comparativ cu titrul anticorpilor evidenţiaţi în serul animalelor la care a fost inoculat vaccinul constituit din culturi integrale.
3. Comparând titrurile anticorpilor specifici din serurile animalelor vaccinate din loturile A şi B s-a constatat că în serul sangvin al animalelor vaccinate cu vaccinul B, chiar după prima administrare de vaccin, titrul anticorpilor este mai mare(1/128 şi 1/512) decât în cazul animalelor vaccinate cu vaccinul A (1/64 şi 1/256).

Bibliografie selectivă

1. **Moga Mânzat R.** (coordonator), (2001) – *Boli infecţioase ale animalelor – Bacterioze* – Ed. Brumar, Timişoara.
2. **Moga Mânzat R., Moldovan M., Vintilă Cornelia** (1984) – *Pododermatitele infecţioase ale rumegătoarelor* - Ed. Ceres, Bucureşti.
3. **Radostits O.M., Gay C.C., Blod D.C., Hinchcliff K.W.** (2000) – *Veterinary Medicine. A text book of the Diseases of Cattle, Sheep, Pings, Goats and Horses*. Ninth edition, W.B., Saunders Company Ltd. SUA.
4. **Răpuntean Gh., Răpuntean S**. (1999) – *Bacteriologie specială veterinară* - Tipo Agronomia, Cluj-Napoca.
5. **Perianu T., Ştefan N., Carp- Cărare M., Velescu Elena, Alexandru N., Spătaru T.,** (2003) – Boli infecţioase ale animalelor. Bacterioze, Volumul I, Editura Universitas XXI, Iaşi.

CERCETĂRI PRIVIND PREZENŢA SPECIILOR E. COLI ŞI SALMONELLA SPP. DE PE CARCASELE DE BOVINE ŞI SUINE

RESEARCH REGARDING THE PRESENCE OF THE *E. COLI* AND *SALMONELLA SPP*. OF THE BOVINE AND SWINE CARCASSES

VLAD-SABIE Alina, CARP-CĂRARE M., BRĂDĂŢAN Gh., CREŢU Carmen
FMV Iaşi

The researches were performed in the 2007-2008 period, on 128 samples of bovine and swine carcasses. We performed the calitative and cantitative bacteriologyc exam.

The aim of this study was to show the superficial contamination of the bovine and swine carcasses, with E. coli and Salmonella spp., during various unit operations.

The samples were collected from the carcasses by swabbing an area of 100 cm^2, with a sterile gauze swab, wich had been moistened with peptone wather.

We respected the HACCP Program of the slaughterhouse and the Surveillance Strategical Programme 2007.

The total viable counts on the bovine carcasses varied between 4,8- 6,8 log UFC/cm^2 after skining, and 3,1-5,2 log UFC/cm^2 after chilling.

On swine carcasses, the total viable counts was highest 4,1-5,8log UFC/cm^2 after scalding and 4,2-7,1log UFC/cm^2 after evisceration.

The level of hygienic indicator E. coli on bovine carcasses was highest- 58,8% after skinning (on the intern region of the ham),and lower 16%, after chilling in the same region.

On swine carasses the level of E. coli was highest 41% after scalding (on the external region of the ham) and 66,6 after evisceration in the same region.

Salmonella spp. was isolated in 8 sample from swine carcasses, and the prevalence was quite high: 12,5%.

Key words: E. coli, Salmonella spp; bovine carcasses; swine carcasses

Contaminarea carcaselor cu materii fecale este un aspect important şi urmărit în unităţile de sacrificare a suinelor şi bovinelor. Sistemul actual HACCP permite reducerea riscului de contaminare microbiană a cărnii în timpul fluxului tehnologic. Fluxul tehnologic poate fi monitorizat prin stabilirea punctelor critice de control, în acest fel riscurile fiind reduse sau eliminate.

Etapele fluxului tehnologic cuprind operaţiuni de reducere a numărului de bacterii patogene însă nu cuprind operaţiuni complementare de eliminare a acestora. **(Rivas et al., 2000).**

Salmonella spp. colonizează intestinul. gros al porcilor, astfel că aceştia sunt consideraţi purtători asimptomatici ai bacteriei. Cele mai importante surse de contaminare a carcaselor sunt reprezentate de materii fecale, conţinut gastric, faringe sau din mediul înconjurător prin contactul cu diferite suprafeţe sau mâinile muncitorilor. **(Borch et al. 1996).**

Contaminarea carcaselor de bovine cu *E. coli* poate surveni în timpul fluxului tehnologic, sursele cele mai importante de contaminare fiind reprezentate de materiile fecale. Astfel carcasele se pot contamina în timpul depozitării, prin contactul dintre ele sau indirect prin intermediul echipamentelor, instalaţiilor mâinilor muncitorilor, sau aerului. **(Barros et al 2007).**

Abatoarele de bovine şi porcine trebuie să implementeze un sistem HACCP, prin care să se stabilească şi să se reducă riscurile de contaminare microbiologică, cu obţinerea de carcase de calitate .**(Veloso, Reis, 2003).**

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul s-a realizat conform SR.EN ISO 6579/ 2002 pentru **Salmonella spp**. şi ANSVSA 78323/1998 pentru **E. coli.**

S-au recoltat 128 de probe de pe suprafaţa carcaselor, 64 de la bovine şi 64 de la suine. S-au utilizat carcase întregi, alese de pe fluxul tehnologic, atât din partea de prelucrare primară cât şi din cea finală.

Fiecare probă a fost recoltată prin ştergerea unei suprafeţe de 100 cm^2 cu ajutorul unui tampon steril. Suprafaţa a fost delimitată cu ajutorul unui şablon steril. După recoltare, tampoanele au fost introduse în tuburi cu apă peptonată.

De la suine s-au recoltat 32 de probe, după opărire, din regiunea gâtului, a pieptului şi partea externă a coapsei

Celelalte 32 de probe au fost recoltate după eviscerare, din aceleaşi regiuni.

De la bovine, au fost recoltate 32 de probe după jupuire, din regiunea pieptului, flancului şi partea internă a coapsei.

Alte 32 de probe au fost recoltate după răcire din aceleaşi regiuni.

Din probele iniţiale s-au efectuat diluţii seriate până la 10^{-6} cu ser fiziologic steril. Numărul total de germeni aerobi mezofili a fost determinat pentru diluţiile 10^{-4} şi 10^{-5} pe agar nutritiv prin înglobarea a 0,1 ml inocul. Pentru fiecare diluţie s-au efectuat câte două plăci. Plăcile însămânţate au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore.

Pentru determinarea microorganismelor indicator s-au folosit medii selective specifice.

Pentru determinarea numărului probabil de *E. coli,* s-a utilizat standardul ANSVSA 78323/1998. Conform acestui standard se însămânţează serii de câte trei eprubete, conţinând mediu de îmbogăţire selectivă şi tuburi Durham, cu proba de analizat şi cu diluţiile decimale ale acesteia. Acest mediu este reprezentat de bulion cu triptonă şi lauril sulfat. Eprubetele astfel pregătite se incubează la 37°C, pentru 24 h h.

După acest interval, din fiecare eprubetă în care s-a observat degajare de gaz, se însămânţează cel de-al doilea mediu de îmbogăţire selectivă, respectiv bulionul E.C. Eprubetele se incubează la 45°C pentru 24 de ore. Din fiecare eprubetă considerată pozitivă pentru E. coli a fost prelevată cultură şi inoculată pe un mediu selectiv, respectiv Levine.Pe acest mediu, prezenţa speciei E. coli a fost confirmată de apariţia coloniilor uşor bombate, de culoare violet închis cu luciu metalic şi reflexe auriu-verzui.Concomitent, din fiecare eprubetă cu mediu E.C care a prezentat degajare de gaz se însămânţează câte o eprubetă cu apă triptonată care se incubează la 45°C, pentru 48 h.

După incubarea eprubetelor cu apă triptonată, în fiecare se adaugă 0,5 ml reactiv Kovacs pentru identificarea prezenţei indolului. Eprubetele pozitive au fost examinate la lumina UV iar cele cu fluorescenţă au fost pozitive şi confirmate pentru *E. coli.* Se consideră reacţie pozitivă dacă la suprafaţa culturii apare un inel roşu. Calculul numărului cel mai probabil de *E. coli* se realizează, în funcţie de numărul eprubetelor care conţin cultură considerată pozitivă, folosind tabelul Mac Grady.

Pentru evidenţierea *Salmonella spp.* s-a respectat standardul SR.EN ISO 6579/ 2002.

Conform acestui standard, s-au înoculat 25 ml probă în apă peptonată (BPW) şi s-au incubat 24 de ore la 37°C. După 24 de ore, s-au însămânţat 2 tipuri de medii de îmbogăţire: Rappaport-Vassiliadis (RVS) şi Muller-Kaufmann (MKTTn), medii pe care se dezvoltă şi alte specii înrudite. S-au inoculat astfel 0,1 BPW în 10 ml RVS, 24 ore la 42°C şi 0,1 ml BPW în 10 ml MKTTn 24 ore la 37°C.

Pentru izolare selectivă s-a mai utilizat şi mediul solid de îmbogăţire: Istrati –Meitert, 24 ore la 37°C. După 24 de ore, s-au luat câte 5 colonii din fiecare placă şi s-au trecut pe agar nutritiv 24 ore la 37°C. Confirmarea s-a realizat prin testele M.I.U. şi T.S.I.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prezenţa microorganismelor pe carcase poate fi în anumite condiţii periculoasă pentru consumator. Evaluarea microflorei carcaselor, precum şi identificarea etapelor fluxului tehnologic, în timpul cărora acestea se pot contamina, sunt importante în stabilirea măsurilor preventive şi corective prin intermediul cărora evoluţia microflorei poate fi controlată.

