ISSN 1454-7406

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

LUCRĂRI ŞTIINȚIFICE
VOL. 52(11)

MEDICINĂ VETERINARĂ

PARTEA 2/2

EDITURA „ION IONESCU DE LA BRAD”

IAŞI - 2009

Volumul a fost editat cu sprijinul financiar al
Ministerului Educaţiei, Cercetării şi Inovării

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

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. SĂVUȚA 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:

Secţiunea Preclinici

SANDA ANDREI, ADELA PINTEA, GROZA I., BOGDAN L., SIMONA CIUPE, SORANA MATEI
MILK ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY IN COWS WITH SUB CLINICAL MASTITIS
ACTIVITATEA ENZIMELOR ANTIOXIDANTE IN LAPTE LA VACI CU MAMITE SUBCLINICE 1
SANDA ANDREI, GROZA I., PIVARIU I., DIANA CRAINIC, SIMONA CIUPE- GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF PLASMA PROGESTERONE LEVELS IN COWS DURING THE PUERPERAL PERIOD
DETERMINAREA GAZ-CROMATOGRAFICA A NIVELULUI PLASMATIC AL PROGESTERONEI LA VACI IN PERIOADA PUERPERALA 7
IULIANA CAZIMIR, N. CORNILĂ, ŞTEFANIA PREDOI, FLORICA BĂRBUCEANU, CRISTINA CONSTANTINESCU, CARMEN PETCU
EMBRYO BODY HISTOSTRUCTURE AFTER 48 HOURS OF INCUBATION IN SOME SPECIES OF THE GALLIFORMES ORDER 13
G. CIOBANU, LOREDANA CIOBANU, ŞTEFANIA ANDERCO, LILIANA TOFAN
CARACTERIZAREA MORFOLOGICĂ A HEPATOPATIILOR INFLAMATORII
THE MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF INFLAMMATORY HEPATITIS 18
G. CIOBANU, LOREDANA CIOBANU, ŞTEFANIA ANDERCO
ASPECTE MORFOLOGICE ÎN HEPATOPATIILE NEINFLAMATORII
MORPHOLOGICAL ASPECTS IN THE NON-INFLAMMATORY HEPATOPATHIES 23
C. V. COTEA, O. Z. OPREAN, CARMEN SOLCAN, P. BOIŞTEANU
CORELAŢII CITOCHIMICE HIPOTALAMO-ADENOHIPOFIZO-OVARIENE LA VACILE IN ESTRU
CYTOCHEMISTRY CORRELATIONS BETWEEN HYPOTHALAMUS-ADENOHYPOPHYSIS-OVARIES OF COWS IN ESTRUS 32
PETRU CAZACU, CORNELIU V. COTEA
MORFOGENEZA GLANDEI NICTITANTE LA FETUŞII DE CÂINE
MORPHOGENESIS OF NICTITATING GLAND IN DOG FOETUSES 37
CIORNEI CRISTINA C. V. COTEA, CARMEN SOLCAN
CERCETĂRI HISTOLOGICE ÎN HERMAFRODITISMUL BILATERAL LA SUINE (SUS SCROFA DOMESTICA)
HISTOLOGYCAL RESEARCHES IN DOMESTIC SWINES BILATERAL HERMAPHRODITISM (*SUS SCROFA DOMESTICA)* 44
CIORNEI CRISTINA, PAVLI C
UTILIZAREA DIAGNOSTICULUI ECOGRAFIC ÎN STABILIREA TIPULUI DE INTERSEXUALITATE LA SUINELE DOMESTICE (SUS SCROFA DOMESTICA)
THE USE OF ULTRASOUND DIAGNOSIS IN DETERMINING THE TYPE OF INTERSEXUALITY IN DOMESTIC SWINES (*SUS SCROFA DOMESTICA)* 51
IULIANA CODREANU, CLARA ASCHEMBRENER, IOANA CONSTANTINESCU, M. CODREANU
OBSERVAŢII PRIVIND EFECTUL GLUCAGONULUI ASUPRA ACTIVITĂŢII AMILAZEI ŞI LIPAZEI PANCREATICE ŞI ASUPRA DEBITULUI DE SUC PANCREATIC, LA GĂINI
OBSERVATIONS CONCERNING THE EFFECT OF GLUCAGON UPON PANCREATIC AMYLASE AND LIPASE ACTIVITY AND PANCREATIC JUICE FLOW, IN HENS 56
IULIANA CODREANU, CLARA ASCHEMBRENER, IOANA CONSTANTINESCU, M. CODREANU
STUDII PRIVIND EFECTUL GLIBENCLAMIDEI, STREPTOZOTOCINEI ŞI INSULINEI ASUPRA DEBITULUI DE SUC PANCREATIC ŞI ACTIVITĂŢII AMILAZEI ŞI LIPAZEI PANCREATICE, LA GĂINĂ
STUDIES CONCERNING THE EFFECT OF GLIBENCLAMIDE, STREPTOZOTOCINE, AND INSULIN UPON PANCREATIC JUICE FLOW AND PANCREATIC AMYLASE AND LIPASE ACTIVITY, IN HENS 62
ANTONIA SOCACIU, A. DAMIAN, IOANA CHIRILEAN, F. STAN, AL. GUDEA
ASPECTE MORFOLOGICE PRIVIND SISTEMUL VASCULAR ARTERIAL AL GLANDEI MAMARE LA CĂMILĂ, VACĂ ŞI BIVOLIŢĂ
MORPHOLOGICAL ASPECTS OF ARTERIAL SYSTEM IN CAMEL, COW AND BUFFALO COW 70

DAVID CHIRILA
DINAMICA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE LA GĂINILE OUĂTOARE ÎN FUNCȚIE DE SISTEMUL DE ÎNTREȚINERE
DYNAMIC OF ENZYMATIC ACTIVITY IN LAYING HENS BASED ON THE BREEDING SYSTEM 77
A.DAMIAN, MELANIA CRIŞAN, C.DEZDROBITU, CARMEN MATEAŞ, F.TUNS, AL.POP
STUDII COMPARATIVE ALE SCHELETULUI MEMBRULUI TORACIC LA CĂMILĂ, VACĂ ȘI IAPĂ
COMPARATIVE STUDY OF THE FORELIMB SKELETON IN CAMEL, COW AND MARE 80
CORINA DURDUN, MARIA CRIVINEANU, V. NICORESCU
FREE RADICALS SCAVENGING ACTIVITY OF SOME MEDICINAL PLANTS EXTRACTS 87
PALL EMOKE, GROZA I., SORIȚĂU OLGA,CENARIU M., DARIA GROZA, TOMULOASA C.
ROLE OF BMP-4 IN MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS DIFFERENTIATION 94
ENCIU V.
SURSELE DE INERVAȚIE ŞI ARHITECTONICA SISTEMULUI NERVOS AL PERIOSTULUI OASELOR ACROPODIULUI TORACIC LA BOVINE
SOURCES OF INNERVATION AND ARHITECTURAL NERVOUS SYSTEM OF THE PERIOSTEUM OF THE TORACIC ACROPODIUM AT BOVINES 98
GAL A.F., MICLAUS V., OANA L., CATOI C., RUS V., OBER C., PESTEAN C.
EYELID SQUAMOUS CARCINOMA ASSOCIATED WITH DIFFUSE KERATIN GRANULOMA 102
S. E. GEORGESCU, MARIA ADINA MANEA, STELIANA KEVORKIAN, ANCA DINISCHIOTU, MARIETA COSTACHE
A NEW PCR-RFLP METHOD FOR ANALYZING THE EXTENSION LOCUS INVOLVED IN THE COAT COLOUR OF HORSES 106
DARIA GROZA, N. COSTIN, CENARIU M., EMOKE PALL, I. Ş. GROZA, C. PEŞTEAN
MODELUL EXPERIMENTAL ANIMAL PENTRU TRANSPLANTUL IN UTERO CU CELULE STEM UMANE
ANIMAL EXPERIMENTAL MODEL FOR IN UTERO TRANSPLANT OF STEM CELLS 109
I. OLARIU-JURCA, M. COMAN, A. STANCU, A. OLARIU-JURCA, ALINA COMAN
MODIFICĂRI MORFOLOGICE HEPATICE, RENALE ŞI SPLENICE ÎN TUBERCULOZĂ LA PRIMATE NON UMANE
MORPHOLOGICAL CHANGES OF HEPATIC, RENAL AND SPLENIC IN TUBERCULOSIS IN NON HUMAN PRIMATES 114
A. A. KASSAB, S. SHOUSHA′ A. FARGANI
MORPHOLOGY OF BLOOD CELLS, LIVER AND SPLEEN OF THE DESERT TORTOISE (TESTUDO GRAECA) 118
STELIANA ELVIRA MARIA KEVORKIAN, MARIA ADINA MANEA, S.E. GEORGESCU, MIHAELA ZAULET, ANCA DINISCHIOTU, MARIETA COSTACHE
INDIVIDUAL IDENTIFICATION IN ROMANIAN SHEEP BREEDS USING MICROSATELLITE MARKERS 131
ADINA MARIA MANEA, STELIANA KEVORKIAN, S.E. GEORGESCU, ANCA DINISCHIOTU, MARIETA COSTACHE
A NEW PCR-RFLP METHOD FOR ANALYZING GENETIC POLYMORPHISM IN THE LEPTIN GENE IN SWINE 136
MICLĂUŞ V., L. OANA, V. RUS, C. OBER, C. PEŞTEAN
CELULE EPITELIALE CILIATE ÎN TIMUSUL NORMAL DE ŞOARECE
CILIATED EPITHELIAL CELLS IN MOUSE THYMUS 140
M. CONDREA
OBSERVATIONS REGARDING GESTATION ANEMIA AT THE CAT 144
M. CONDREA
OBSERVATIONS REGARDING ANEMIA ASSOCIATED TO CHRONIC GASTROENTEROPATHIES AT THE CAT 146
OTILIA COȚOFAN, GABRIELA URSACHI, T. URSACHI, ŞTEFANIA ANDERCO
CARCINOMUL OCULAR SCUAMOCELULAR LA BOVINE
BOVINE OCULAR SQUAMOUS CELL CARCINOMA 150

OTILIA COȚOFAN, GABRIELA URSACHI, ŞTEFANIA ANDERCO, LILIANA TOFAN
POLIARTERITA NODOASĂ
POLYARTERITIS NODOSA 153
OTILIA COȚOFAN-, ŞTEFANIA MERTICARIU-ANDERCO, GABRIELA URSACHI
RINOTRAHEITA INFECȚIOASĂ BOVINĂ COMPLICATĂ CU SEPTICEMIE
THE INFECTIOUS BOVINE COMPLICATED RHINOTRACHEITIS WITH SEPTICEMIA 158
CORINA DRAGU, O.Z OPREAN
ASPECTE CITOLOGICE ALE EPANŞAMENTELOR CAVITARE LA CARNIVORELE DOMESTICE
CYTOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFUSIONS ON SMALL ANIMALS 166
ELENA CĂTĂLINA FLOREA, C. V. COTEA, CARMEN SOLCAN
ASPECTE ELECTRONO-OPTICE ÎN LOBUL ROZ AL GLANDEI HARDER LA IEPURELE DE CASĂ (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)
ELECTRON MICROSCOPY ASPECTS INSIDE THE PINK LOBE OF HARDERIAN GLAND IN RABBITS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) 171
ELENA CĂTĂLINA FLOREA, C. V. COTEA, CARMEN SOLCAN
ULTRASTRUCTURA LOBULUI ALB AL GLANDEI HARDER LA IEPURELE DE CASĂ (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)
ULTRASTRUCTURE OF THE WHITE LOBE OF HARDERIAN GLAND IN RABBITS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) 179
ŞTEFANIA MERTICARIU-ANDERCO, OTILIA COȚOFAN, GABRIELA URSACHI, AGAVRILOAIEI GEANNI
CÂTEVA DATE PRIVIND MORFOLOGIA RABIEI LA BOVINE ŞI PORCINE
A FEW DATA REGARDING THE RABIES MORPHOLOGY IN THE BOVINES AND PIGS 188
ŞTEFANIA MERTICARIU-ANDERCO, GABRIELA URSACHI
CÂTEVA ASPECTE MORFOLOGICE ALE RINOTRAHEITEI INFECTIOASE BOVINE
A FEW MORPHOLOGICAL ASPECTS IN THE INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS 201
ŞTEFANIA MERTICARIU-ANDERCO, OTILIA COȚOFAN, GABRIELA URSACHI
LEZIUNILE NEVRAXIALE ŞI VISCERALE ÎN SEPTICEMIA ACUTĂ CU ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE LA PORC
THE NEURAXIAL AND VISCERAL LESIONS IN THE ACUTE SEPTICEMIA WITH ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE AT THE PIG 212
V. MICLĂUŞ, L. OANA, C. PEŞTEAN, V. RUS, C. OBER
APRECIERI ASUPRA GENEZEI FOLICULILOR POLIOVOCITARI LA PISICA DOMESTICĂ
CONSIDERATIONS ON THE GENESIS OF POLIOVOCITAR FOLLICLES IN CAT 226
OGNEAN L., CRISTINA CERNEA, M. CERNEA, G. GIURGIU, S. TRÎNCĂ
RELEVANȚA MODIFICĂRILOR BIOCHIMICE SANGUINE ÎN DEPISTAREA UNOR DEZECHILIBRE VITAMINO-MINERALE CONSECUTIVE FURAJĂRII NECONTROLATE A PUILOR DE STRUȚ
THE RELEVANCE OF THE BLOOD BIOCHEMICAL MODIFICATIONS FOR DETECTION OF SOME VITAMINO-MINERAL INBALANCES CONSEQUENTIAL TO UNCONTROLLED FEED OF THE OSTRICH CHICKENS 231
CAMELIA PAPUC, VALENTIN NICORESCU, CORINA DURDUN, COSTIN PAPUC
ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SEA BUCKTHORN ALCOHOLIC EXTRACT ON LINOLEIC ACID EMULSION 236
SORIN PASCA
ASPECTE MORFOLOGICE IN BOALA MELANOTICA LA CAINE
MORPHOLOGICAL ASPECTS IN MELANOTIC DISEASE OF DOGS 240
GETA PAVEL, CRISTINA BORCILĂ, CARMEN SOLCAN, CORINA DRAGU
MODIFICĂRILE CONSTANTELOR ERITROCITARE LA PUII DE GĂINĂ INTOXICAȚI CU OCRATOXINA A (OTA)
THE ERYTHROCITARY PARAMETERS CHANGES AT BROILERS INTOXICATED WITH OCHRATOXIN A 245