Numărul total de germeni (NTG), determinat pe parcursul fluxului tehnologic al prelucrării bovinelor în abator, a furnizat valori cuprinse între 4,8 - 6,8 log CFU/cm^2 după etapa de jupuire şi 3,1-5,2 log CFU/cm^2 după etapa de răcire. Valorile cele mai mari s-au înregistrat după etapa de jupuire din regiunea internă a coapsei, iar cele mai mici după etapa de răcire din regiunea pieptului.(tabelul nr.1)

La suine NTG a înregistrat valori mai mari, cuprinse între 4,2 – 5,8 log CFU/cm^2 după etapa de opărire şi 4,2 -7,1 logCFU/ cm^2 după eviscerare. Valorile cele mai mari s-au obţinut după etapa de eviscerare din regiunea externă a coapsei, iar cele mai mici după etapa de opărire din regiunea pieptului. (tabelul nr. 2).

Arruda Pinto (2004) în studiul său efectuat pe carcase de suine, a determinat NTG-ul, înregistrând o valoare asemănătoare de 5,2 log CFU/cm^2, după opărire şi o valoare mai mică de 3,6 log CFU/ cm^2 după eviscerare.

Borch (1996) a determinat NTG la carcasele de suine, găsind o valoare de 3,8 log UFC/ cm^2, în etapele de pre-eviscerare.

Rivas (2000) obţine o medie asemănătoare de 4,3 log UFC/ cm^2 după opărire.

Tabel nr.1 Valorile NTG/cm^2 pe diferite regiuni ale carcaselor de bovine pe parcursul fluxului tehnologic în abator

Etapa tehnologică	Regiunea carcasei	Nr. probe examinate	NTG (log UFC/cm^2)		
			Valoare minimă	Valoare maximă	Media
Jupuire	piept	10	5,3	6,1	5,7
	flanc	10	4,8	5,8	5,3
	Partea internă a coapsei	12	5,2	6,8	6
Răcire	piept	10	3,1	4,5	3,8
	flanc	10	3,5	5,2	4,3
	Partea internă a coapsei	12	3,3	4,8	4

Tabel nr.2 Valorile NTG/cm^2 pe diferite regiuni ale carcaselor de suine pe parcursul fluxului tehnologic în abator

Etapa tehnologică	Regiunea carcasei	Nr. probe examinate	NTG (log UFC/cm^2)		
			Valoare minimă	Valoare maximă	Media
opărire	gât	10	4,5	5,3	4,9
	piept	10	4,1	5,2	4,6
	Partea externă a coapsei	12	5,1	5,8	5,4
eviscerare	gât	10	4,8	5,6	5,2
	piept	10	4,2	5,3	4,7
	Partea externă a coapsei	12	5,6	7,1	6,3

Valorile mari ale NTG după jupuire(bovine) sunt consecinţa unei încărcăturii mari de microorganisme cu care acestea ajung în abatoare iar după eviscerare (suine) valorile mari ale NTG se explică prin specificul acestei operaţiuni când carcasa poate veni în contact cu masa gastro-intestinală şi chiar cu conţinutul acesteia, situaţie care este mai frecventă atunci când operaţiunea se efectuează defectuos.

Prezenţa ***E. coli*** la suprafaţa carcaselor reprezintă un indicator de sanitaţie şi demonstrează nerespectarea etapelor fluxului tehnologic. *E. coli* a fost identificată mai frecvent la nivlul trenului posterior al carcasei, la bovine, unde s-a obţinut 58,8% probe pozitive din pareta internă a coapsei după jupuire.

Reis, **Veloso** and **Trigo** (2003), au obţinut valori mai ridicate la bovine (2,8 log UFC/cm^2, după jupuire şi valori mai scăzute (1,89 log UFC/cm^2) după spălare.

La suine s-a obţinut 66,6 % probe pozitive din regiunea externă a coapsei, după eviscerare. Din celelalte regiuni s-au obţinut valori mai mici.(tabelul nr. 3).

Arruda Pinto (2004), înregistrează o contaminare a carcaselor de suine cu *E. coli* de 60% după opărire şi de 16,6 % după eviscerare.

Tabel nr. 3 Valorile indicatorului E. coli/cm^2 pe diferite regiuni ale carcaselor de bovine şi suine pe parcursul fluxului tehnologic în abator

Specie	Etapa tehnologică	Regiunea carcasei	Nr. probe	Probe pozitive		Probe negative	
				Nr.	%	Nr.	%
Bovine	Jupuire	Piept	10	2	20	8	80
		Flanc	10	3	30	7	70
		Partea internă a coapsei	12	7	58,3	5	41,7
	Răcire	Piept	10	-	-	10	100
		Flanc	10	-	-	10	100
		Partea internă a coapsei	12	2	16	10	84
Suine	Opărire	Gât	10	4	40	6	60
		Piept	10	2	20	8	80
		Partea externă a coapsei	12	5	41	7	59
	Eviscerare	Gât	10	5	50	5	50
		Piept	10	4	40	6	60
		Partea externă a coapsei	12	8	66,6	4	33,4

Prezenţa *Salmonella spp.*, nu a fost observată la carcasele de bovine, însă a fost identificată în 8 probe din cele 64 analizate, de pe carcasele de suine, însumând un procent de 12,5%.

Numărul mare de probe (carcase) pozitive se poate datora fie animalelor purtătoare care sunt sacrificate în abator, fie contaminării încrucişate pe fluxul tehnologic.

Korsak şi col.(2003) obţin o valoare de 11,2 % probe pozitive (17 din 152) cu *Salmonella spp*, comparativ cu **McDowel şi col.** (2007), care obţin o valoare mult mai mare, de 40% probe pozitive, (205 din 513).

CONCLUZII

1. Studiul a relevat că din punct de vedere microbiologic etapele care contribuie cel mai mult la contaminarea carcaselor în abator sunt: jupuirea (bovine) şi opărirea şi eviscerarea (suine), etape care necesită o atenţie deosebită pentru a reduce gradul de contaminare a acestora.
2. Dintre regiunile corporale analizate, regiunea internă a coapsei la carcasele de bovine şi regiunea externă a coapsei la suine, sunt regiunile cu cele mai mari deficienţe din punct de vedere microbiologic, furnizând cel mai des rezultate pozitive la parametrii examinaţi.
3. Procentul de contaminare al carcaselor cu *E. coli*, raportat la totalul de 64 de probe pentru fiecare specie a fost de 21,8 % la cele de bovine şi 42,1 % la cele de suine.
4. Salmonella spp., a fost identificată în probele recoltate de la suine, în procent de 12,5%.
5. Stabilirea unor măsuri, pornind de la instruirea permanentă a personalului din abatoare privind punctele critice, aplicarea unor tehnologii performante şi întreţinerea în stare bună de igienă şi de funcţionare a instalaţiilor şi a spaţiilor sunt absolut necesare pentru reducerea contaminării şi îmbunătăţirea calităţii microbiologice a carcaselor de bovine şi suine.

BIBLIOGRAFIE

1. **Apostu S.,** (2004)- Managementul calităţii alimentelor, Ed. RisoPrint Cluj- Napoca.
2. **Arruda Pinto** (2004)- Swine carcass microbiological evaluation and hazard analysis and critical control points (HACCP) in a slaughterhouse in Minas Gerais, Brazil, Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiologia, Vol. 24.
3. **Bărzoi, D., Apostu, S.** (2002) Microbiologia produselor alimentare Ed. RISOPRINT, Cluj-Napoca
4. 4. **Borch E, Nesbakken T, Christensen H,** (1996)- Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. Int J Food Microbiol; 30(1/2): 9-25.
5. **Márcia de Aguiar Ferreira Barros[I, II,] Luís Augusto Nero[II, III]; Alexandre Amorim Monteiro[II]; Vanerli Beloti[II],** (2007) - Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants, Cienc. Tecnol. Aliment., vol. 27, no.4.
6. **Carp-Cărare M., Guguianu E., Timofte D.,** (1997)- Lucrări practice de microbiologie veterinară, Uz intern, Iaşi.
7. **Korsak N., Jacob B., Groven B., Etienne G., China B., Ghafir Y., Daube G.,** (2003)-Salmonella contamination of pigs and pork in an integrated pig production system, International Journal Food Microbiology.
8. **McDowel S.W., Porter R., Madden R., Cooper B., Neill S.D.,** (2007)- Salmonella in slaughter pigs in Northern Ireland: prevalence and use of statistical modelling to investigate sample and abattoir effects, International Journal food Microbiology.
9. **Reis1, C. I. S.C" Trigo2,;M. J, e Veloso1. M. G, C.,** (2003)- Microbiological Contamination Of Beef Carcass During Slaughter, 1 - cnsA, Faculdade de Medidna Veterinaria, Lisboa; 2 - INIAP, Quinta do Marqu~s, Oeires.
10. **Rivas T, Vizcaíno JA, Herrera FJ**.(2000)- Microbial contamination of carcasses and equipment from an Iberian pig slaughterhouse., Journal Food Protection; 63- 70.

APRECIEREA CALITĂŢII IGIENICE A LAPTELUI DE CAPRĂ PRIN DETERMINAREA NUMĂRULUI DE CELULE SOMATICE ŞI A NUMĂRULUI TOTAL DE GERMENI

QUALITY CONTROL OF GOAT MILK USING TOTAL GERM AND SOMATIC CELL COUNT

VOICU Elena[1], CARP-CĂRARE M.[1], AMĂRICĂI Mariana[2], VOLOŞENIUC M.[3]
[1]FMV Iaşi
[2]DSVSA Vrancea
[3]S.C. Dorna Lactate S.A.