DUMITRIȚA RUGINĂ, ADELA PINTEA, CORNELIA BRAICU, L. FÂRCAL, SANDA ANDREI, CARMEN SOCACIU
ROSMARINIC ACID REDUCES OXIDATION OF HUMAN RETINAL EPITHELIAL CELLS 250
ANETA POP, GEORGETA DINESCU, I. ȚOGOE, MANUELLA MILITARU, PETRUȚA CORNEA
LECTINA DIN MUGURI DE CARTOF – O ALTERNATIVĂ LA PREVENIREA SALMONELOZEI LA PUI PRIN TRATAMENTE CU ANTIBIOTICE
POTATO SHOOTS LECTIN –AN ALTERNATIVE TO ANTIBIOTIC PREVENTION OF *SALMONELLOSIS* IN CHICKEN..... 255
CORNELIA PRISĂCARU
CERCETĂRI PRIVIND EVALUAREA POTENȚIALULUI ANTIRADICALAR AL UNOR ANTIOXIDANȚI NEVITAMINICI
RESEARCHES REGARDING THE EVALUATION OF THE ANTIRADICAL POTENTIAL OF SOME NON-VITAMINIC ANTIOXIDANTS 260
CORNELIA PRISĂCARU, ANCA-IRINA BURLACU
CERCETĂRI PRIVIND MODIFICĂRILE UNOR INDICATORI DE STRES OXIDATIV INDUSE PRIN ADMINISTRAREA DE FITOPREPARATE CU ACȚIUNE ANTITOXICĂ
RESEARCHES REGARDING THE VARIATION OF THE OXIDATIVE STRESS PARAMETERS INDUCED BY THE ADMINISTRATION OF PHYTOPREPARATES WITH ANTITOXIC EFFECT 265
TEODORU SOARE, CIOBOTARU EMILIA, DINESCU GEORGETA, MILITARU MANUELLA
UNELE ASPECTE ALE MORFOLOGIEI LIMFOMULUI DIGESTIV LA PISICĂ
SOME ASPECTS OF DIGESTIVE LYMPHOMA MORPHOLOGY IN CAT 271
CARMEN SOLCAN, I. COMAN, C. COTEA, CĂTĂLINA FLOREA, GH. SOLCAN
INFLUENȚA OCHRATOXINEI A ASUPRA BURSEI FABRICIUS LA PUII DE GĂINĂ
INFLUENCE OF OCHRATOXINE A ON FABRICUS BURSAE IN BROILER CHIKENS 277

CARMEN SOLCAN, I. COMAN, GH. SOLCAN
INFLUENȚA OCHRATOXINEI A ASUPRA TIMUSULUI LA PUII DE GĂINĂ
INFLUENCE OF OCHRATOXINE A (OTA) ON THE THYMUS IN BROILER CHIKENS 281
SPATARU C., SPATARU MIHAELA, COTOFAN V.
PARTICULARITĂȚI MORFOLOGICE ALE SCHELETULUI MEMBRULUI TORACIC LA BIZAM (ONDATRA ZIBETHICA)
MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE FORELIMB SKELETON AT MUSKRAT (ONDATRA ZIBETHICA) 286
SPATARU MIHAELA, SPATARU M., RIZAC V.
PARTICULARITĂȚILE MORFO-FUNCȚIONALE ALE ARTICULAȚIILOR MEMBRULUI TORACIC LA BIZAM
MORPHO-FUNCTIONAL PECULIARITIES OF THE FORELIMB JOINTS AT MUSKRAT..... 293
A.R. SZAKACS, BIANCA SZAKACS, V.MICLĂUŞ, A. MACRI, ZOE DANCEA, V. COZMA
CONSECINȚELE INFESTAȚIEI EXPERIMENTALE CU ASCARIS SUUM ASUPRA FICATULUI DE PORC. STUDIU HISTOPATOLOGIC
CONSEQUENCES OF EXPERIMENTAL INFESTATION WITH ASCARIS SUUM ON PIG LIVER. HISTOPATHOLOGY STUDY..... 300
M. TAULESCU, C. CATOI, A. GAL, P. BOLFA, V. I. RUS, MONICA BUDUGAN, F. TABARAN, A. NAGY
DIAGNOSIS OF SPONTANEOUS GASTRIC INFECTION WITH HELICOBACTER SPECIES IN DOGS USING PCR METHOD 304
MARIAN TAULESCU, LIDIA CIOBANU, C.SISEA, BRÎNDUŞA DIACONU, V. ANDREICA, C. CĂTOI, P. BOLFĂ
DIFFICULTIES IN IDENTIFICATION AND GENETIC ANALYSIS OF HELICOBACTER SPECIES USING PCR METHODE FROM GASTRIC SAMPLES AND BACTERIAL CULTURES..... 311

LUCIA CARMEN TRINCĂ , MARIANA VOLF, IOAN AVARVAREI, VASILE BOGHIAN
PROFILUL METABOLIC(ENERGETIC) LA BOVINE-PARTE A MONITORIZĂRII SIGURANȚEI ALIMENTARE PE LANȚUL TROFIC SOL-PLANTĂ-ANIMAL ÎN ZONA IAŞULUI
BOVINE (METABOLIC)ENERGETIC PROFILE AS PART OF FOOD SAFETY MONITORISATION OF THE CHAIN SOIL-PLANT-ANIMAL IN IAŞI AREA 316
LUCIA CARMEN TRINCĂ, MARIETA NICHIFOR, CRISTINA STANCIU
CERCETĂRI PRIVIND PROPRIETĂȚILE BIOCHIMICE ALE DERIVAȚILOR AMINAȚI DEXTRINICI
STUDY ON BIOCHEMICAL PROPRIETIES OF AMINIC DEXTRAN DERIVATIVES 323
LUCIA CARMEN TRINCĂ , MARIANA VOLF, I. AVARVAREI, V. BOGHIAN, ELISABETA BIANU
PROFILUL MINERAL ŞI ENZIMATIC LA BOVINE-PARTE A MONITORIZĂRII SIGURANȚEI ALIMENTARE PE LANȚUL TROFIC SOL-PLANTĂ-ANIMAL ÎN ZONA IAŞULUI
BOVINE MINERAL PROFILE AS PART OF FOOD SAFETY MONITORING SOIL-PLANT-ANIMAL CHAIN IN IAŞI AREA..... 333
GABRIELA URSACHI, OTILIA COȚOFAN, ŞTEFANIA ANDERCO
ASPECTE MORFOLOGICE ÎN SARCOMUL STICKER LA CANIDELE FEMELE
MORPHOLOGICAL ASPECTS IN STICKER'S SARCOMA AT FEMALE DOG 342
GABRIELA URSACHI, OTILIA COȚOFAN' I. BURTAN, ŞTEFANIA ANDERCO
ASPECTE MORFOLOGICE ÎN CARCINOMUL INFILTRATIV MAMAR LA CĂȚEA
MORPHOLOGICAL ASPECTS IN INFILTRATIVE MAMMARY CARCINOMA INFILTRATIV OF FEMALE DOG..... 348
EL-ZOGHBY, I. M. A., BAKRY, H. H., GHALLAB, A. M., EMAM, M. A.
HISTOLOGICAL STUDIES ON THE GONADS OF THE CATFISH DURING DIFFERENT SEASONS 352

Secţiunea Clinici

FILIP ARDELEAN, ALEXANDRU GEORGESCU, STELIAN PETCU, IONEL PAPUC, RADU LACATUS, BOGDAN CHIROIU
MODEL EXPERIMENTAL DE LAMBOURI PE PERFORANTE TEGUMENTARE LA SOBOLAN CU APLICATII IN CHIRURGIA RECONSTRUCTIVA A DEFECTELOR DE SUBSTANTA
EXPERIMENTAL MODEL OF SKIN PERFORANT FLAP IN RAT WITH APLICATION IN SURGERY RECONSTRUCTION OF INJURIES. 363
ALINA ANTON, GETA PAVEL
MODIFICĂRI ALE PROFILULUI HEMATOLOGIC LA VITEII DE RASĂ BĂLTATĂ CU NEGRU ROMÂNEASCĂ ÎN PERIODA NEONATALĂ
CHANGES IN HAEMATOLOGICAL PROFILE OF NEONATAL BLACK PIE DAIRY CALVES 369
ARMAŞU MIHAELA, SOLCAN GH.
ASPECTE ECOGRAFICE ALE AFECȚIUNILOR TUMORALE LA CÂINE
ULTRASONOGRAPHYCAL ASPECTS OF TUMORAL DISEASE IN DOG..... 374
A. BALINT, GH. DĂRĂBUŞ, M.S. ILIE, K. IMRE, IONELA HOTEA, D. INDRE. D.N. MĂNDIȚĂ
OBSERVAȚII PRIVIND DIAGNOSTICUL NOSEMOZEI ÎN CÂTEVA STUPINE DIN VESTUL ROMÂNIEI
OBSERVATIONS CONCERNING DIAGNOSIS OF NEOSEMA APIS INFECTION IN SOME APIARES FROM WEST OF ROMANIA 379
S. BESCHEA-CHIRIAC
STUDIU COMPARATIV AL REACTIVITĂȚII VASCULARE ARTERIALE LA MAI MULTE SPECII DE MAMIFERE. EFECTELE INHIBITORII ALE D600 (GALOPAMIL)
COMPARATIVE STUDY OF ARTERIAL REACTIVITY IN SOME MAMMALS. INHIBITORY EFFECTS OF D600 (GALOPAMIL)..... 384
V. BOGHIAN
MECANISME METABOLICE CU ROL ÎN PATOGENEZA CETOZEI LA VACILE PENTRU LAPTE
METABOLIC MECHANISMS INVOLVED IN THE PATHOGENESIS OF KETOSIS IN DAIRY COWS 389
V. BOGHIAN, LUMINIȚA CONDURACHE TOMA, R. MĂLĂNCUŞ
INCIDENȚA SINDROMULUI ANEMIC LA CÂINE
INCIDENCE OF ANEMIC SYNDROME IN DOGS 394

BORŞ S.I., RUNCEANU L., ANTON ALINA, SOLCAN GH.
SUPRAVEGHEREA NUTRIȚIONAL-METABOLICĂ A VACILOR CU GESTAȚIE AVANSATĂ ŞI VÂRFUL LACTAȚIEI ÎNTR-O FERMĂ DIN NE ROMÂNIEI
METABOLIC PROFILE ON AVANCED GESTATION COWS AND THE PICK OF LACTATION IN A FARM FROM NORTH-EAST OF ROMANIA 401
CRISTINA BULBAŞA (PANAITE), D. DRUGOCIU, CLAUDIA DUMINICĂ
THE INCIDENCE OF SOMATIC CELLS AND TNG IN COW MILK FROM DIFFERENT FARMS IN IASSY 406
IOANA BURCOVEANU, I. BURTAN, ROXANA TOPALĂ, L.C. BURTAN, M. FÂNTÂNARIU, S. CIOBANU
TRAUMATISMELE POLULUI ANTERIOR AL GLOBULUI OCULAR LA CARNIVORELE DOMESTICE
TRAUMA TO THE ANTERIOR SEGMENT OF THE EYE IN DOMESTIC CARNIVORES 411
L.C. BURTAN, I. BURTAN, M. FÂNTÂNARU, S. CIOBANU, ROXANA TOPALĂ
EFECTE SECUNDARE ALE CHIMIOTERAPIEI CU CITOSTATICE ÎN CANCERUL MAMAR LA CANINE
SECONDARY EFFECTS OF CYTOSTATIC THERAPY IN CANINE MAMMARY CANCER 417
M. CANTEMIR, CRISTINA REBEGEA, ELENA RUGINOSU, MARIANA SOFRONIE, ANCA PLĂVĂNESCU
CERCETĂRI PRIVIND FLORA BACTERIANĂ IZOLATĂ DIN SECREȚIILE GENITALE DE LA VACI CU METROPATIE CRONICĂ
RESEARCHES CONCERNING BACTERIAL FLORA ISOLATED FROMGENITAL SECRETIONS IN COWS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS 421
LAURA CRISTINA CERNEA, MIHAI CERNEA, LAURENȚ OGNEAN, VALENTIN NĂSTASA, ŞTEFAN RĂILEANU, MIHAI MAREŞ, LUIS M. MADEIRA DE CARVALHO, ANCA CHEREJI
EFICACITATEA EXTRACTELOR HIDROALCOOLICE DIN PLANTE ASUPRA OUĂLOR ŞI LARVELOR DE STRONGILI DE LA ECVINE
THE EFFICACY OF HIDROALCHOOLIC HERBAL EXTRACTS ON EGGS AND LARVAE OF EQUINE STRONGYLS 426
LAURA CRISTINA CERNEA, MIHAI CERNEA, LAURENȚ OGNEAN, VIOREL MICLĂUŞ, SEBASTIAN TRÎNCĂ
INFLUENȚA EXTRACTELOR VEGETALE HIDROALCOOLICE ASUPRA EVOLUȚIEI PROTEINOGRAMEI LA MIEI
THE INFLUENCE OF HYDRO-ALCOHOLIC PLANT EXTRACTS ON PROTEIN EVOLUTION FROM LAMBS 432
MIHAI CERNEA, LAURA CRISTINA CERNEA, LAURENȚ OGNEAN, VALENTIN NĂSTASA, MIHAI MAREŞ, ŞTEFAN RĂILEANU, LUIS M. MADEIRA DE CARVALHO
PHYTOTHERAPY IN EQUINE STRONGYLIDOSIS
ALTERNATIVE FITOTERAPEUTICE ÎN STRONGYLIDOZE LA ECVINE 436
MIHAI CERNEA, LAURA CRISTINA CERNEA, LAURENȚ OGNEAN, VALENTIN NĂSTASA′ MIHAI MAREŞ, ŞTEFAN RĂILEANU, SEBASTIAN TRÎNCĂ
FARMACODINAMIA CLASELOR DE ANTIHELMINTICE UTILIZATE ÎN STRONGILIDOZA ECVINĂ
PHARMACODINAMIC STUDIES OF ANTHELMINTIC CLASSES USED IN EQUINE STRONGYLIDOSIS 442
ANCA CHEREJI, GH. RĂPUNTEAN, R. CHEREJI, M. CERNEA, N.A. OROS, VETURIA NUELEANU
FENOMENUL DE ANTIBIOREZISTENȚĂ A UNOR GERMENI GRAM-NEGATIVI FAȚĂ DE COLISTINĂ
THE ANTIBIORESISTENCE FENOMEN OF SOME GRAM NEGATIVE GERMS TO COLESTIN 447
B. CHIROIU′ A. GEORGESCU , S. PETCU, I. PAPUC, R. LĂCĂTUŞ,. ILEANA MATEI
EXPLORĂRI IMAGISTICE DE ÎNALTĂ REZOLUȚIE A VASELOR PERFORANTE TEGUMENTARE FOLOSITE ÎN CHIRURGIA RECONSTRUCTIVA A DEFECTELOR DE SUBSTANȚĂ. MODEL EXPERIMENTAL PE SOBOLAN
HIGH RESOLUTION IMAGISTIC OF SKIN PERFORATOR VESSELS USED IN RECONSTRUCTIVE SURGERY. EXPERIMENTAL MODEL ON RAT 451

CHIRUTĂ C.-A., ROȘCA P.
PROGRESE ÎN ÎNSĂMÂNȚĂRILE ARTIFICIALE LA BOVINE PRIN UTILIZAREA UNUI SISTEM COMPUTERIZAT DE GESTIUNE
PROGRESSES IN ARTIFICIAL INSEMINATION ON COWS USING AN INFORMATICS ADMINISTRATION SYSTEM 459
GR. CIORNEI, L. RUNCEANU, D.DRUGOCIU, P. ROŞCA
STUDIU COMPARATIV ÎNTRE ÎNSĂMÂNȚAREA INTRAUTERINĂ ȘI CLASICĂ LA SCROAFE
COMPARATIVE STUDIES ON ARTIFICIAL INTRAUTERINE INSEMINATION (I.A.I.U) AND THE CLASSICAL ONE IN SWINE 464
S. CIOBANU
DRENAJUL CHIRURGICAL
SURGICAL DRAINAGE 469
M. CODREANU, CRISTINA FERNOAGĂ, C.ŞERDEAN, IULIANA IONAŞCU, IULIANA CODREANU, M. CORNILĂ
RELEVANȚA EXAMENUL ECOGRAFIC ÎN CORELAȚIE CU REZULTATELE EXAMENULUI CLINIC ŞI DE LABORATOR ÎN UNELE PANCREATOPATII LA CÂINE
THE RELEVANCE OF ULTRASOUND EXAMINATION IN CORRELATION WITH THE CLINICAL AND LABORATORY FINDINGS OF SOME PANCREATIC DISEASES IN DOG 477
M. CODREANU, C.ŞERDEAN, CRISTINA FERNOAGĂ, M. CORNILĂ, ULIANA CODREANU, IULIANA IONAŞCU
STUDIU PRIVIND IMPORTANȚA EXAMENULUI ECOGRAFIC ÎN DIAGNOSTICUL AFECȚIUNILOR SUPRARENALELOR LA CÂINE
STUDY CONCERNING THE IMPORTANCE OF ULTRASOUND EXAMINATION IN ADRENAL GLANDS DISEASES IN DOG 483
A. COMÂRZAN, N. TUDOR, C. VLĂGIOIU, V. V. POPA
ETAPELE UROGRAFIEI ŞI TOLERANȚA IOPAMIDOLULUI LA CÂINE
UROGRAPHY STAGES AND IOPARAMIDOL TOLERANCE IN DOG 487
CRISTEA GHEORGHE, MAREŞ MIHAI, CERNEA MIHAI, CERNEA CRISTINA, GRECU MARIANA, MORARU RAMONA, MALIC LUMINIȚA, NĂSTASĂ VALENTIN
CONSIDERATII FARMACOCLINICE PRIVIND PROCESUL DE REPARATIE TISULARĂ UTILIZÂND ENZIME PROTEOLITICE DE *EUPHAUSIA SUPERBA* ÎN TRATAMENTUL PLĂGILOR ACCIDENTALE TARDIVE LA CAL
PHARMACOCLINICAL CONSIDERATIONS ON THE PROCESS OF TISSUE REPAIR USING PROTEOLYTIC ENZYMES OF EUPHAUSIA SUPERBA IN THE TREATMENT OF ACCIDENTAL TARDIVE WOUNDS IN HORSE 493
CLAUDIA – MARIANA CONSTANTINESCU, MARIA SERDARU, V. CRIVINEANU, G. GORAN, EMILIA CIOBOTARU, MANUELLA MILITARU
VALORILE SELENIULUI ÎN SERUL SANGUIN AL RUMEGĂTOARELOR DIN JUDEȚUL VÂLCEA, ROMANIA
EVALUATION OF BLOOD SERUM SELENIUM IN RUMINANTS FROM VÂLCEA COUNTY, ROMANIA 498
RUXANDRA COSTEA, A. TANASE, L.IONIȚĂ, C. COPAESCU, I.GIRJOABA, JAQUELINE MOCANU, DANA SIMONA DRUGOCIU
ANESTEZIA INHALATORIE LA PORC IN INTERVENTIILE CHIRURGICALE LAPAROSCOPICE
INHALATORY ANAESTHESIA IN PIGS FOR LAPARASCOPIC SURGERY 503
R.T. CRISTINA, EUGENIA DUMITRESCU, DIANA OBIŞTIOIU - IACOB, FLAVIA HANGANU FALTINSKI F
EUPHORBIA CYPARISSIAS OINTMENT'S EFFICACY IN DOG'S DEMODECY (CASE - STUDY) 506
MARIA CRIVINEANU, CAMELIA PAPUC, CORINA DURDUN, VALENTIN NICORESCU
REDUCING POWER AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF GREATER CELANDINE (CHELIDONIUM MAJUS) AND STAG`S-HORN CLUBMOSS (LYCOPODIUM CLAVATUM) POLYPHENOLIC EXTRACTS 516