Researches were done on 90 goat milk samples. Milk salubrity was appreciated using total germs count (TGC) and 20 samples were considered unsuited for human consume while the other 70 samples were microbiological salubrious. Another parameter considered to appreciate milk salubrity was the somatic cell count (SCC), the obtained value being between 1000x 10^3SCC/ml and 1550x10^3SCC /ml.

Key words: goat milk, TGC, SCC

Laptele ca produs alimentar a fost şi va rămâne pentru toate categoriile de consumatori un aliment de bază, atât în forma sa naturală, cât şi ca produs prelucrat.

Sănătatea şi integritatea lui este esenţialmente asigurată de sănătatea animalului si a mamelei care-l produce în primul rând, şi a condiţiilor de procesare şi valorificare în al doilea rând.

Se profilează tot mai mult preocuparea consumatorilor spre a prefera un lapte care să nu satisfacă doar dezideratul cantitativ, ci mai ales calitatea igienică (starea de sănătate).

Se acceptă să fie consumat numai acel lapte care se încadrează în limita unui număr determinat de germeni, în limita unui număr stabilit de celule, a unui lapte fără adaos de apă, cu valori bine precizate de aciditate, etc.

Calitatea igienică laptelui nu este legată de conţinutul de grăsime şi proteină ci de următorii parametri :

- flora microbiană
- celule somatice

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru aprecierea calităţii igienice a laptelui pe baza determinării numărului de celule somatice şi a numărului total de germeni au fost cercetate un număr de 90 de probe de lapte provenite de la capră.

Pentru determinarea numărului de celule somatice s-a folosit aparatul SOMACOUNT 150.

Aparatul determină numărul de celule somatice/ml lapte, prin numărarea pulsurilor electrice, determinate de trecerea acestor celule printr-un capilar transparent plasat în faţa unei raze laser de culoare verde.

Probele de lapte recoltate în flacoane de plastic de 50 ml, s-au încălzit la 40º C, după care se analizează. Aparatul este prevăzut cu un agitator care se introduce în fiecare flacon pentru omogenizarea probei de lapte. După agitare, aparatul extrage din proba de analizat 2,5 ml lapte, printr-un impuls, apoi 3 ml de soluţie colorantă. Din amestec, aparatul preia 1 ml şi îl trimite prin capilarul transparent la dispozitivul de citire plasat în faţa unei raze laser de culoare verde.

Flora totală a laptelui poate fi determinată prin tehnica de determinare rapidă cu aparatul Bactocount 50.

Bactocount 50 determină conţinutul de bacterii pe mililitru lapte, respectiv NTG, prin numărarea pulsurilor electrice cauzate de trecerea acestor celule printr-un capilar transparent plasat în faţa unei raze laser de culoare verde.

Probele de lapte s-au recoltat în flacoane sterile de 10 ml. Pentru analizare din fiecare flacon s-a extras 3 ml lapte, care este transportat print-un capilar la carusel (incubator) prevăzut cu 23 godeuri. În fiecare godeu se însămânţează 1 ml lapte şi 1 ml soluţie colorantă de acrinidine – orange.

Incubarea durează 7 – 8 min la 45° C, după care proba a fost extrasă cu o seringă şi diluată cu o soluţie care conţine 3 picături TRITON X şi 1 ml amoniac la 1 litru apă distilată. Aceasta este filtrată printr-o membrană filtrantă de polivinil – propilen de 0,6 µ din care se extrage 1 ml şi trimisă unui contor de numărare.

Bacteriile din soluţia colorantă energizează laserul care emite impulsuri de culoare roşie date de bacterii când lumina pulsează într-un detector fotomultiplu.

Eficienţa aparatului este dată de faptul că rezultatele analizelor sunt obţinute într-un timp foarte scurt prin incubare rapidă (aproximativ 7 minute), spre deosebire de metoda prin însămânţarea probei pe mediu de cultură (după 48 ore).

Periodic, pentru confirmarea corectitudinii rezultatelor, acest aparat este calibrat, cu ajutorul unor soluţii etalon, furnizate de firma "Bentley Instruments U.S.A." şi verificate din punct de vedere funcţional de către reprezentanţii firmei producătoare.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În Statele Unite ale Americii, limita legală pentru numărul celulelor somatice pentru laptele de capră a fost stabilită la 1.000.000 celule/ml.(***Droke si col. 1993***). La Simpozionul internaţional "Somatic Cells and Milk of Small Ruminants" (***Bella, Italia, 1993***), s-a sugerat autorităţilor Comunităţii Europene ca pragul maxim al celulelor somatice pentru laptele de colectură de capră la nivelul tancului de lapte al unei ferme, să fie de 1.500.000 celule/ml. (***Barbosa si col. 1994***)

Laptele de capră destinat fabricării laptelui tratat termic pentru consum uman sau fabricării produselor pe bază de lapte tratat termic trebuie să aibă un N.T.G./ml de maximum 1500000, ca medie geometrică într-o perioadă de 2 luni, cu cel puţin două probe lunar. Pentru laptele crud destinat fabricării unor produse care nu implică nici un tratament termic, N.T.G.- ul/ml maxim admis este de maximum 500000 (***Ordinul 389 / 2002***)

În urma unui studiu realizat de ***Paape şi col.(2000),*** numărul celulelor somatice la caprele fără infecţie mamară a prezentat valori cuprinse între 270 – 2000 x 10^3 /ml, iar la cele cu infecţie a ajuns la 659 la 4213 x 10^3 /ml.

Rezultatele cercetărilor privind determinarea numărului de celule somatice şi a numărului total de germeni al laptelui provenit de la capră sunt redate în tabelul nr.1

Examenul probelor de lapte a relevat un nivel de contaminare microbiologic foarte variat. Numărul total de germeni (NTG) în cele 90 de probe examinate a avut valori cuprinse între 1500x10^3 germeni/ml şi 1950x10^3 germeni/ml. Numărul celulelor somatice a variat între 1000 x10^3NCS/ml şi 1550x10^3NCS/ml

Tabel nr. 1 Variaţia NCS-ului şi NTG-ului la laptele de capră

Nr.probe	Tip lapte	NCS	NTG
70	Lapte normal	<1000x 10^3	<1500x10^3
15	Lapte mamită subclinică	1100-1500x10^3	1500 -1900x10^3
5	Lapte mamită clinică	>1550x10^3	>1950x10^3

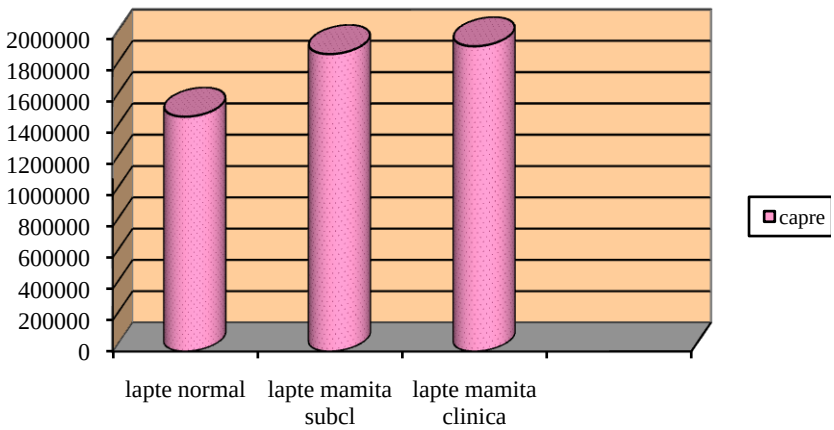


Fig. nr. 2 Variaţia numărului total de germeni

Analizând datele obţinute rezultă că din cele 90 de probe:

- 70 (77.7%) au avut o încărcătură microbiologică situată sub limita maximă admisă ($1500x10^3$germeni/ml);
- 30 (22,15%) au depăşit limita maxima admisă fiind improprii pentru consumul uman.(fig.nr.2)

Determinarea NCS la cele 90 de eşantioane de lapte capră recoltate individual comparativ cu nivelul standard recomandat de 1.000.000 NCS/ml, rezultă următoarele:

- numai 77,7% din numărul total de probe examinate se încadrează normei recomandate;
- 16,6% din esantioane au înregistrat valori între 1.000.000 si 1.500.000 NCS/ml, si;
- 5,55% din probe au înregistrat valori peste 1.500.000 NCS/ml. (fig. nr.3)

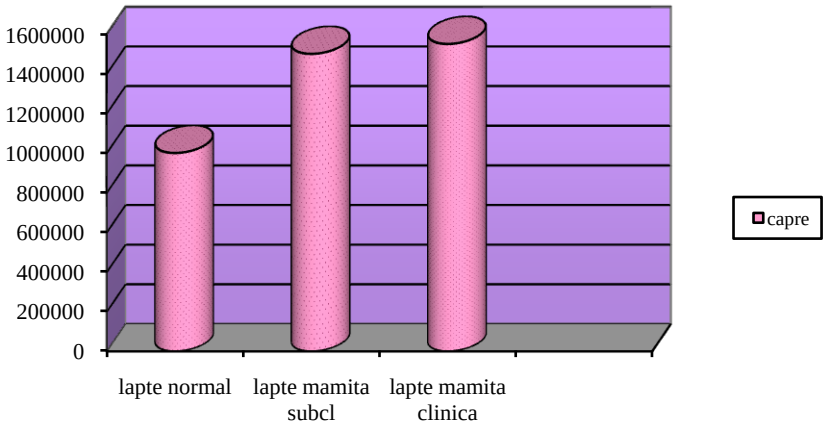


Fig. nr.3 Variaţia numărului de celule somatice

Admiţând ca şi condiţie de valorificare a laptelui în consumul uman limita menţionată (1.000.000 NCS/ml), rezultă că numai 77,7% din cantitatea de lapte este conformă, deci consumabil.

CONCLUZII

- S-a urmărit aprecierea salubrităţii laptelui de capră pe baza a 2 indicatori igienico-sanitari: încărcătura microbiană(NTG-ul); numărul de celule somatice.
- Numărul de germeni/ml a variat între$1500x10^3$ germeni/ml şi $1950x10^3$germeni/ml
- Numărul de germeni variază în funcţie de sezon, fiind în general mai scăzut în sezonul rece (toamna, iarna) şi mai crescut în sezonul cald (primăvara, vara).
- Numărul de celule somatice/ml a variat între $1000x\ 10^3$NCS/ml şi $1550x10^3$NCS/ml.
- În funcţie de rezultatele celor două teste (NTG, NCS), 30 (22,15%) din probe au depăşit limitele admise($1500x10^3$ germeni/ml şi $1000x\ 10^3$).

BIBLIOGRAFIE

1. Barbosa, M., Barillet, F., Berthelot, X., Casu, S., Foglini, A., Gabiña, D., Jaubert, G.,Kalantzopoulos, G., Lleda, A., Perrin, G., Poutrel, B., Renaud, R. and Rubino, R. (1994) - *Conclusioni del comitato scientifico. In: Somatic Cells and Milk of Small Ruminants,* Rubino, R.(ed.). EAAP Pub. No. 77. Wageningen Pers, Wageningen.
2. Droke E.A., Paape M.J., Di Carlo A.L., (1993) – *Prevalence of high somatic cell count in bulk tank of goat mil*k, Journal Dairy Sci. 76: 1035-1039
3. Haenlein, G.W., Hinckley, L.S. (1995).- *Goat milk somatic cell count situation in USA*. Inter. J. Animal Sci. 10, 305-310.
4. Hinckley, L. S**. (**1991).- *Quality standards for goat milk.* Dairy Food Environ. Sank11:511
5. Paape, M.J., Capuco, A.V., Contreras, A., Marco, J.C. (2001). *Milk somatic cells and lactation in small ruminants*. *J. Dairy Sci.* 84, 237.
6. Schultz J., (1994) – *Somatic cells in goat milk,* Tierarzl Praxis, 438-42
7. [xxx]Ordinul M.A.A.P. nr. 389/2002 pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind condiţiile de sănătate pentru producerea şi comercializarea laptelui crud, a laptelui tratat termic şi a produselor pe bază de lapte, cu modificările şi completările ulterioare.

RESEARCHES REGARDING CYTOMORPHOLOGY IN SHEEP MILK

VOICU Elena, SOLCAN Carmen, CARP-CĂRARE M.
FMV Iaşi

90 samples of sheep milk from 30 animals were analysed. Those animals were surveilled for a 3 month periode. Following examination of cytological smears from normal milk, rare cellular elements represented by: monocytes – macrophages, polymorphonuclear, with segmented nucleus, lymphocytes, eosinophils there were observed. In case of mamitic milk modifications of polymorphonucleare neutrophils morphological characters were observed.

Key words: sheep milk, cytomorphology

Semnalate pentru prima dată de Stokes cu aproape o sută de ani în urmă, celulele din lapte au fost considerate ca făcând parte din micii componenţi ai laptelui.

Noţiunea de celule somatice, adică celule care provin din patrimoniul celular propriu al organismului, se defineşte ca totalitatea celulelor existente la un moment dat într-un volum de lapte, indiferent de structura, forma şi originea lor.

Sintetizând datele cunoscute până în 1993 cu privire la celulele din lapte, *Rotaru şi col.* precizează că "*laptele normal conţine celule de origine diferită: unele derivă din sânge, altele provin din glanda mamară (epiteliul alveolar), respectiv din peretele canalelor galactofore sau canalul papilar (celule epiteliale aplatizate şi celule cilindrice). Celulele cu origine directă din sânge sunt limfocite, leucocite polimorfonucleare – neutrofile, euzinofile, bazofile – monocite sau mononucleare, eritrocite*".

În laptele de oaie, numai 10 % din celulele somatice provin din glanda mamară (eozinofile, celule epiteliale), care sunt secretate în mod normal împreună cu laptele. Restul de 90% din celulele somatice sunt celule care provin din sânge (macrofage, leucocite, limfocite) acestea contribuind în mod normal la apărarea imună a glandei mamare.

MATERIAL ŞI METODĂ

Frotiurile au fost realizate direct din laptele proaspăt, bine amestecat, sau din sedimentul rezultat la centrifugare, prin una din tehnici : tehnica frotiului de sânge sau metoda squash. Selectarea tehnicii depinde de celularitatea, vâscozitatea şi omogenitatea lichidului.

Centrifugarea s-a făcut timp de 10 minute la 2500 rotaţii / minut. După centrifugare, aproape tot supernatantul a fost îndepărtat, lăsând doar o picătură de lichid împreună cu depozitul de pe fundul tubului. Depozitul a fost apoi resuspendat printr-o agitare uşoară în lichidul rămas, o picătură din suspensie s-a etalat pe lamă şi s-au efectuat preparate prin tehnica frotiului de sânge sau metoda squash. Frotiul este uscat la aer, iar fixarea s-a făcut în alcool-acetonă în părţi egale timp de 10 minute.

Este important a nu se apăsa şi a nu aplica nici o presiune peste lama etalatoare, deoarece aceasta provoacă deformarea şi dezagregarea celulelor. Greutatea lamei este de obicei suficientă pentru etalarea adecvată a celulelor. După ce s-a întins materialul, se ia lama de sus prin alunecare spre stânga sau spre dreapta, până când cele două lame sunt separate.

Este foarte importantă uscarea preparatului, imediat după etalarea lui pe lamă, indiferent de metoda folosită. Fixarea preparatelor se poate face prin uscare la temperatura camerei, prin agitarea lamei în aer. Nu este recomandată uscarea cu aer cald, deoarece se modifică destul de mult morfologia celulelor.

Un frotiu corect, în stare proaspătă, are aspect lucios şi prin uscare devine mat.

Frotiurile astfel obţinute au fost supuse colorării. Metoda de colorare folosită a fost May – Grünwald – Giemsa, coloraţie care, până la ora actuală, nu a fost detronată de nici o metodă pentru studiul morfologiei celulelor. Metoda May – Grünwald – Giemsa este o coloraţie combinată şi se bazează pe principiul afinităţii fizice şi chimice ale celulelor faţă de coloranţi.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În frotiurile efectuate din lapte nemamitic, s-a observat prezenţa neutrofilelor, a limfocitelor, a monocitelor- macropfage şi eventual mici grupuri de microbi de poluare.

Polimorfonuclearele neutrofile prezintă un nucleu polilobat, căruia gradul de segmentaţie are aceeaşi semnificaţie morfologică la fel ca şi în cazul aceluiaşi tip de celule din sânge. Citoplasma prezintă granulaţii foarte fine şi dispersate. Forma polilobată a nucleului neutrofilelor este foarte importantă, deoarece permite o aliniere rectilinie a lobilor şi migrarea rapidă a acestor celule printre celulele endoteliale sau epiteliale alveolare din glanda mamară (**fig.nr.1**)

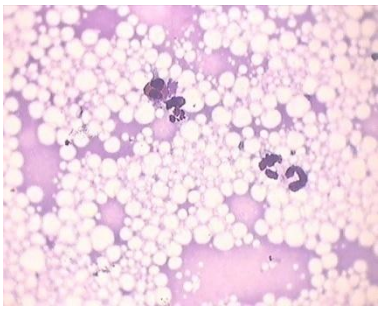


Fig. nr. 1 Citosediment lapte oaie- neutrofile (MGG x 100)(original)

Limfocitele din lapte sunt asemănătoare morfologic cu cele sangvine, dar variază foarte mult din punct de vedere al dimensiunii şi volumului, întâlnindu-se limfocite mici, mijlocii şi mari.

Din punct de vedere morfologic, se poate constata: forma sferică sau uşor ovală, diametru de 4 – 8 µm şi un nucleu compact, mare, rotund şi indentat. Citoplasma este redusă la un inel perinuclear şi are un caracter bazofil, conţinând granule azurofile, organite celulare slab reprezentate, rare vacuole, cristale şi structuri tubulare. Tinctorial, nucleul este intens cromatic, cu citoplasma bazofilă, prezentând rare granule oxifile. De asemenea, limfocitele mari pot prezenta o distribuţie specifică cromatinei în nucleu, care este reniform, iar în citoplasma din apropierea nucleului se găsesc granulaţii azurofile (**Fig. 2**).