GH. DĂRĂBUŞ, I. OPRESCU, S. MORARIU, NARCISA MEDERLE, M.S. ILIE, K. IMRE, D. MORAR, IONELA HOTEA, ILEANA BRUDIU
THE STUDY OF SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN INFECTION WITH CRYPTOSPORIDIUM SPP. AND OTHER ENTEROPATHOGENS IN CALVES 522
GH. DĂRĂBUŞ, M. AFRENIE, V. HERMAN, M.S. ILIE, D. INDRE
PARAZITISMUL CU NEMATODE LA CĂPRIOARĂ(CAPREOLUS CAPREOLUS) - STUDIU NECROPSIC DE CAZ
NEMATODA PARASITISM IN DEER (CAPREOLUS CAPREOLUS) – NECROPSIC CASE STUDY 529
Ş. DINU
ETIOLOGIA, SIMPTOMATOLOGIA ŞI TERAPIA UNOR AFECŢIUNI CHIRURGICALE LA MAMIFERE ŞI PĂSĂRI
ETIOLOGY, SYMPTOMATOLOGY AND THERAPY IN SOME SURGICAL DISEASES AT MAMMALS AND BIRDS 532
ALINA DONISA, MUSTE A.,BETEG F.
COMPARATIVE STUDY ON BOVINE NORMAL EYE FUNDUS REGARDING AGE. 539
DANA-SIMONA DRUGOCIU, BIRŢOIU A., MARIANA SOFRONIE, FOICA, M.
OBSERVATII PRIVIND ACTIVITATEA REPRODUCTIVĂ ŞI CARACTERISTICILE MORFO-FIZIOLOGICE LA VACILE DIN RASA SURĂ DE STEPĂ
OBSERVATIONS REGARDING THE REPRODUCTION ACTIVITY AND MORPHO-PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AT COW GREY STEPPE BREED 543
GRECU MARIANA, NĂSTASĂ V., MORARU RAMONA, MAREŞ M., HRIŢCU DIANA-LUMINIŢA, PATRAŞ XENIA, ILIE CORNELIA, CURA P
PHARMACOCLINICAL CONSIDERATIONS ON THE EFFICIENCY AND TOLERABILITY PIROXICAM - B - CYCLODEXTRIN COMPLEX IN NONSPECIFIC INFLAMMATORY ILLNESSES IN DOGS 547
S. POP, F. CHIRILA, N. FIŢ, S. RĂPUNTEAN, G. NADĂŞ
MAMITELE CLINICE LA VACĂ: MICROORGANISME IMPLICATE ŞI SENSIBILITATEA LOR LA ANTIBIOTICE ŞI ANTIMICOTICE
CLINICAL MASTITIS IN COWS: THE MICROORGANISM INVOLVED AND THEIR SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS AND ANTIMYCOTICS 553
I.C. GÂRJOABĂ, N. TUDOR, T. SOARE, A. TĂNASE, ADRIANA ALISTAR, C. VLĂGIOIU
RADIODIAGNOSTICUL: MIJLOC DE GHIDAJ AL BIOPUNCŢIEI TUMORILOR OSOASE
RADIODIAGNOSTIC : GUIDING THE BIOPUNCTION OF BONE TUMORS 558
I.C. GÂRJOABĂ, N. TUDOR, A. TĂNASE, T. SOARE, C. VLAGIOIU
IMPLICAŢIILE PATOLOGICE ÎN PROCESUL DE CALUSARE ŞI SEMNIFICAŢIA ACESTORA ÎN APARIŢIA OSTEOSARCOMULUI: PREZENTARE DE CAZ
PATHOLOGICAL IMPLICATIONS IN CALLUSING AND THEIR INVOLVEMENT IN OSTEOSARCOMA. CASE STUDY 562
MOHAMED M. GHANEM; AFAFA D. A. MOHAMED; MOHAMED Y. RAMADAN
CLINICAL, BIOCHEMICAL AND HISTOPATHOLOGICAL STUDY ON PARASITIC GASTROENTERITIS ASSOCIATED WITH CAPRINE COCCIDIOSIS: COMPARATIVE EFFECT OF TOLTRAZURIL AND PROPOLIS 565
I. GROZA, M. CENARIU, L. BOGDAN, I.MORAR, S.CIUPE, A. BARTOŞ
CERCETĂRI PRIVIND INDUCEREA ŞI SINCRONIZAREA ESTRULUI LA CAPRINE ÎN EXTRASEZON
RESEARCHES CONCERNING THE INDUCTION AND SYNCHRONIZATION OF OUT OF SEASON ESTRUS IN GOATS 581
IONELA HOTEA, GH. DĂRĂBUŞ, NARCISA MEDERLE, M.S. ILIE, K. IMRE, A. BALINT, D. INDRE
PREVALENŢA INFECŢIEI CU TOXOPLASMA GONDII LA PISICI ÎN JUDEŢUL ARAD 587
PREVALENCE OF TOXOPLASMA GONDII INFECTION IN CATS IN ARAD COUNTY
HRIŢCU LUMINIŢA DIANA
STUDIU DOCUMENTAR ASUPRA SPECIEI CLAVICEPS PURPUREA, SURSA DE PRINCIPII ACTIVE CU EFECTE CITOSTATICE
CLAVICEPS PURPUREA – SOURCE OF CYTOSTATIC ACTIVE PRINCIPLES. REVIEW STUDY 593

OLIMPIA C. IACOB, DENISA TALEF
EXTENSIVENESS OF ANISAKIS SIMPLEX INFESTATION IN IMPORTED FROZEN FISH AND THE RISK OF HUMAN INFESTATION 600
IGNA C.
COMPARATIVE STUDIES BETWEEN DYNAMIC COMPRESSION PLATE (DCP) AND LOW-CONTACT DYNAMIC COMPRESSION PLATE (LCDCP) 609
IGNA C., SCHUSZLER LARISA, SERES MONICA, SABAU MARIUS, DASCALU ROXANA, LUCA C., SALA A.
THE APPROACH OF THE PERIOSTEUM COMPONENTS AS PROMOTERS FOR OSSEOUS REGENERATION PROCESS 612
K. IMRE, GH. DĂRĂBUŞ, NARCISA MEDERLE, MIRELA PALCA, M. PALCA
SUBTIPIZAREA SPECIEI CRYPTOSPORIDIUM PARVUM LA VIȚEI PRIN ANALIZA SECVENȚIALĂ A GENEI GP60
SUBTYPING OF CRYPTOSPORIDIUM PARVUM AT CALVES USING SECVENTIAL ANALISYS OF GP60 GENE 616
D. INDRE, GH. DĂRĂBUŞ, I. OPRESCU, S. MORARIU, NARCISA MEDERLE, M.S. ILIE, IONELA HOTEA, K. IMRE, A. BALINT
DISTRIBUȚIA LINIARĂ A NEMATODELOR ÎN TRACTUL GASTROINTESTINAL LA OVINE
LINEARY DISTRIBUTION OF NEMATODA INTO THE GASTROINTESTINAL TRACT IN SHEEP 620
CARMEN IONITA VERONICA BAGHIU, D. BAGHIU, OANA CONEA
STUDIU MORFOCLINIC IN CURSUL UNOR EPISOADE DE PEROZIS LA PUII DE CARNE
MORPHOCLINICAL STUDY IN BROILER CHICKEN'S PEROSIS 625
MARIANA IONIȚĂ, I.L. MITREA, M.C. BUZATU, LENUȚA DASCĂLU, AURELIA IONESCU
DINAMICA ANUALĂ A UNOR POPULAȚII DE ARTROPODE HEMATOFAGE (CĂPUŞE IXODIDE, CULICOIZI) – VECTORI PENTRU AGENȚI PATOGENI LA ANIMALE ŞI OM, ÎN DIFERITE REGIUNI ALE ROMÂNIEI
SEASONAL DYNAMICS OF HAEMATOPHAG ARTHROPOD POPULATIONS (TICKS AND CULICOIDES SPP.) - VECTORS OF PATHOGENS IN ANIMALS AND HUMANS, IN DIFFERENT AREAS OF ROMANIA 629
J. A. LEVENTE
AVANTAJELE FOLOSIRII TEHNICILOR DE INTERVENȚIE CHIRURGICALĂ ÎN RECUPERAREA GRASETULUI CANINELOR CARE AU SUFERIT RUPTURA LIGAMENTELOR ÎNCRUCIŞATE CRANIALE
ADVANTAGES IN USING THE SURGICAL TECHNIQUES IN RECOVERING A CANINE KNEE AFTER A CRANIAL CRUCIATE LIGAMENTS RUPTURE 637

PARTEA IIa:

K. IMRE, GH. DĂRĂBUŞ, I. OPRESCU, S. MORARIU, NARCISA MEDERLE, M. S. ILIE, IONELA HOTEA, A. BALINT, D. INDRE, MIRELA PALCA
SCREENING EPIDEMIOLOGIC ASUPRA EVOLUȚIEI CRIPTOSPORIDIOZEI ÎN ASOCIERE CU ALȚI ENTEROPATOGENI LA VIȚEI, ÎN PARTEA DE VEST A ROMÂNIEI
EPIDEMIOLOGYCAL SCREENING OF THE EVOLUTION OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN ASSOCIATION WITH OTHER ENTEROPATHOGENS AT CALVES IN WESTERN ROMANIA 642
TIMEA KISS, L. KŐBŐLKUTI, C. POPOVICI, D. CADAR, A. URICARU, MIHAELA NICULAE
SINDROMUL DE ŞOC TOXIC FATAL ÎN URMA INFECȚIEI CU STREPTOCOCCUS CANIS LA PISICĂ: PREZENTARE DE CAZ
TOXIC SHOCK SYNDROME IN STREPTOCOCCUS CANIS INFECTION IN CAT. CASE STUDY 647
R. LĂCĂTUŞ, I. PAPUC, R.C. PURDOIU
ARTERIOGRAFIA CU SUBSTANȚE DE CONTRAST NONIONICE (OPTIRAY 350), LA CÂINE
ARTHERIOGRAPHY WITH NONIONIC CONTRAST SUBSTANCES (OPTIRAY 350), IN DOG 652
NICOLAAS E., LAMBRECHTS
COMPLEXITIES OF STIFLE STABILITY IN CANINE CRANIAL CRUCIATE DISEASE 656

D.C. LESCAI, A. POPOVICI, F. DUMITRESCU, I. BURTAN, L. HARBUZ
PREVALENCE OF HELICOBACTER SPP. IN DOGS THAT UNDERGO GASTROSCOPICAL EXAMINATIONS 661
R. N. MĂLĂNCUȘ, GH. SOLCAN, V. VULPE
DIAGNOSTICUL GASTRITELOR SECUNDARE NEFRITEI CRONICE LA CÂINE
THE DIAGNOSIS OF CANINE GASTRITIS SECONDARY TO CHRONIC NEPHRITIS 664
NARCISA MEDERLE, K. IMRE, GH. DĂRĂBUȘ, I. OPRESCU., S. MORARIU, M. ILIE, D. INDRE, A. BALINT, MIRELA PALCA, IONELA HOTEA
STUDIU EPIDEMIOLOGIC PRIN ELISA ASUPRA PARAZITISMULUI CU CRYPTOSPORIDIUM SPP. LA MIEI
EPIDEMIOLOGICAL STUDY USING ELISA ON THE PARASITISM WITH *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. AT LAMBS 668
DIANA MOCANU, N. HAGIU
DIAGNOSTICUL ECOGRAFIC AL ENDOCADIOZEI VALVULARE MITRALE LA CÂINII METIȘI AI RASELOR DE TALIE MICĂ
ULTRASOUD DIAGNOSIS OF DEGENERATIVE MITRAL VALVE DISEASE ON SMALL CROSSBREED DOGS 671
A. MUSTE, MELANIA CRIȘAN, FL. BBETEG, I. PAPUC , R. LĂCĂTUȘ, ALINA DONISĂ, M. MUSTE
CERCETĂRI PRIVIND DIAGNOSTICUL ÎN BOALA NAVICULARĂ LA CABALINE
RESEARCHES CONCERNING DIAGNOSIS OF NAVICULAR DISEASE IN HORSES 675
M. MUSTEAȚĂ, V. VULPE, S.I. IENCEAN, GH. SOLCAN
COMPUTER TOMOGRAPHY ASPECTS IN FRACTURES OF VERTEBRAL COLUMN IN DOG 1 679
NĂSTASĂ VALENTIN, MUNTEANU, PAVLI, MAREȘ, CERNEA, CERNEA, GRECU, MORARU, MALIC LUMINIȚA
PHARMACOCLINICAL CONSIDERATIONS ON KETAMINE - DIAZEPAM, KETAMINE - ACEPROMAZINE AND PROPOFOL - BUTORPHANOL ANAESTHESIA IN DOGS
CONSIDERAȚII FARMACOCLINICE ASUPRA ANESTEZIEI CU KETAMINĂ – DIAZEPAM, KETAMINĂ - ACEPROMAZINĂ ȘI PROPOFOL – BUTORFANOL 684
NEGREA O., O. LIVIU, V. MICLAUS, VIOARA MIRESAN, CAMELIA RĂDUCU
EPIZOOTOLOGICAL ASPECTS REGARDING IN VITRO RESISTANCE OF LINGUATULA SERRATA LARVA STAGES 691
NEGREA O., O. LIVIU, V. MICLAUS, VIOARA MIRESAN, CAMELIA RĂDUCU, Z. MARCHIS
DIAGNOSIS EPIDEMIOLOGIC OBSERVATIONS IN DOG LINGUATULOSIS 694
L. OANA, V. MICLAUS, C. PESTEAN, C. OBER, N. MATES, L. OGNEAN, O. NEGREA
CLINICAL, THERAPEUTICALLY AND HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS IN BOVINE SOLE ULCER 698
OANA L., C. OBER, C. PESTEAN, N. MATES, V. MICLAUS, L. OGNEAN
OBSERVATIONS CONCERNING CLINICAL AND THERAPEUTIC ASPECTS IN INTERDIGITAL HYPERPLASIA IN COWS 702
OGNEAN L., MEDA MOLDOVAN, CRISTINA CERNEA, L. OANA, A. GAL, C. OBER
DEPISTATEA UNOR INCOMPATIBILITĂȚI SANGUINE CU RISC HEMOTRANSFUZIONAL LA CAINE
DETECTION OF BLOOD INCOMPATIBILLITIES IN DOGS WITH MAJOR RISKS IN BLOOD TRANSFUSION THERAPY 707
OKON MICHAELLA, PAVLI C., ROȘCA P.
REPRODUCTIVE CYCLE IN PRIMITIVE DOG BREEDS SALUKI 713
REBECCA A. PACKER
EMERGING THERAPIES IN ACUTE SPINAL CORD INJURY 716
I. PAPUC, RADU LĂCĂTUȘ, R.C. PURDOIU
TESTE SPECIALE UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL CLINIC AL TULBURĂRILOR NEUROLOGICE LA CÂINE
SPECIAL TEST USED IN CLINICAL DIAGNOSTIC OF NEUROLOGICAL DISEASES IN DOG 721
PAVLI CONSTANTIN, LIVIU RUNCEANU, TANASE OANA
ULTRASOUND DIAGNOSIS VALUE ON OVULATION, OVARIAN AND UTERUS PATHOLOGY IN SOWS 730