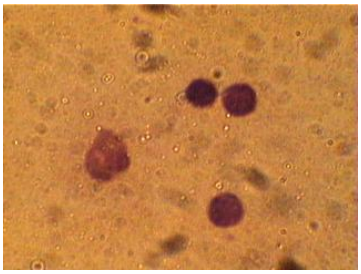


Fig. nr. 2 Citosediment lapte oaie sănătos- limfocit (MGG x 100)(original)

Macrofagele din lapte formează o populaţie heterogenă, variind foarte mult din punct de vedere numeric, al dimensiunii şi formei. Astfel, se pot întâlni în lapte macrofage mici, mijlocii şi mici. Citoplasma macrofagelor este încărcată cu globule de grăsime, care pot acoperi parţial, uneori chiar total, nucleul şi prezintă un aspect luminos, clar, cu numeroase vacuole, granulaţii şi chiar incluziuni, în funcţie de stadiul de activare. Nucleu prezintă o formă rotundă sau ovală, uneori alungit – reniform şi chiar lobat, din cauza vacuolizărilor multiple (Fig. 3).

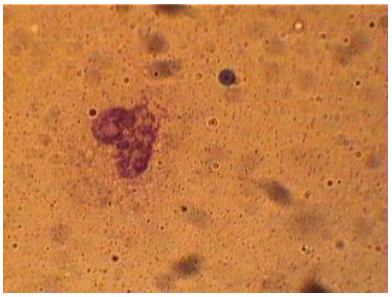


Fig. nr. 3 Citosediment lapte oaie sănătos- macrofag (MGG x 100)(original)

În frotiurile realizate din lapte mamitic, se constată aglomerarea neutrofilelor (în frotiu se constată un aspect „tumoral”). În aceste „aglomerări” se înglobează limfocite, macrofage şi detritusuri, fenomen care se accentuează pe măsură ce procesul infecţios avansează (**Fig. 4**).

De asemenea, pe măsură ce procesul infecţios şi inflamator avansează sau mamita trece în formă cronică procentul de neutrofile moarte prin apoptoză sau epuizate fiziologic, este foarte mare.

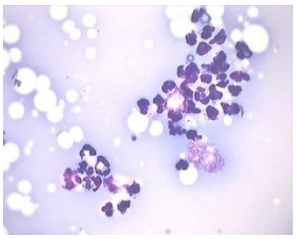
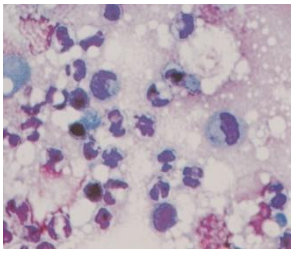


Fig. nr. 4 Modul de dispunere a neutrofilelor din laptele mamitic (MGG x100)(original)

În contextul populaţiei celulare din laptele mamitic, monocitele – macrofage hiperactivate se detaşează din punct de vedere morfologic, număr şi grupare a lor în funcţie de stadiul evolutiv al inflamaţiei, variind de la elemente izolate, la grupuri de 2-3 celule



Consecutiv instalării infecţiilor la nivelul glandei mamare, încă din faza iniţială a răspunsului inflamator, neutrofilele migrează din sânge în lapte, reprezentând 95% din celulele care formează bariera celulară. Contribuţia macrofagelor la formarea barierei celulare împotriva instalării mamitelor este secundară, aceste celule fiind mai puţin eficiente în distrugerea bacteriilor decât neutrofilele, datorită, posibil, lipsei de mieloperoxidază.

CONCLUZII

1. Populaţia celulară din lapte este de origine sanguină(nesomatică):
2. Celulele din lapte răspund foarte semnificativ atunci când în mamelă evoluează un proces inflamator.
3. Examenul citomorfologic stabileşte tipul şi caracterul mamitei, putând diagnostica etiologia acesteia.
4. Deşi laptele se pretează şi pentru alte studii citologice, citoenzimologice, imunologice şi pentru microscopie electronică este totuşi mult mai dificil de manipulat, prelucrat şi studiat comparativ cu sângele.

BIBLIOGRAFIE

1. Faraoult, B., (1988) - *Les cellulles du lait*, Bull. des G.V.T., 4(B-3281), pp.39-50
2. Gonzalo, C., J. A. Carriedo, J. A. Baro, and F. S. Primitivo. 1994. *Factors influencing variation of test day milk yield, somatic cell count, fat and protein in dairy sheep*. J. Dairy Sci. 77:1537–1542.
3. Leitner, G., M. Chaffer, A. Shamay, F. Shapiro, U. Merin, E. Ezra, A. Saran, and N. Silanikove. (2004).- *Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep.* J. Dairy Sci. 87:46–52.
4. Ognean L., Rotaru O., Lojan N., Roşioru C., (1998) – *Strucutri citomorfologice întâlnite în configuraţia populaţiei celulare din lapte*, Al 24-lea Simpozion “Actualităţi în patologia animalelor domestice,” Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, p. 329-335
5. Paape, M.J., Capuco, A.V., Contreras, A., Marco, J.C. (2001). *Milk somatic cells and lactation in sall ruminants*. *J. Dairy Sci.* 84, 237.
6. Rotaru, O., Ognean, L.,(1998) - *Morfologia şi fiziologia populaţiei celulare din lapte*, Ed. Casa Cărţii de Ştiinţă, Cluj
7. www.adep.ro/pls/legis
8. www.ansv.ro
9. www.asro.ro/
10. www.ciencia.com
11. www.lait.org
12. www.medlib.med.utah.edu.-Histology procedure manuals

THE EVALUATION OF EARLY METHODS OF DIAGNOSIS FOR THE BLV INFECTION

VUŢĂ V., BĂRBOI Gh., TURCITU M.A., OLVEDI Irina, BONCEA D., ORĂŞANU Adriana, ALEXANDRU N., NICOLAE Şt.
IDSA Bucureşti
vuta.vlad@idah.ro

The purpose of this study was the evaluation of early methods of diagnosis for the BLV infection. Thus, 35 bovines were tested by serological tests (ELISA and AGID), molecular biology tests (PCR) and also hematological tests. Twelve of them were studied using histological test too. All the thirty five animals were detected serompositive, but eleven of them have been found negative by PCR. All positive animals by PCR have positive results in all serological assays. The bovines tested by hematological and histological assays were negative. All animals were also negative by anatomoclinical examination. Conclusively, the serological assays are the most suitable tests for the early diagnosis for the BLV infection.

Key words: Bovine Enzootic Leukosis, ELISA, AGID, PCR

Virusul leucemiei bovine, un retrovirus bovin limfotrop face parte din subfamilia Oncovirinae, familia Retroviridae, genul Deltaretrovirus, în care sunt de asemena incluse virusul leucemiei umane cu celule T tipul 1 precum şi tipul 2 (2, 9). Acesta sunt virusuri limfotrope fară evoluție acută, inducînd neoplazie limfoidă după o lungă perioadă de latență (11). În cele mai multe cazuri infecția cu virusul Leucozei Bovine (BLV) este clinic inaparent, animalele rămînînd asimptomatice sau aleucemice (AL) (12). Doar unul din trei animale infectate dezvoltă limfocitoză persistentă (PL), o expansiune policlonală a limfocitelor B (exprimate printr-un nivel ridicat de CD5 pe suprafața IgM) şi a markerilor mieloizi (3, 7). După o perioadă de latență de la 1 la 8 ani transformarea neoplazică monoclonală a limfocitelor B infectate duce la leucemie fatală sau limfom, la mai puțin de 5 % din animalele infectate(5, 6). Riscul apariției leucemiei sau limfoamelor este mai mare la animalele cu PL decît la cele cu AL, PL fiind considerată o condiție preneoplazică (4). BLV realizează infecția persistentă în subpopulațiile de limfocite B prin integrarea provirusului ADN în ADN-ul celulei gazdă. Glicoproteinele învelişului viral gp51 şi gp 30 sunt direct implicate în patogeneză şi împreună cu p24, proteina structurală majoră pot provoca un puternic răspuns imun la bovinele infectate (8). Pentru că majoritatea animalelor infectate dezvoltă anticorpi specifici, metodele pentru diagnosticul LEB au ca scop detectarea anticorpilor anti BLV din ser sau lapte la animalele în vârstă de peste 6 luni. Diagnosticul serologic al LEB se bazează pe detecția anticorpilor anti gp51, condiție esențială într-un program eficient de eradicare al LEB. În ultimul timp se folosesc diferite metode de diagnostic serologic ca ID sau ELISA iar în anumite situații PCR. Metoda ELISA se bazează pe folosirea lui gp51 parțial purificat şi a anticorpilor monoclonali împotriva epitopilor lui gp51 (8). PCR este o metodă de diagnostic alternativă al cărui scop este de a detecta provirusul ADN (1, 4).

În lucrarea de față prezentăm corelația dintre examenele serologice, de biologie moleculară şi examenele anatomoclinic, histopatologic şi hematologic în LEB.

MATERIALE ŞI METODE

Animale. În acest studiu au fost examinate 35 de bovine din gospodăriile populației, cu vârsata cuprinsă între 6 luni şi 10 ani, din două județe şi care au necesitat expertiză de diagnostic pentru LEB. După confirmarea diagnosticului de leucoză ,12 bovine au fost sacrificate în cadrul programului national de eradicare al LEB.

Examenul clinic şi de abator a urmărit examinarea limfonodulilor externi şi interni, a carcasei şi a organelor interne.

Probele de sânge au fost recoltate din vena jugulară. Pentru ELISA şi ID sângele s-a recoltat în tuburi fără anticoagulant, serul fiind recoltat după centrifugare.

Testul de imunodifuzie în gel de agar (ID). Testul ID a fost executat folosind un Kit comercial. Gelul de aagar (0,8% agar Noble în tampon Tris -conform Manualului OIE) a fost turnat în plăci Petri cu diametrul de 9 cm ce permit citirea a 21 de probe simultan. Plăcile au fost incubate în cameră umedă. Citirea s-a făcut după 24 de ora cu interpretare finală la 72 de ore de către doi specialişti cu

experienţă folosind o lampă cu fascicol de lumină pe fond întunecat. Rezultatele au fost interpretate ca pozitiv, slab pozitiv şi negativ.

Testul imunoenzimatic ELISA. A fost utilizat un kit comercial pentru detectarea anticorpilor din ser anti BLV, varianta indirectă. Densitatea optică (DO) a probelor a fost citită la 450 nm. Probele au fost interpretate ca pozitive dacă raportul dintre DO a probei şi DO a serului martor pozitiv înmulţit cu100 a fost mai mic sau egal cu 100 şi negative dacă acelşi raport a fost superior lui 100. Probele au fost analizate folosind un cititor comercial de plăci. Pentru validarea reacţiei DO a serului de referinţă pozitiv trebuie să fie de minim 0.350 şi raportul dintre DO a serului martor pozitiv şi DO a serului martor negativ să dea o valoare de minim 3.

La ambele teste serologice s-a utilizat serul intenaţional de referinţă E4/10 UE.

PCR. Materialul biologic supus extracţiei a fost reprezentat de 200µl sânge integral recoltat pe anticoagulant (EDTA) respectiv 200µl supernatant lizat de organe (lizare automată, prin folosirea instrumentului *Magna Lyzer- Roche Applied Science*).

Extracţia acizilor nucleici: S-a efectuat automat, prin folosirea robotului *Magna Pure LC- Roche Applied Science* şi a kit-urilor specifice, pentru izolarea ADN-ului proviral (*MagNA Pure LC DNA Isolation Kit* I- *Roche Applied Science*).

Identificare provirus: s-a folosit un protocol *Nested PCR*, recomandat de OIE, cu obţinerea unui amplicon de 341 perechi de baze (341 pb), prin utilizarea de kit-uri comerciale (*GoTaq DNA Polymerase - Promega*).

Examenul hematologic. Probele de sânge au fost recoltate pe anticoagulant (EDTA) şi prelucrate în primele 24 de ore după prelevare. S-a efectuat examen hematologic cantitativ şi calitativ.

Analizele au fost efectuate la analizorul hematologic automat COULTER AcT5diff- CP. Principiul *Coulter* măsoară diluţia finală eritrocite/plachete (RBC/Plt) şi diluţia leucocite/bazofile (WBC/BASO).

Ex. hematologic cantitativ a urmărit determinarea numărului de eritrocite, hemoglobinei, hematocritului, indicilor eritrocitari derivaţi (VEM, HEM, CHEM), numărului de leucocite.

Ex. hematologic calitativ a avut ca scop determinarea formulei leucocitare, examenul cito-morfologic pe frotiu de sânge periferic colorat panoptic May Grunwald Giemsa.

Examenul microscopic (*ex. hematologic calitativ*) s-a realizat la microscopul LEICA DM LS2.

Obţinerea formulei leucocitare cu diferenţierea a 5 subpopulaţii leucocitare, se face utilizând simultan metodologia denumită diferenţială (DIFF) şi leucocitară/bazofilă (WBC/BASO).

Examenul histopatologic. Probele prelevate din fragmentele de organe au fost colorate prin metodele Masson modificat şi Pappenheime.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Examenul anatomoclinic nu a evidenţiat la nici un animal modificări ale limfonodurilor externe (retromamare, precrurale, prescapulare, cervical etc), iar examinarea carcaselor, organelor şi a limfonodurilor externe şi interne la animalele sacrificate de asemenea nu a evidenţiat vre-un semn caracteristic leucozei.

Serologic , atât prin ELISA cât şi prin ID au fost confirmate ca pozitive toate cele 35 de animale. Concordanţa dintre cele două teste a fost de 100%.

Dintre cele 35 de bovine serologic pozitive 11 (31,4%) au fost negative la PCR. Toate animalele pozitive prin PCR au fost pozitive şi prin ELISA şi ID-Tabel 1 şi 2.

În urma examenului citomorfologic nu s-au identificat atipii celulare, iar indicii hematologici în raport cu vârsta animalelor au fost normali.

La 12 bovine testate, examenul histologic nu a evidenţiat modificări specifice bolilor neoplazice-Tabel 2.

Examenele serologice efectuate au pus în evidenţă anticorpii anti BLV înainte ca modificările hematologice, antomoclinice şi histopatologice să apară confirmând datele din literatura de specialitate (5, 9, 12).

Unele neconcordanţe între PCR şi testele serologice se pot datora formei în care persistă infecţia cu virusul LEB (provirus integrat), fapt semnalat şi de alţi autori (13)

Tabel 1 Rezultatele examenelor de laborator pentru 23 de bovine testate

Nr. crt.	Examene efectuate		
	ID	**ELISA**	**PCR provirus sânge integral**
1	P	P	N
2	P	P	N
3	P	P	P
4	P	P	P
5	P	P	N
6	P	P	N
7	P	P	P
8	P	P	P
9	SP	P	N
10	SP	P	N
11	P	P	N
12	P	P	P
13	P	P	P
14	SP	P	P
15	P	P	P
16	P	P	P
17	P	P	N
18	P	P	P
19	P	P	P
20	P	P	P
21	P	P	P
22	P	P	P
23	P	P	P

Tabel 2 Rezultatele examenelor de laborator la animalele sacrificate

Nr. Crt.	Examene efectuate			
	ID	**ELISA**	**PCR provirus sânge integral**	**Ex. histopatologic**
	P	P	P	Hiperplazie limfoidă l
	P	P	P	Hiperplazie foliculară s, l
	P	P	P	FM specifice
	SP	P	P	Hiperplazie foliculară
	P	P	N	Hiperplazie limfoidă l
	P	P	P	Hiperplazie limfoidă l
	P	P	P	Hiperplazie, hipertrofie l
	P	P	N	Hiperplazie limfoidă l
	P	P	P	Hiperplazie limfoidă l
	SP	P	P	Hiperplazie limfoidă l
	P	P	N	Hiperplazie limfoidă l
	P	P	P	Hiperplazie limfoidă l

P-pozitiv
N-negativ
SP-slab pozitiv

CONCLUZII

1. Corelaţia între examenele serologige (ELISA şi ID) a fost de 100 %.
2. Rezultatele obţinute la examenele serologice şi cele de la PCR s-au corelat în proporţie de 68,6 %.
3. Animalele investigate prin examene serologice şi de biologie moleculară nu au prezentat modificări la examele hematologice, histopatologice şi anatomoclinice.

BIBLIOGRAFIE

1. Beier D, Blankenstein P, Fechner H:, Application of a polymerase chain reaction to the diagnosis of bovine leucosis virus infection. Dtsch Tieraerztl Wochenschr, 1998,105:408–412
2. Burmeister T., Schwartz S., Hummel M., Hoelzer D.No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. Retrovirology 2007, 4:11
3. Choi K. Y., Monke D., Stott J. L. Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. J Vet Diagn Invest 2002, 14:403–406.
4. Dequiwdt F., Cantor G., Hamilton V., Davis W., Kerkofs P., Burny A., Bovine Leukemia Virus-Induced Persistent Lymphocytosis in Cattle Does Not Correlate with Increased Ex Vivo Survival of B Lymphocytes Journal of Virology, 1999, 73:2, p. 1127–1137

5. Ferens W. A., Cobbold R., Hovde C. J. Intestinal Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Bacteria Mitigate Bovine Leukemia Virus Infection in Experimentally Infected Sheep. Infection and Immunity 2006, 2906–2916.
6. Fulton B. E., Portella M., Radke1K., Dissemination of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells from a Newly Infected Sheep Lymph Node. Journal of Virology 2006, 7873–7884
7. Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. Retrovirology 2007, 4:18
8. Giuseppe A. De, Feliziani F., Rutili D. Expression of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein (gp51) by Recombinant Baculovirus and Its Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2004, 147–151
9. Jacobs M., Song Z., Poon H., Heeney L., Taylor A.Proviral Detection and Serology in Bovine Leukemia Virus-exposed Normal Cattle and Cattle with Lymphoma. Can.J.Vet.Res. 1992, 56, 339-348
10. Kaczmarczyk E., Bojarojć-Nosowicz B Lymphocyte proliferation efficiency in the first months of life of heifers naturally infected with Bovine Leukaemia Virus. Bull Vet Inst Pulawy 2005, 49, 9-14.
11. Kerkhofs P., AdamE. , Droogmans L., Portetelle D., Mammerickx M Cellular Pathways Involved in the Ex Vivo Expression of Bovine Leukemia Virus Journal of Virology, Apr. 1996, 70:4, p. 2170–2177
12. Lucas MH. Viral diseases. Enzootic bovine leukosis. In:Bovine medicine: diseases and husbandry, 1992, ed. Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG, Blackwell Publishing. 1st edition p. 530–537
13. Nagy W., Tyler W., Kleiboeker B. Timing of seroconversion and acquisition of positive polymerase chain reaction assay results in calves experimentally infected with bovine leukemia virus. Am.J.Vet.Res 2007, 68, 72-75

Index după autori:

A

ABDELFATTAH Nour, 1
ACATRINEI D., 123, 198, 200, 832
ACHELĂRIȚEI D., 746
ÁDÁM D., 679
ALBU Aida, 3, 7
ALECU Alexandrina, 574
ALEXANDRU N., 998, 1022
AMĂRICĂI Mariana, 580, 1016
ANDREESCU Nicoleta, 590
ANDREI Sanda, 585
ANGHEL Simona, 515
ANIȚĂ Adriana Elena, 593, 1010
ANIȚĂ D. C., 599, 602, 1010
ANTON Alina, 207, 528
APETREI Ingrid Cezara, 605, 611
ARDELEAN A.I., 211, 619
ARDELEAN. V., 211
ARGHERIE Diana, 109
ARSENE M., 12, 267, 625, 628, 637
ARSENE Marinela, 12, 267, 628, 633, 637, 674
AVARVAREI IOAN, 192