C. PAVLI, L. RUNCEANU, OANA TĂNASE, I. SĂCULȚANU
REAL TIME ULTRASONOGRAPHY ACCURACY IN SWINE PREGNANCY DIAGNOSIS 735
ANCA PLĂVĂNESCU, ELENA RUGINOSU, MARIANA SOFRONIE, L. DASCĂLU, C. POPESCU
STUDIU PRIVIND COMBATEREA MONTELOR REPETATE LA VACILE DE LAPTE PRIN DIFERITE METODE
CONTROL OF REPEATED BREEDING IN DAIRY COWS USING DIFERENT TREATMENTS 738
POP AL. R., I. GROZA, V. MICLĂUŞ, I. MORAR, SIMONA CIUPE, V. RUS, DARIA GROZA, M. BORZAN, I.N. GHEGHEŞ
INFLUENȚA ADMINISTRĂRII UNOR HORMONI STEROIDIENI NATURALI ŞI SINTETICI ASUPRA FUNCȚIEI GAMETOGENE LA IEPUROI
INFLUENCE OF SOME NATURAL AND SYNTHEETIC HORMONES ON GAMETOGENESIS IN MALE RABBITS 743
N. ROŞCA., GH. BORONCIUC., I. BALAN., P. PAVALIUC., IULIA CAZACOV, ION MEREUȚĂ.
MORFOPATOLOGIA SPERMEI ÎN CONDIȚII DE STRES
MORPHOPATHOLOGY OF SPERM IN STRESS CONDITIONS 748
B. ST. RUGINA, L. C. BURTAN , DIANA IAMANDI
FRECVENTA SI SISTEMATICA AFECTIUNILOR CRISTALINULUI LA CARNIVORE
THE FREQUENCY AND SYSTEMATICS OF THE CRYSTALLINE LENS AFFECTIONS AT CARNIVORES 751
ELENA RUGINOSU, MARIANA SOFRONIE, ANCA PLĂVĂNESCU, ŞT. CREANGĂ, M. PÎNTEA, L. DASCĂLU, C. POPESCU
DIRIJAREA PERIOADEI PUERPERALE LA VACILE DE LAPTE PRIN DIFERITE TRATAMENTE IN PERIOADA ANTEPARTUM SI POSTPARTUM
CONTROL OF PUERPERIUM IN DAIRY COWS BY DIFFERENT ANTEPARTUM AND POSTPARTUM TREATMENTS 755
LARISA SCHUSZLER, C. IGNA
OPTIONS FOR PERIOPERATIVE PAIN MANAGEMENT IN SMALL ANIMALS 762
I. SCURTU, G. GIURGIU, M. MIRCEAN, LAURA LIVITCHI, MIHAELA NICULAE, A. MACRI
TESTAREA EFICIENTEI DIALIZEI PERITONEALE IN INSUFICIENTA RENALA UTILIZAND O SOLUTIE PREPARATA DIN LICHID RINGER SI GLUCOZA LA ANIMALELE DE COMPANIE
TESTING OF EFFICIENCY OF PERITONEAL DIALYSIS IN RENAL FAILURE IN COMPANION ANIMALS USING A COMBINATION OF RINGER SOLUTION AND GLUCOSE 767
A. R.SZAKACS , BIANCA SZAKACS, N. TISE , V. COZMA
EVALUAREA CORELATIVĂ A CONCENTRAȚIEI IMUNOGLOBULINELOR ŞI COMPLEXELOR IMUNE CIRCULANTE SERICE LA SUINE INFESTATE EXPERIMENTAL CU ASCARIS SUUM
EVALUATION OF CONCENTRATION OF IMMUNOGLOBULIN AND CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN PIGS EXPERIMENTALY INFESTED WITH *ASCARIS SUUM* 771
TRAMBITAS B., IONITA L., PUIA, M.
DATE MORFOCLINICE INTR-UN EPISOD DE TOXEMIE DE GESTATIE LA OI
MORPHOLOGICAL ASPECT IN AN OUTBREAK OF GESTATION TOXIEMIA IN SHEEP 775
WAEL M. EL-DEEB, EMAD E. YOUNIS
CLINICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON THEILERIA ANNULATA IN EGYPTIAN BUFFALOES (BUBALUS BUBALIS) WITH PARTICULAR ORIENTATION TO OXIDATIVE STRESS AND KETOSIS RELATIONSHIP 780

Secţiunea Producţii Animaliere Şi Sănătate Publică

ABAITANCEI CRAITA, COMAN I., TARCA FELICIA, ZISU CORINA
DETERMINAREA REZIDUURILOR DE STREPTOMICINA DIN MIERE, PRIN TESTUL IMUNOENZIMATIC ELISA
DETERMINATION OF STREPTOMYCIN RESIDUES IN HONEY BY ENZYME IMMUNOASSAY TEST, ELISA. 789

ABAITANCEI CRAITA, COMAN I., TARCA FELICIA, ZISU CORINA
DETERMINAREA REZIDUURILOR DE SULFAMIDE PRIN TESTUL RIA CHARM II
DETECTION OF SULPHONAMIDES RESIDUES IN HONEY BY RIA CHARM II TEST 794
ALBU AIDA, ŞINDILAR E.
EVALUAREA NIVELURILOR REZIDURILOR DE NITRAȚI/NITRIȚI ÎN UNELE NUTREȚURI FOLOSITE ÎN ALIMENTAȚIA VACILOR DE LAPTE ŞI POTENȚIALUL LOR TOXIC
EVALUATION OF NITRATE/NITRITE RESIDUE LEVELS IN SOME DAIRY COW FEEDS AND THEIR TOXIC POTENTIAL..... 799
AMARICAI MARIANA, RIMBU CRISTINA, GUGUIANU ELEONORA, CRETU CARMEN, CARP CARARE M.
OBSERVAȚII PRIVIND CALITATEA MICROBIOLOGICĂ A LAPTELUI DE COLECTURĂ PENTRU O UNITATE CU SISTEM HCCP ÎN CURS DE IMPLEMENTARE
OBSERVATIONS REGARDING THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF GATHERED MILK FOR A UNIT WITH HCCP SYSTEM IN COURSE OF IMPLEMENTATION 804
AMFIM ADRIANA, SIMION VIOLETA ELENA , PARVU MONICA
ASPECTE EPIDEMIOLOGICE IN UNELE ZOONOZE PARAZITARE LA OM IN ROMANIA
EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS IN SOME PARASITIC ZOONOSIS AT HUMANS IN ROMANIA..... 811
ANITA ADRIANA, ANITA D., TANASE OANA IRINA, LUDU LUANDA, SAVUȚA GH
SEROLOGICAL EVIDENCE OF HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN DIFFERENT SWINE CATEGORIES FROM IAŞI COUNTY
EVIDENȚIEREA SEROLOGICĂ A INFECȚIEI CU VIRUSUL HEPATITEI E LA DIFERITE CATEGORII DE SUINE DIN JUDEȚUL IAŞI 817
M. E. BÎRSĂ, ŞINDILAR E. , AIDA ALBU
NIVELUL REZIDUURILOR DE CADMIU DIN MIERE PRIN METODA SPECTROFOTOMETRIEI DE ABSORBȚIE ATOMICĂ
EVALUATION OF CADMIUM RESIDUES LEVEL FROM HONEY BY ATOMIC ABSORBTION SPECTROFOTOMETRY METHOD..... 820
M. E. BÎRSĂ, E. ŞINDILAR, AIDA ALBU
NIVELUL REZIDUURILOR DE PLUMB ÎN MIEREA DE SALCÂM ŞI POLIFLORĂ
LEAD RESIDUES LEVEL IN ACACIA AND MIXED FLOWERS HONEY..... 824
MARIA NICOLETA BOBUTAC
CONTAMINAREA FUNGICĂ A UNOR SORTIMENTE DE BRÂNZETURI PROVENITE DIN REȚEAUA ALIMENTARA
FUNGAL CONTAMINATION OF SOME KIND OF CHEESE FROM COMMERCIAL CHAIN 828
BUSUIOC OANA
CERCETARI ETIOLOGICE ŞI EPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECȚIILE BACTERIENE DIGESTIVE LA PUII PENTRU CARNE CRESCUȚI LA SOL
ETIOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL RESEARCHES REGARDING DIGESTIVE BACTERIAL INFECTIONS IN BROILER CHICKENS GROUND BRED..... 833
CADAR D., SPINU MARIANA, CSAGOLA A., TUBOLY T, MICLAUS V., RUS V., KISS TIMEA, KOBOLKUTI L., NICULAE MIHAELA, URICARU A., UNGVARI A., RINDT KRISZTINA
RĂSPUNSUL IMUN UMORAL LA SUINE AFECTATE DE PCV2 ŞI CLINIC SĂNĂTOASE PCV2 POZITIVE
HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 INFECTED PIGS 836
CADAR D., CSAGOLA A., TUBOLY T., SPINU MARINA, BRUDASCA F., KOBOLKUTI L.
PREVALENȚA INFECȚIEI CU PCV2 ÎN POPULAȚIILE DE MISTREȚI DIN NORD-VESTUL TRANSILVANIEI
PREVALENCE OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 INFECTION IN WILD BOAR FROM NORTH WEST OF TRANSILVANIA 839
N. CATANA, V. HERMAN, IONICA FODOR, VIRGILIA POPA
REZISTENTA LA ANTIBIOTICE A TULPINILOR APEC
RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF APEC STRAINS..... 843

N. CATANA, VIRGILIA POPA, V. HERMAN, IONICA FODOR
UTILIZAREA ROŞULUI DE CONGO CA MARKER FENOTIPIC DE IDENTIFICARE A TULPINILOR APEC
USE OF CONGO RED AS A MARKER FOR IDENTIFYING PHENOTYPICALLY APEC STRAINS 846
CEAUSI C., TOGOE I., TUDOR L., ILIE L. I.
THE DETERMINATION OF MIDGUT AND RECTUM MICROORGANISMS ON HONEYBEES (APIS MELLIFERA) 848
CEAUSI C., TOGOE I., TUDOR L., ILIE L. I.
THE DETERMINATION OF YEASTS AND MOULDS IN HONEYS DESTINED TO MERCHANDISING IN BUCHAREST 851
CHEREJI ANCA, RAPUNTEAN GH., CHEREJI R., OROS N. A., CERNEA M.
SINERGISMUL SULFAMETOXIDIAZINĂ-TILOZINĂ ÎN CAZUL GENULUI PASTEURELLA
SYNERGISM OF SULFAMETHOXIDIAZINE AND TYLOSINE AGAINST PASTEURELLA PATHOGENS 855
ANDREEEA-FLAVIA CÎRLAN, EUSEBIE ŞINDILAR
CÂTEVA OBSERVAȚII PRIVIND COMPOZIȚIA FIZICO-CHIMICĂ A CĂRNII MELCULUI COMESTIBIL HELIX POMATIA
OBSERVATIONS REGARDING THE PHYSICAL AND CHEMICAL COMPOSITION OF THE MEAT FROM THE *HELIX POMATIA* SNAIL 860
CONSTANTIN CIOTĂU, IONEL BONDOC, EUSEBIE ŞINDILAR, EUSEBIE VIOREL ŞINDILAR
CERCETĂRI PRIVIND FRECVENȚA SPECIILOR DESTAPHYLOCOCCUS ÎN LAPTELE CRUD MATERIE PRIMĂ
RESEARCH ON THE FREQUENCY OF STAPHYLOCOCCUS SPECIES IN MILK AS RAW MATERIAL 863
CHIRILĂ COVALIU, TUDOR PERIANU
CERCETĂRI PRIVIND SEMNIFICAȚIA DOZĂRII GAMAINTERFERONULUI ÎN DIAGNOSTICUL TUBERCULOZEI BOVINE
RESEARCHES REGARDING THE INTERFERON GAMMA (IFN-Γ) DOSAGE IN BOVINE TUBERCULOSIS DIAGNOSIS 867
CHIRILĂ COVALIU, TUDOR PERIANU
OBSERVAȚII PRIVIND TUBERCULOZA BOVINĂ ÎN JUDEȚUL IAŞI
OBSERVATIONS REGARDING BOVINE TUBERCULOSIS IN IASI COUNTY 873
COMAN M., OLARIU-JURCA I., STANCU A., PETRINA C., COMAN ALINA
ASPECTE PRIVIND DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎNTR-UN FOCAR DE PESTĂ PORCINĂ CLASICĂ DIN PARTEA DE VEST A ROMÂNIEI
ASPECTS OF LABORATORY DIAGNOSIS IN AN OUTBREAK OF CLASSICAL SWINE FEVER IN THE WESTERN PART OF ROMANIA 877
CRETU CARMEN, GUGUIANU ELEONORA, RIMBU CRISTINA, HRISCU ELENA, CARP CARARE M.
CERCETĂRI PRIVIND IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA SPECIEI CAMPYLOBACTER SPP. DIN CECUMURI ŞI DE PE PASĂRILE DESTINATE SACRIFICĂRII
RESEARCHES CONCERNING ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CAMPYLOBACTER SPP FROM POULTRY CECUM AND CARCASSES 881
CRETU CARMEN, GUGUIANU ELEONORA RIMBU CRISTINA, CARP CARARE C., CARP CARARE M.
INFLUENȚA PH-ULUI ŞI TEMPERATURII ASUPRA SPECIEI CAMPYLOBACTER SPP. DE PE CARNEA DE PASĂRE PROASPĂTĂ, REFRIGERATĂ ŞI CONGELATĂ
THE INFLUENCE OF PH AND TEMPERATURE AGAINST *CAMPYLOBACTER SPP.* GROWTH IN FRESH, FROZEN AND FREEZING POULTRY CARCASSES 885
DAMIESCU LACRAMIOARA, TRIF ALEXANDRA
THE INCIDENCE OF MYCOTOXINS IN MEAT AND MEAT PRODUCTS IN THE WEST COUNTIES OF ROMANIA IN THE PERIOD 2004-2008 889

HAMMOUDI A/H. , A.MOUATS, M.HALBOUCHE, H.AGGAD, S.A. ABDELHADI
ETUDE DE LA CARACTERISATION ET LA TRANSMISION DES GENES DE VIRULENCE D'E .COLI AVIAIRE PAR LA METHODE PCR DANS L'OUEST D'ALGERIE
STUDY AND CHARACTERIZATION OF THE TRANSMISSION OF VIRULENCE GENES OF E. AVIAN-COLI BY PCR METHOD IN THE WEST OF ALGERIA 895
MIHALACHI (DIMITRIU) SIMONA, SCAGLIARINI ALESSANDRA, PERIANU T.
OBSERVAȚII PRIVIND EVALUAREA STATUSULUI IMUNITAR PRIN IFI LA CÂINII SUSPECȚI DE BOALA CARRÉ
OBSERVATIONS REGARDING THE EVALUATION OF THE IMMUNE STATUS IN DOGS SUSPECTED FOR CANINE DISTEMPER 904
MIHALACHI (DIMITRIU) SIMONA, SCAGLIARINI ALESSANDRA, PERIANU T.
UTILIZAREA METODEI RT-PCR ÎN DIAGNOSTICUL BOLII CARRÉ LA CÂINE
THE DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS BY REVERSE TRANSCRIPTION-PCR 907
DOBOS TATIANA, BONDOC I., SINDILAR E.
CONSIDERAȚII ASUPRA GRADULUI DE CONTAMINARE A SMANTÂNII PASTEURIZATE CU BACTERII AEROBE MEZOFILE
CONSIDERATIONS ON THE CONTAMINATION DEGREE OF PASTEURIZED SOUR CREAM WITH AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA 910
TATIANA DOBOŞ, IONEL BONDOC, EUSEBIE ŞINDILAR
STUDII COMPARATIVE PRIVIND CALITATEA GLOBALĂ A UNTULUI DIN PRODUCȚIA INTERNĂ ŞI A CELUI DIN IMPORT
COMPARATIVE STUDIES THE GLOBAL QUALITY OF INDIGENOUS AND IMPORTED BUTTER 913
FALCA C., ROSU M.
EFECTUL COMPARATIV AL SUPLIMENTĂRII HRANEI TINERETULUI PORCIN CU ANTIBIOTICE (TIAMUTIN) ŞI CELULAZE (BIOZYM M 800)
THE COMPARASION EFFECT OF FOOD SUPPLEMENT AT THE YOUTH SWINE WITH ANTIBIOTICS (TIAMUTIN) AND CELULLASE (BIOZYM M 800) 917
FIT N., RAPUNTEAN GH., NADAS G., SUTEU E.
STUDIU ASUPRA FLOREI BACTERIENE IZOLATE DIN PLĂGI MIAZIGENE ŞI LARVE DE WOHLFARTIA MAGNIFICA IMPLICATE ÎN LEZIUNI
STUDY OF BACTERIAL FLORA ISOLATED FROM BLOWFLY WOUNDS AND *WOHLFARTIA MAGNIFICA LARVAE INVOLVED IN LESIONS* 921
FOICA F. M.,. CARP CARARE M., VLAD – SABIE ALINA, DRUGOCIU DANA SIMONA
STUDIU BIBLIOGRAFIC PRIVIND TOXIINFECȚIILE ALIMENTARE PRIN CONSUMUL DE ALIMENTE DE ORIGINE ANIMALĂ CONTAMINATE CU SHIGELLA SPP.
FOOD POISONING DUE TO THE CONSUMPTION OF SALAMI AND SAUSAGES CONTAMINATED WITH *SHIGELLA SPP*. 927
C.V. GAŞPAR, C. GAŞPAR, G. I. GAŞPAR
ANALIZA DIFERENȚIATĂ A EXTERIORULUI CONFORM STANDARDELOR RASELOR DE CIOBÂNEŞTI ROMÂNEŞTI
COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXTERIOR ACORDING TO THE BREED STANDARDS IN ROMANIAN SHEPHERD DOGS 933
GAVRILAS ANGELA, COSTACHESCU ELENA,. SIMEANU D.
CERCETĂRI PRIVIND PARAMETRII GENETICI AI UNEI POPULAȚII DE IEPURI CRESCUȚI ÎNTR-O EXPLOATAȚIE DE TIP FAMILIAL
RESEARCH REGARDING THE GENETIC PARAMETERS OF A RABBIT POPULATION RAISED IN A DOMESTIC EXPLOITATION FARM 939
GHIORGHIȚĂ ILEANA, PERIANU T.
OBSERVAȚII PRIVIND LEPTOSPIROZA CANINĂ ÎN MUNICIPIUL GALAȚI
OBSERVATIONS REGARDING CANINE LEPTOSPIROSIS IN GALATI 943

GRADINARU A. C., HAVRISTIUC SIMONA, POPESCU O.
EVALUAREA INCIDENȚEI REZIDUURILOR DE ANTIBIOTICE DIN LAPTE ŞI A INFLUENȚEI LOR ASUPRA UNOR INDICI DE CALITATE AI LAPTELUI-MATERIE PRIMĂ CA PARTE A APLICĂRII PRINCIPIILOR HACCP
EVALUATION OF THE MILK ANTIBIOTIC RESIDUES INCIDENCE AND OF THEIR INFLUENCE UPON SOME MILK QUALITY INDEXES AS PART OF THE HACCP PRINCIPLES IMPLEMENTATION 947
GRADINARU A. C., SOLCAN GH., MUNTEANU ALINA, POPESCU O.
EVALUAREA UNOR REZIDUURI DE XENOBIOTICE ELEMENTARE (PB,CU,CD,ZN) ÎN LAPTELE DE COLECTURĂ RECOLTAT DIN ZONA MOLDOVEI
EVALUATION OF SOME XENOBIOTIC TRACE ELEMENT RESIDUES (PB, CD, CU, ZN) IN THE BULK MILK SAMPLES COLLECTED FROM THE MOLDAVIAN FARMS 950
GUGUIANU ELEONORA, VULPE V., RIMBU CRISTINA, ROSCA LILIANA, LAZAR M.
AEROMONOZE DE PRIMĂVARĂ LA CIPRINIDELE DE CRESCĂTORIE
SPRING AEROMONOSES AT FARMS CIPRINIDES 953
HENDRONOTO ARNOLDUS WALEWANGKO LENGKEY, LOVITA ADRIANI
EFFECTS OF MILK FERMENTED WITH LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS AND BIFIDOBACTERIUM ON YOGHURT QUALITY AND GLUCOSE CONTENT 957
LOVITA ADRIANI, HENDRONOTO ARNOLDUS WALEWANGKO LENGKEY, NOOREMMA SOPHIANIE
THE BIOFERMENTATION OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS AND BIFIDOBACTERIUM ON MILK AGAINST THE ACTIVITY OF LIPASE AND MICE BLOOD CHOLESTEROL 960
IVANCIUC ILEANA, VASIU C.
CERCETĂRI PRIVIND EVOLUȚIA ANEMIEI INFECȚIOASE ECVINE PE TERITORIUL MARAMUREŞULUI ISTORIC
RESEARCHES CONCERNING EVOLUTION OF EQUINE INFECTIONS ANEMIA IN MARAMUREȘ REGION 963
IVANCIUC ILEANA, VASIU C.
STUDIU COMPARATIV PRIVIND TESTELE SEROLOGICE ID ŞI ELISA ÎN DIAGNOSTICUL ANEMIEI INFECȚIOASE ECVINE
COMPARATIVE STUDY BETWEEN ID AND ELISA TESTS IN DIAGNOSTIC OF EQUINE INFECTIONS ANEMIA 970
M. LAZĂR, V. VULPE, ELEONORA GUGUIANU, O.Z. OPREAN
ASPECTE EPIDEMIOLOGICE PRIVIND BOLILE PEŞTILOR DE FERMĂ DIN MOLDOVA
EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS REGARDING THE FISH FARM DISEASES FROM MOLDAVIA 974
LIONIDE A., CURCA D., SAMARINEANU M., CISMILEANU ANA, NICA DANIELA, TOCA CRISTINA, BOTUS DANIELA
EFECTUL SUPLIMENTĂRII HRANEI CU ZINC ORGANIC LA VACILE DE LAPTE ASUPRA RĂSPUNSULUI IMUN UMORAL
EFFECT OF ORGANIC ZINC SUPPLEMENTATION DIET IN DAIRY COWS ON HUMORAL IMMUNE RESPONSE 981
LUDU LUANDA, ANITA ADRIANA, ANITA D., TANASE OANA IRINA, LECOLLINET SYLVIE, SAVUTA GH
TESTING OF A NEW INDIRECT ELISA METHOD FOR THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF WEST NILE VIRUS INFECTION IN HORSES 987
MALIC LUMINITA, BOBUTAC MARIA NICOLETA, MORARU RAMONA
EVALUAREA EFECTULUI ANTIFUNGIC AL RADIAȚIILOR ULTRAVIOLETE DE TIP C ASUPRA BIOFILMELOR LEVURICE
EVALUATION OF ANTIFUNGAL EFFECT OF ULTRAVIOLET RADIATION TYPE C AGAINST FUNGAL BIOFILMS 991
MITRANESCU ELENA, TUDOR L. , FURNARIS F. C., TERBEA MARIANA, ROTARU ELENA, MITRANESCU D. F., SIMION VIOLETA
STUDY CONCERNING THE MONITORING OF ENVIRONMENTAL FACTORS' RADIOACTIVITY IN ARGES COUNTY 999