B

BADEA Ruxandra, 563
BALABAN A., 644
BALIA Rostita L., 800
BARAITAREANU S., 641, 644, 648, 731
BARTOŞ A., 252
BĂLAN L., 325, 368
BĂRĂITĂREANU Ancuța Paula, 641, 644
BĂRBOI Gh., 1003, 1022
BELU C., 11, 74, 188
BERCEA Ion, 641
BEŞCHEA CHIRIAC I.S., 216, 380, 528
BETEG Fl., 491
BIANU ELISABETA, 192
BIȚOIU Carmen, 11, 135, 188
BÎRȚOIU A., 563
BLEJUŞCĂ Alice-Diana, 232, 528
BOGDAN A.T., 416, 421, 775, 792
BOGDAN L., 225, 371
BOGHIAN V., 216, 229, 232, 528
BOGOLIN I., 655, 660, 666
BOISTEANU P.C., 15, 48
BOLFĂ P., 666
BOLOG N., 325
BOMPA C., 865
BONCA Gh., 211
BONCEA D., 1022
BORCILĂ Cristina, 18
BORŞ S.I., 222, 321
BRATU E., 508
BRĂDĂȚAN Gh., 707, 1012
BRĂILĂ P., 473
BRĂSLAŞU Daniela Elena, 234
BRĂSLAŞU M.C., 234, 238, 348
BRIA Gabriela, 672, 674
BRUDAŞCĂ Gh. F., 942
BRUDIU I., 305
BUCUR E., 685
BUNEA Andrea, 585
BURCOVEANU Ioana Ruxandra, 241
BURLACU Anca-Irina, 140, 144
BURTAN I., 241, 245, 264, 328, 332, 548, 553
BURTAN L.C., 245, 264, 328, 332, 548, 553
BUSTANI S., 938
BUZATU M.C., 454

C

CACIG Svetlana, 109
CADAR D., 679
CALIN Mihaela Antonina, 974
CAMPEANU M.V., 644
CANTEMIR M., 248
CAPLAN Dana Magdalena, 590, 651, 792
CAPLAN Magdalena, 775
CARP-CĂRARE C., 734, 909
CARP-CĂRARE M., 528, 580, 605, 611, 707, 734, 842, 846, 851, 909, 920, 924, 953, 1012, 1016, 1019
CAZACU P., 22
CAZIMIR Iuliana, 11, 27, 74, 135
CĂLINA Daniela, 682, 711, 746, 838
CĂPRARU Gabriela, 152
CĂPRARU GABRIELA, 287, 341
CĂTANĂ Laura, 117, 252, 689
CĂTANĂ N., 685, 963
CĂTANĂ R., 689
CEAUŞESCU A., 718
CENARIU M., 117, 252, 282, 371, 534
CERNEA Cristina, 103, 257, 261
CERNEA Laura, 33
CERNEA M., 33, 103, 257, 261, 817, 820
CERNESCU H., 211
CHARNEAU Pierre, 804
CHEREJ R.I., 817, 820
CHIRIAC Adriana Gabriela, 842
CHIRILĂ D., 695
CHIRILĂ F., 682, 711, 838, 902
CHIRILEAN Ioana, 159
CIOBANU G., 924
CIOBANU S., 245, 264, 328, 332, 548, 553
CIOCA D., 515
CIORANU Raluca, 1003
CIORNEI Ş., 313, 321, 335, 505
CIORNOHAC G., 279

CIORNOHAC Mona, 275, 279
CIUBOTARU Emilia, 234
CIUCĂ Viviana, 38
CIUPE Simona, 225, 252, 282, 371, 463, 534
CIUPERCĂ I.A., 298
COBZARIU D., 644, 731
CODREANU Iuliana, 42, 45, 998
CODREANU M.D., 42, 45, 99, 337, 500, 998
COIPAN Elena Claudia, 267
COJMĂLEAȚĂ R., 234
COJOCARIU L.C., 605
COMAN I., 865
COMAN M., 113
CONSTANTINESCU Cristina, 27
CONSTANTINESCU F., 454
CONSTANTINESCU Ioana, 42, 45
CORNILĂ N., 27, 74, 135
COSMIN M., 287
COSOROABĂ I., 473
COSTACHE Delia, 775
COSTACHE Marieta, 79, 93, 1007
COSTE Handan, 998, 1003
COTEA C., 22, 48, 64, 69, 163, 167
COTOR G., 348, 698, 751
COȚOFAN Otilia, 171
COURBEYRETTE Karine, 804
COZMA V., 447, 520, 539, 544, 861
CRĂCIUN GABRIELA, 969
CRĂCIUN Maria, 666
CREANGĂ Şt., 524, 702, 808
CRENGUTA Pavel, 148
CRESPEAU F.L., 55
CREȚU Carmen, 580, 707, 846, 851, 909, 920, 924, 1012
CRIVINEANU Carmen Delia, 352, 503
CRIVINEANU Maria, 293
CRIVINEANU V., 99, 298
CSÁGOLA A., 679
CUC Cosmina, 711, 838
CUCURUZAN Simona, 33
CUMPĂNĂŞOIU C., 715, 718, 966
CUMPĂNĂŞOIU C.E., 718
CURCĂ D., 59, 82
CZAPP Timea, 211

D

DAMACEANU Ani, 721
DAMIAN A, 183
DAMIAN A., 96, 159, 725
DANEŞ Doina, 641, 644, 648, 731
DANEŞ M., 731
DASCĂLU Roxana, 508, 510, 515
DĂRĂBUŞ Gh., 305, 310, 397, 408, 473
DIACONESCU A., 563
DIACONU Ioana, 950
DINISCHIOTU Anca, 79, 93, 1007
DINIȚĂ D., 563
DINIȚĂ I., 913
DOJANĂ N., 42, 45
DOJANĂ Rosalie, 42, 45
DONICA A., 87
DOROBANȚU I., 313, 335
DRAGHICI Alina Karina, 316
DRAGU Corina, 128
DRĂGAN G., 734, 738
DRĂGĂNESCU Gilda Eleonora, 611
DRUGOCIU D., 313, 321, 335, 505
DUCA Gh., 942
DULMAN Ozana, 605
DUMA Mihaela, 619
DUMITRACHE Mariana, 38
DUMITRESCU I., 11, 188

E

ELEFTERESCU H., 325, 368

F

FÂNTÂNARU M., 245, 264, 328, 332, 548, 553
FERNOAGĂ Cristina, 560
FIȚ N., 33, 682, 711, 742, 746, 838, 902
FLOREA Elena Cătălina, 64, 69, 163
FLORISTEAN V., 707, 846, 851, 978, 982
FODOR Ionica, 685
FURNARIS F., 835, 913, 938, 987

G

GALAN C., 313, 335
GALIS Anca Maria, 974
GAŞPAR C., 755, 761
GAŞPAR C-tin. V., 755, 761
GAŞPAR G., 755, 761
GAVRILAŞ Angela, 927, 933
GÂJÂILĂ G., 698, 751
GÂJÂILĂ Iuliana, 698, 751
GEORGESCU B., 11, 74, 135, 188, 557
GEORGESCU Gabriela, 337
GEORGESCU S.E., 79, 93, 1007
GHERGHEL Daniela, 152, 287, 341
GHIȚĂ M., 348, 698
GOGU P., 865
GONCEAROV Magdalena, 769, 772, 987
GORAN G.V., 99, 298, 352
GRECU Mariana, 357, 361, 365, 376, 380, 385
GROS R.V., 715, 966
GROSU F.E., 325, 368
GROZA I., 117, 225, 252, 282, 371, 463, 534, 689
GUDEA Al., 159, 183, 725
GUDUMAC V., 87
GUGUIANU Eleonora, 580, 909
Gut A., 261
GUT A., 257

H

HAGIU N., 275, 279
HERMAN V., 310
HORHOGEA Cristina, 893, 897
HOTEA Ionela, 310
HRIȚCU Luminița Diana, 216, 361, 365, 376, 380, 385, 528
HROMEI N., 505

I

IACOB C., 812
IGNA C., 388, 392, 508, 510, 515
ILIE A., 305
ILIE Alina, 397
ILIE M., 305, 310, 473
ILIE M.S., 397, 408
IMRE K., 310, 397, 405, 408
IONESCU G., 913
IONESCU S., 238
IONIȚĂ L., 416, 421, 792
IONIȚĂ Mariana, 411, 454
Ipate IUDITH, 421
IPATE Iudith, 416, 651, 775, 792
IȘAN Elena, 707
IVANA Simona, 416, 421, 590, 651, 775, 792

J

JELEA Cătălina, 917
JOIȚA Silvia, 238

K

KEVORKIAN Steliana, 79, 93
KOBOLKUTI L., 679
KORODI Gabriela, 211

L

LAZĂR G., 424, 428
LAZĂR M., 432
LAZĂR Roxana, 15, 432
LAZĂU A., 113
LĂCĂTUȘ R., 435
LEAU F., 441
LEAU T., 441
LENGKEY Hendronoto A. W Y., 800
LEONTE C., 702
LIONIDE A., 82
LISOVSCHI C., 725
LUDU Luanda, 804
LUPEA Alfa Xenia, 109
LYONS E.T., 411