MOCUTA N., CHINDRIS V.
OBSERVATII PRIVIND PREZENTA OMG IN PROBELE DE SOIA. CONSIDERATII ETICE, RELIGIOASE SI JURIDICE IN BIOTEHNOLOGIE
OBSERVATIONS CONCERNING GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN SOJA: ETHICAL, RELIGIOUS AND LEGAL ASPECTS 1003
RAMONA MORARU, MARIANA GRECU , LUMINITA MALIC, A. IGNAT, MARIA BOBUTAC, V. NĂSTASĂ, M. MAREŞ
SUSCEPTIBILITY PROFILE ASSESSMENT OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM THE DIGESTIVE TRACT OF PIGS FROM INDUSTRIAL FARM 1007
ALINA MUNTEANU, A. GRĂDINARU, GH. SOLCAN
OBSERVAȚII PRIVIND PREZENȚA REZIDUURILOR DE PESTICIDE ORGANOCLORURATE ÎN LAPTE ÎN ZONA MOLDOVEI
OBSERVATIONS CONCERNING ORGANOCHLORINATED RESIDUES IN MILK, IN MOLDOVA REGION 1011
NEAGU IULIANA, CULEA C., TAPALOAGA DANA, TAPALOAGA P. R., PAUNESCU ILEANA, MARMANDIU A.
RESEARCHES REGARDING THE GENETIC HISTORY OF A ROMANIAN SPOTTED COW POPULATION 1014
NICORESCU ISABELA, CRIVINEANU MARIA
CERCETĂRI PRIVIND PREVALENȚA CAMPYLOBACTER SPP. ÎN CARCASELE DE BROILERI
RESEARCHES REGARDING THE PREVALENCE OF *CAMPYLOBACTER SPP.* IN BROILER CARCASSES ... 1017
NICULAE MIHAELA, SPINU MARINA, SANDRU CARMEN DANA, BRUDASCA F., PUSCAS LELIA, SCURTU I., SZAKACS BIANCA, MATES C. I., RINDT IULIA, TAUTAN M., NICULAE CATALINA, MOTOC NICOLETA
PROPRIETAȚILE ANTOMICROBIENE ALE UNOR PLANTE DIN FAMILIA LAMIACEAE ȘI APLICAȚIILE LOR POTENȚIALE IN TERAPIE
ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF SOME *LAMIACEAE* PLANTS AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS IN THERAPY – A REVIEW 1021
NICULAE MIHAELA, SPINU MARINA, SANDRU CARMEN DANA, BRUDAŞCĂ F., PUSCAS LELIA, SCURTU I., RINDT IULIA, SZAKACS BIANCA, CADAR D. , MATES C. I., TAUTAN M., NICULAE CATALINA, MOTOC NICOLETA, MOALE ROXANA
ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS ISOLATED FROM DOGS WITH OTITIS EXTERNA 1025
OBADA M. D., DUCA ELENA, VLAD – SABIE ALINA, CARP CARARE M.
ASPECTE EPIDEMIOLOGICE ALE EVOLUȚIEI TOXIINFECȚIILOR ALIMENTARE ÎN JUDEȚUL IAȘI ÎN PERIOADA 2004-2008
EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF FOOD POISONING IN IAŞI COUNTY DURING 2004-2008 1029
PAPASTERGIU D., RAPUNTEAN GH., OLELEU ANAMARIA, RAPUNTEAN S., PIVARIU N.
ASPECTE EPIDEMIOLOGICE PRIVIND PARATUBERCULOZA LA OVINE ŞI CAPRINE ÎN AREALUL JUDEȚULUI CLUJ
EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS REGARDING SHEEP AND GOATS PARATUBERCULOSIS IN THE CLUJ COUNTY 1036
PAPASTERGIU D., RAPUNTEAN GH., RAPUNTEAN S., NADAS G.
CONSIDERAȚIUNI PRIVIND REZERVOARELE NATURALE DE MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS ŞI ROLUL LOR ÎN EPIDEMIOLOGIA BOLI
CONSIDERATION REGARDING *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* NATURAL RESERVOIRES AND THEIR INVOLVMENT IN DISEASE EPIDEMIOLOGY 1043
PLATON I., VASIU C.
CERCETĂRI PRIVIND LEPTOSPIROZA LA SUINE ÎN JUDEȚUL BISTRIȚA – NĂSĂUD
RESEARCHES ON SUINE LEPTOSPIROSIS IN BISTRITA NĂSĂUD COUNTY 1051

PLATON I., VASIU C.
INVESTIGAȚII EPIDEMIOLOGICE ŞI CLINICO-MORFOPATOLOGICE ÎN LEPTOSPIROZĂ LA CABALINE ÎN JUDEȚUL BISTRIȚA–NĂSĂUD
EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICO-MORFOLOGICAL INVESTIGATIONS IN HORSE LEPTOSPIROSIS IN BISTRITA NĂSĂUD COUNTY 1059
POP FLAVIA
RESEARCH REGARDING THE INSTALLATION OF OXIDATIVE PROCESSES IN MILK FAT DURING REFRIGERATION STORAGE 1066
POP FLAVIA
RESEARCH ON ORGANOLEPTIC AND PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS OF ANIMAL FATS 1070
PUTIN V., MACARI V., GUDUMAC V.
ACTIVITATEA PSEUDOCOLINESTERAZEI ŞI NIVELUL SERIC AL GLUCOZEI ŞI UREEI LA PUII-BROILER TRATAȚI CU BIOR
PSEUDOCHOLINESTERASE ACTIVITY, BLOOD SERUM GLUCOSE AND UREA IN BROILER CHICKENS TREATED WITH BIOR 1074
RADOI I., STAICU ELENA, IONITA L., TUDOR N.
MICROCLIMATE PARAMETERS MONITORISATION IN A CLOSED CICLED FARM WITH PRDC 1078
RETEA C., IONITA L., ORASANU ADRIANA, RETEA GENICA
CERCETĂRI PRIVIND VARIAȚIA UNOR PARAMETRII AI MEDIULUI INTERN LA BOVINE ACHIZIȚIONATE DE PE PIAȚA UNIUNII EUROPENE ÎNTR-O FERMĂ DIN JUDEȚUL DOLJ
RESEARCH REGARDING THE VARIATION OF SOME BIOLOGICAL PARAMETHERS IN COWS PURCHEASED FROM THE EU – IN A FARM IN THE DOLJ COUNTY 1084
RIMBU CRISTINA, GUGUIANU ELEONORA, HORHOGEA CRISTINA, SINDILAR E. V., SCUTARIU RAMONA, CARP CARARE C., CARP CARARE M.
IMPLICAȚIILE SPECIEI PASTEURELLA MULTOCIDA ÎN LEZIUNI ORALE LA PISICĂ ŞI EXPRIMAREA CLINICĂ LA OM, ÎN PLAGĂ MUŞCATĂ
IMPLICATIONS OF SPECIES PASTEURELLA MULTOCIDA IN THE CAT ORAL LESIONS AND CLINICAL EXPRESSION OF HUMAN AT BITTEN PLAGUE 1089
RINDT IULIA KRISZTINA, SPINU MARINA, BRUDASCA F., NICULAE MIHAELA, SZAKACS BIANCA, KISS TIMEA, URICARU A., BIANU G. T.
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HONEY, HONEYDEW HONEY AND PROPOLIS FROM DIFFERENT REGIONS OF TRANSILVANIA AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS 1093
RINDT IULIA KRISZTINA, SANDRU CARMEN DANA, BRUDASCA F., NICULAE MIHAELA, KOBOLKUTI L., CADAR D., UNGVARI A., SPINU MARINA
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DIFFERENT PROPOLIS CONCENTRATIONS AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS STAINS ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS 1096
ROOSTITA L. BALIA, SRI MUDJIARTININGSIH, EMMIE ROSIANNIE, HENDRONOTO A.W. LENGKEY, WENDRY SETYADI P, KUSMAJADI SURADI, OBIN RACHMAWAN, ARIEF RUSFIAN GHANI, GEMILANG LARA U.S., CACA SUTEJA, DIAN ARFIANI
DETECTION OF PORK SPECIES CONTENT ON BEEF JERKY AND SHREDDED MEAT BY USING ENZYME IMMUNOASSAY TECHNIQUES 1099
LILIANA ROŞCA, MIHAI CARP- CĂRARE, PETRU ROŞCA, CRISTINA RÎMBU
ASPECTE PRIVIND INCIDENȚA ENTEROCOCILOR ÎN SURSELE DE APĂ UTILIZATE PENTRU ADĂPARE 1102
LILIANA ROŞCA, MIHAI CARP- CĂRARE, PETRU ROŞCA, ELEONORA GUGUIANU
OBSERVAȚII PRIVIND INCIDENȚA SPECIEI ESCHERICHIA COLI ÎN APELE UTILIZATE PENTRU ADĂPARE CONTAMINATE CU BACTERII COLIFORME TERMOTOLERANTE (COLIFORMI FECALI) 1106
ROSU M., FALCA C.
EFECTUL COMPARATIV AL SUPLIMENTĂRII HRANEI TINERETULUI PORCIN CU ANTIBIOTICE (TIAMUTIN), ŞI PROBIOTICE (BIO PLUS 2B)
COMPARATIVE EFFECT OF FOOD SUPPLEMENT YOUTH SWINE WITH ANTIBIOTICS (TIAMUTIN) AND PROBIOTICS (BIO PLUS 2B) 1111

ROTARU ELENA, TASBAC B., CIOBOTARU EMILIA, MITRANESCU ELENA, NICORESCU V.
ASPECTE CITOLOGICE ALE LAPTELUI IN INFECȚIILE INTRAMAMARE LA VACĂ
CYTOLOGICAL ASPECTS OF MILK IN INTRAMAMMARY INFECTIONS IN COW 1115
ROTARU ELENA, POP ANETA, FAFANEATA CORNELIA, MITRANESCU ELENA, TASBAC B.
MODIFICĂRI CANTITATIVE ALE UNOR COMPONENTE BIOCHIMICE DIN COLOSTRUL DE OAIE RAPORTATE LA FACTORUL TIMP
TIME-RELATED QUANTITATIVE CHANGES OF SOME BIOCHEMICAL COMPONENTS OF SHEEP COLOSTRUM 1123
RUS V., MICLAUS V., CADAR D., NADAS G., GAL A.
EFECTUL FACTORILOR STRESANȚI ASUPRA TIMUSULUI LA TINERETUL BOVIN ACHIZIȚIONAT PENTRU SACRIFICARE ÎN ABATOR
EFFECT OF SOME STRESS FACTORS ON THYMUS OF YOUTH CATTLE 1127
RUS V., MICLAUS V., SPINU MARINA, CADAR D.
DOVEZI HISTOLOGICE ALE INFLUENȚEI UNUI VACCIN VIU INTERMEDIAR PLUS ANTI BURSITĂ INFECȚIOASĂ ASUPRA BURSEI LUI FABRICIUS LA PUII BROILERI 1131
HISTOLOGICAL ASSESMENT OF THE INFLUENCE OF A LIVE ANTIINFECTIOUS BURSITIS ON FABRICIUS BURSA IN BROILER CHICKENS
SERBU ELENA, TANASE OANA IRINA, PAVLI C., PERIANU T.
CERCETĂRI PRIVIND BURSITA INFECȚIOASĂ ÎN CONDIȚIILE CREŞTERII EXTENSIVE, GOSPODĂREŞTI
RESEARCHES ON BURSAL DISEASE UNDER EXTENSIVE BREEDING CONDITIONS 1135
SIMEANU D., GAVRILAS ANGELA, SIMEANU CRISTINA
STUDIU ASUPRA PRODUCȚIEI DE OUĂ OBȚINUTĂ DE LA GĂINI REGENERATE FIZIOLOGIC (I)
STUDY ON THE EGG PRODUCTION ACHIEVED BY THE PHISIOLOGICALLY RECOVERED HENS (I) 1142
SIMEANU D., GAVRILAS ANGELA, SIMEANU CRISTINA
STUDIU ASUPRA PRODUCȚIEI DE OUĂ OBȚINUTĂ DE LA GĂINI REGENERATE FIZIOLOGIC (II)
STUDY ON THE EGG PRODUCTION ACHIEVED BY THE PHISIOLOGICALLY RECOVERED HENS (II) 1149
SPINU MARINA, GIURGEA RODICA, SANDRU CARMEN DANA, BRUDASCA F., NICULAE MIHAELA, CADAR D., KOBOLKUTI L., SZAKACS BIANCA
EFECTELE UNOR EXTRACTE VEGETALE ASURA EVOLUȚIEI BURSEI ŞI A METABOLISMULUI BURSAL
EFFECT OF SOME VEGETAL EXTRACT ON EVOLUTION AND METABOLISM OF FABRICIUS BURSA ... 1155
SPINU MARINA, GIURGEA RODICA, SANDRU CARMEN DANA, BRUDASCA F., NICULAE MIHAELA, CADAR D., KOBOLKUTI L., SZAKACS BIANCA
CORELAȚII MORFO-FUNCȚIONALE LA NIVELUL TIMUSULUI PUILOR DE GĂINĂ TRATAȚI CU EXTRACTE VEGETALE
MORFOFUNCTIONAL CORRELATIONS ON CHICKENS THYMUS AFTER TREATMENT WITH VEGETAL EXTRACTS 1161
STARCIUC N., SPATARU T., SCUTARU I., OSADCI NATALIA
NIVELUL TITRELOR DE ANTICORPI ŞI INDEXUL BURSEI FABRICIUS LA PUII VACCINAȚI CONTRA BURSITEI INFECȚIOASE CU TULPINELE BG, WINTERFIELD 2512 ŞI D-78
ANTIBODIES CONCENTRATION AND FABRICIUS BURSA INDEX IN CHICKENS AFTER IMMUNIZATION WITH STRAINS WINTERFIELD 2512 AND D-78 1166
STREJA ADRIANA, AVRAM EUGENIA, MIHAILA S., CARP CARARE M.
CERCETĂRI PRIVIND VACCINAREA CU VACCIN VIU NOBILIS MG 6/85 ,CONTRA MICOPLASMOZEI RESPIRATORIE AVIARE ÎN EFECTIVE DE TINERET DE REPRODUCȚIE RASE GRELE
RESEARCH REGARDING USE OF LIVE NOBILIS 6/85 VACCINE AGAINST RESPIRATORY AVIAN MYCOPLASMOSIS IN BREEDING FLOCKS 1169