M

MACARI Ana, 90
MACARI V., 87, 90
MACIUC V., 702, 808, 812
MADEIRA DE CARVALHO L., 257, 261
MAFTEI D., 12, 628
MALIC Luminița Iuliana, 479
MANEA Maria Adina, 79, 93, 1007
MANGRĂU Angelica, 325, 368
MANTA Cristina, 872
MANTA Livia Georgiana, 611
MARCU Elena, 721
MAREȘ M., 452, 479
MATEI Gabriela Florina, 824
MATEI Sorana, 225
MATEȘ N., 491
MĂLĂNCUȘ R. N., 444
MĂRCULESCU Anca, 817, 820
MEDERLE Narcisa, 310, 397, 408, 473
MERTICARIU Ștefania, 599
MICLĂUȘ V., 96, 679
MIHAESCU T., 605, 611
MIHAI C., 152, 341
MIHALACHI Simona, 123, 200, 832, 1010
MIHALCA A.D., 96
MIHĂEȘ G., 275
MILITARU D., 950
MILITARU Manuella, 950
MIRCEAN Viorica, 447, 544
MIRCU C., 211
MIRON L., 123, 198, 452, 865
MISĂILĂ C., 570
MISĂILĂ Elena Rada, 570
MITRĂNESCU Elena, 769, 772, 835, 913, 938, 987, 992
MITREA I.L., 411, 454
MOCANU Diana, 232, 528
MOLDOVAN Lucia, 441
MORAR D., 305
MORAR I., 371, 463, 689
MORARIU Florica, 466, 473
MORARIU S., 305, 397, 408, 466, 473
MORARU Ramona, 357, 479
MOȘU A., 432
MUSTE A., 491
MUSTEAȚĂ M., 128, 832
MUTU A., 293

N

NACU G., 808, 812
NADĂȘ G., 682, 711, 742, 746, 838, 902
NAGY Ágnes, 483
NASTASE S., 267
NĂSTASĂ V., 357, 361, 365, 376, 452, 479
NEAGOE Graziela, 1003
NEAGU Aritina, 99
NEAGU Iuliana, 872

NEAGU R., 225, 371
NECULAE Irina, 128
NECULIȚĂ C., 842
NECULIȚĂ Elena Narcisa, 846, 851
NEGHIRLĂ Ioana, 74
NEICUȚ Adriana, 1003
NICHITA Ileana, 715, 966
NICOLAE Şt., 1003, 1022
NICORESCU V., 293
NICULAE Mihaela, 488
NUELEANU Veturia, 820

O

OANA L., 96, 491
OANCEA I., 325
OBER C., 491
OCHEA M., 563
OGNEAN L., 33, 103
OLARIU Lucia, 109
OLARIU-JURCA I., 113
OLARU Irina, 998
OLELEU Ana-Maria, 856
OLELEU I., 856
OLTEANU Zenovia, 152, 287, 341
OLTEANU ZENOVIA, 341
OLVEDI Irina, 1022
ONAC Diana, 861
ONIȚĂ Iuliana, 1003
ONOFREI O., 454
ONȚANU Gh., 824
OPREAN O.Z., 48, 432
OPRESCU I., 310, 397, 408, 473
ORĂŞANU Adriana, 1022
OROS N. A., 817, 820

P

PALCA M., 408
PALL E., 117, 252, 282, 463, 534
PANAGACHI-T. (Gogu) Mihaela, 865
PANTĂ A., 59
PANTĂ L., 82
PAPUC Camelia, 293, 352, 503
PARASCHIVESCU M., 775
PAŞCA S., 123, 200
PAUL. I., 18
PAVEL Geta, 128
PAVLI C., 495, 957, 1010
PĂCURAR C., 405
PĂLĂMARU Veroana, 74
PĂUN D., 74
PĂVĂLEAN D., 879, 887
PERIANU T., 832, 893, 897, 917, 957, 1010
PETCU Carmen Daniela, 872
PETREAN Anamaria, 225
PINTEA Adela, 585
PINTEA M., 524
PISICĂ (CRIVINEANU) F.M., 500, 503
POP Al., 483
POP Cecilia, 3
POP I.M., 3
POP R, 371
POPA Virgilia, 679, 685
POPESCU A., 167
POPESCU A.N., 416, 421, 792
POPESCU Cristina Tudorița, 824
POPESCU O., 3, 7
POPESCU Raluca, 893, 897
POZDÂRCĂ E., 90
PREDOI G., 11, 74, 188
PREDOI Ştefania, 11, 27, 74, 135, 234
PRISĂCARU Cornelia, 140, 144
Putin V., 90

R

RADOI I., 148
RĂDUCANU Andrada, 960
Răileanu S., 261
RĂILEANU S., 257
RĂPUNTEAN Gh., 682, 711, 742, 746, 817, 820, 838, 856, 879, 887, 902
RĂPUNTEAN S., 838, 879, 902
REBEGEA Cristina, 909
RISTEA Florica, 27
RÎMBU Cristina, 580, 909, 920, 924
ROLLIN F, 207
ROŞCA P., 222, 313, 321, 335, 505
ROŞU Petronela, 11, 188
ROTARU Anca, 55
ROTARU Elena, 563, 835, 913
ROTARU Liliana, 140
ROTINBERG Hellen, 152, 287
ROTINBERG P., 152, 287, 341, 528
RUGINOSU Elena, 524
RUNCEANU L., 222, 321, 505
RUS V., 96

S

SABĂU M., 508, 510, 515
SALA A., 508, 510, 515
SALAGEAN Monica, 619
SANDU Ana, 1003
SAPCALIU Agripina, 148
SARLI G., 432
SAVU C., 872
SAVUȚA Gh., 599, 804
SĂLCEANU Ionela, 917
SĂRĂNDAN H., 515
SĂVULESCU I.M., 234
SCHUSZLER Larisa, 388, 508, 510, 515
SERES Monica, 388
SEREŞ Ştefania, 520
SEVASTRU Andreea, 824
SIBECHE Gabriela, 920, 924
SILBERG R., 257, 261

SIMEANU D., 927, 933
SIMION Violeta, 835, 938
SÎRBU Cristina, 715
SOCACIU Antonia, 159, 183
SOFRON N., 385
SOFRONIE Mariana, 524
SOLCAN Carmen, 48, 64, 69, 163, 167, 528, 1019
SOLCAN Gh., 163, 167, 207, 321, 528
SORIȚĂU Olga, 117
SPĂTARU C-tin, 171
SPĂTARU Mihaela, 171
SPÎNU Marina, 679, 742, 942
STAN F., 159, 177, 183, 725
STANCU A., 113
STARCIUC N., 947
STEGERAN Brînduşa, 252, 282, 534
STONE Carla Sydnei, 648
STRATEANU Amalia, 775
STRATUL S., 388
STRATUL S. I., 508
STREJA Adriana, 953
STURZU Simona, 316
SURDU Ştefania, 152, 287, 341
SZAKACS A. R., 539
SZAKACS V. Bianca, 539
SZANTO E., 539

Ş

ŞANDRU Carmen Dana, 742, 942
ŞEICARU Anca, 11, 188
ŞEREŞ Monica, 508, 510, 515
ŞINDILAR E.V., 978, 982
ŞTIRBU-TEOFĂNESCU Beatrice, 950
ŞUTEU E., 742, 746

T

TAMBA Paula, 998
TAPALOAGA Dana, 835, 872, 913, 938
TARȚĂU Liliana, 865
TAŞBAC B. A., 800
TĂNASE Irina-Oana, 832, 957, 1010
TESIO C.D., 1007
TITILINCU Adriana, 447, 544, 861
TÎRZIU E., 715, 718, 966
TOADER A. I., 11, 74, 135, 188
TODIRITA Andra, 148
TOFAN C. M., 444
TOGOE I., 574, 974
TOMA Luminița, 232
TOPALĂ Roxana, 245, 264, 328, 332, 548, 553
TRÂNCĂ S., 33
TRINCĂ LUCIA CARMEN, 192
TRIPON S., 33
TRUȚA Alina, 698
TRUȚĂ ELENA, 152, 287, 341
TSOMPANELLIS E., 978, 982
TUBOLY T., 679
TUDOR ANETA LAURA, 969
TUDOR I., 772
TUDOR L., 769, 835, 913, 969, 974, 987, 992
TUDOR Laura Aneta, 992
TUDOR N., 74, 368, 557, 560
TUDOR Poliana, 560
TULCAN Camelia, 109
TUNS M.F., 725
TURCITU M.A., 998, 1003, 1022

Ț

ȚÂRCĂ Felicia, 3, 7
ȚIBRU I., 960, 963
ȚOGOE D., 563
ȚOGOE I., 800, 969, 987, 992

U

URSU Krisztina, 679
USTUROI M.G., 15

V

VASILESCU Clara, 824
VASIU C., 655, 660, 666
VĂTĂŞESCU-BALCAN R.A., 1007
VELESCU Elena, 1010
VEREŞ S., 491
VIȚĂLARU B.A., 563
VLADIMIRESCU A. F., 267
VLAD-SABIE Alina, 1012
VLASIU Teodora, 225, 282, 463, 689
VLĂGIOIU C., 238, 368, 557
VOICU Elena, 580, 1016, 1019
VOLF MARIANA, 192
VOLOŞENIUC M., 1016
VULPE Cristina, 570
VULPE V., 171, 432, 570
VUȚĂ V., 1022

Z

ZAMBELLI D., 495
ZARCULA Simona, 211
ZVORISTEANU Raluca, 135
ZYBACZYNSKI Iulia, 998