STRUGARU OANA RALUCA, VELESCU ELENA, RADU P. G.
CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ŞI MORFOCLINICE, ÎNTR-UN FOCAR DE ECTIMĂ CONTAGIOASĂ LA CAPRE
MORPHOLOGIC, EPIDEMIOLOGIC AND MORPHOCLINIC ASPECTS FROM AN OUTBREAK ECTYMA CONTAGIOSUM IN GOATS..... 1173
SZAKACS BIANCA, SPINU MARINA , POP MONICA, SZAKACS A. R., RINDT KRISZTINA, NICULAE MIHAELA
EVALUAREA COMPARATIVĂ A ACTIVITĂȚII IMUNE NESPECIFICE MEDIATE CELULAR LA BOVINE ŞI COPII BOLNAVI DE TUBERCULOZĂ
COMPARATIVE EVALUATION OF CELL MEDIATED IMMUNITY IN CATTLE AND CHILDREN WITH TUBERCULOSIS..... 1177
SZAKACS BIANCA, SPINU MARINA, SZAKACS A. R., RINDT KRISZTINA, NICULAE MIHAELA
REACTIVITATEA IMUNĂ SPECIFICĂ ANTI-MYCOBACTERIUM BOVIS MEDIATĂ CELULAR LA BOVINE REAGENTE
SPECIFIC CELL MEDIATED IMMUNE REACTIVITY AGAINST MYCOBACTERIUM BOVIS IN CATTLE..... 1182
TANASE OANA IRINA, PAVLI C., PERIANU T.
CERCETĂRI PRIVIND CORELATIA DINTRE TESTUL ELISA ŞI CEL DE IMUNOFLUORESCENTĂ LA PORCII CU SINDROM REPRODUCTIV ŞI RESPIRATOR
RESEARCHES REGARDING CORRELATION OF ELISA ASSAY WITH THE IMMUNOFLUORESCENCE ONE IN PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS)..... 1185
TAPALOAGA DANA, NEAGU IULIANA, CULEA C., TAPALOAGA P. R., PAUNESCU ILEANA, MITRANESCU ELENA, MARMANDIU A.
RESEARCHES REGARDING MEAT PARAMETERS IN SHEEP POPULATION REARED IN STALLING AND PASTURES 1189
TIBRU, I., CHIRILA, D. RADUCANU ANDRADA
THE IMPORTANCE OF THE FLOOR FOR THE LACTATION COWS' COMFORT..... 1193
ȚIBRU I., CERNA D., BARNA ABRAHAM
HOG CARCASS DECONTAMINATION WITH LACTIC ACID 1196
TUDOR L.,TOGOE I., FLOREA ALISA NICOLETA, MITRANESCU ELENA, TUDOR ANETA LAURA
INVESTIGATIONS ABOUT THE PATHOGENITYOF BACILLUS CEREUS STRAINS 1202
TUDOR L., TOGOE I., TUDOR ANETA LAURA, ILIE I. L.
THE DETECTION OF YERSINIA ENTEROCOLITICA STRAINS IN MILK USING RT-PCR TECHNIQUE..... 1207
VELESCU ELENA, SAVUTA GH., TANASE OANA IRINA, PAVLI C., ANITA ADRIANA, ANITA D., PLESCA R., BEJENARU ANA, STRUGARU OANA RALUCA, RADU P. G.
STUDIU DE CAZ: MAMITA GANGRENOASĂ LA CAPRĂ
CASE STUDY: MASTITIS GANGRENOUS AT GOAT 1212
VLAD - SABIE ALINA, RIMBU CRISTINA, OBADA M. D., CARP CARARE M.
APRECIEREA CALITĂȚII IGIENICE A CARCASELOR DE MIEI SACRIFICAȚI ÎN SISTEM GOSPODĂRESC
QUALITY CONTROL OF LAMB CARCASSES SLAUGHTERED IN THE TRADITIONAL SYSTEM 1216
VOLOSENIUC M., CRETU CARMEN, RIMBU CRISTINA, CARP CARARE C.
CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA AFECȚIUNILOR GENITALE, MAMARE ŞI ACROPODIALE ASUPRA CALITĂȚII NUTRITIVE A LAPTELUI LA BOVINE.
RESEARCHES REGARDING THE INFLUENCE OF GENITAL MAMMARY AND ACROPODIAL DISEASES ON QUALITY NUTRITIONAL OF DAIRY COWS MILK..... 1220
VOLOSENIUC M., CRETU CARMEN, RIMBU CRISTINA, CARP CARARE C.
INFLUENȚA AFECȚIUNILOR GENITALE, MAMARE ŞI ACROPODIALE ASUPRA CALITĂȚII IGIENICE LAPTELUI LA BOVINE.
THE INFLUENCE GENITAL, MAMMAR AND ACROPODIAL AFEECTIONS ON HYGIENIC QUALITY OF RAW MILK FROM DAIRY COWS 1222

SIBECHE GABRIELA, RÎMBU CRISTINA, CARP-CĂRARE C., CREȚU CARMEN, CARP-CĂRARE M.
IDENTIFICAREA SEROLOGICĂ A BIOTIPURILOR DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, IZOLATE DE PE CARCASE DE BOVINE, OVINE, PORCINE ŞI PĂSĂRI
SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF BIOTYPES OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATED FROM CARCASSES OF CATTLE, SHEEP, SWINE AND POULTRY 1226

SCREENING EPIDEMIOLOGIC ASUPRA EVOLUȚIEI CRIPTOSPORIDIOZEI ÎN ASOCIERE CU ALȚI ENTEROPATOGENI LA VIȚEI, ÎN PARTEA DE VEST A ROMÂNIEI

EPIDEMIOLOGYCAL SCREENING OF THE EVOLUTION OF CRYPTOSPORIDIOSIS IN ASSOCIATION WITH OTHER ENTEROPATHOGENS AT CALVES IN WESTERN ROMANIA

K. IMRE, GH. DĂRĂBUŞ, I. OPRESCU, S. MORARIU, NARCISA MEDERLE, M. S. ILIE, IONELA HOTEA, A. BALINT, D. INDRE, MIRELA PALCA
Facultatea de Medicină Veterinară Timişoara;
kalman_imre27@yahoo.com

In this paper are presented the results of an epidemiological study using ELISA technique, for the prevalence of cryptosporidiosis in association with other entheropathogens. The study was carried out in Western Romania on a number of 308 calves. These investigations showed a prevalence of 44% for cryptosporidiosis, 15,8% for rotavirosis, 9,6% for coronavirosis and 7% for bovine colibacilosis determined by E. coli F5 enteropathogen.

Key words: epidemiology, criptosporidiosis, enteropathogens, ELISA;

Criptosporidiile sunt coccidii cu o largă specificitate de gazdă, cu localizare digestivă sau respiratorie, fiind puse în evidență la numeroase specii de vertebrate, inclusiv la om [4].

Sindromul de diaree neonatală la rumegătoarele mari şi mici reprezintă un exemplu de boală polifactorială, determinată de o serie de factori legați de animal, de condițiile de mediu din adăpost şi de varietatea de virusuri, bacterii şi paraziți protozoari [5].

Problemele digestive apărute între vârsta de patru zile şi şase săptămâni se datorează, în mare parte, infecției cu diferite specii de criptosporidii (*C. parvum, C. andersoni, C. bovis*- fostul genotip bovin de tip B,) şi/sau al unor varietăți de virusuri cum ar fi: rotavirusuri, coronavirusuri, virusul diareei virale bovine (BVD), aceştia fiind agenții etiologici cel mai frecvent implicați. Sub vârsta de trei zile gastroenterita neonatală bovină este determinată de *E. coli F5* enterotoxigen şi apare în principal la indivizii imunosupresati [6, 12].

Lipsa unor preocupări asupra criptosporidiozei la viței in partea de vest a României, în condițiile in care cercetările avansează vertiginos pe plan mondial, au condus la efectuarea acestui studiu epidemiologic.

MATERIALE ŞI METODĂ

Investigațiile au fost efectuate în perioada ianuarie 2007-decembrie 2008, pe un efectiv de 308 de viței cu vârste cuprinse între o zi şi şase luni, din 25 de localități ale județelor Arad, Bihor, Caraş-Severin şi Timiş. Vițeii au provenit din ferme mari de vaci de lapte, microferme şi gospodării ale populației, din diferite zone ale județelor menționate mai sus. Pentru cunoaşterea aspectelor epidemiologice ale criptosporidiozei în asociere cu alți enteropatogeni (rotavirusuri, coronavirusuri, *E. coli F5*) pentru fiecare animal examinat s-au întocmit fişe individuale care cuprindeau: numărul matricol (la cele existente), rasă, vârstă şi sex. Materiile fecale diareice au fost recoltate individual, direct din rect, depozitate în coprocultoare la o temperatură de 4ºC şi prelucrate în decurs de 24 de ore.

Probele recoltate au fost examinate prin tehnica ELISA utilizând kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro" din fecale de bovine şi respectă principiile tehnicii ELISA dublu – sandwich

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele cercetărilor privind ponderea infecţiilor cu criptosporidii în asociere sau nu cu alţi trei enteropatogeni la tineretul bovin din zona de vest a României sunt prezentate sintetic în tabelul 1. Evoluţia celor patru enteropatogeni, precum şi procentul probelor negative în judeţele investigate sunt reprezentate în figura 1.

Infecţii cu criptosporidii ca unici agenţi patogeni au fost semnalate în toate cele patru judeţe în care s-au făcut investigaţii în procente diferite de la 17,5% (judeţul Timiş) până la 48% (judeţul Arad).

Rotavirusurile ca unici agenţi patogeni au fost diagnosticate de asemenea în toate judeţele în care s-au făcut investigaţii (tabel 1). Cel mai ridicat procent de infecţie a fost semnalat în judeţul Bihor, unde 15% dintre viţeii investigaţi eliminau prin fecale doar rotavirusuri.

Coronavirusul enteric bovin ca şi monoinfecţie a fost diagnosticat în judeţele Arad (2%) şi Bihor (3,8%) fie singur fie asociat. Infecţii cu *E. coli* F5 au fost semnalate numai în judeţul Timiş având prevalenţa cea mai mică dintre enteropatogenii investigaţi.

În cazul infecţiilor mixte, s-au găsit asocieri între: criptosporidii şi rotavirusuri (5,2%), criptosporidii şi coronavirusuri (6,8%), criptosporidii şi *E. coli* F5 (0,3%) respectiv între rotavirusuri şi coronavirusuri (0,9%). Într-un singur caz (0,3%), în judeţul Timiş, s-au înregistrat infecţii mixte cu trei enteropatogeni (vezi tabel 1).

Pe ansamblu, studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA, cu privire la ponderea agenţilor enteropatogeni implicaţi în producerea diareilor la viţei în judeţele vestice ale României, arată că:

Cryptosporidium spp. a fost identificat la un număr de 136 probe din 308 analizate (97 de cazuri ca agent patogen unic şi 39 cazuri asociat);

- coronavirusurile au fost întâlnite în fecalele a 30 viţei din 308 examinate (cinci cazuri ca agent patogen unic şi 25 cazuri asociat);
- rotavirusurile au fost găsite la 49 probe din 308 analizate (29 cazuri ca agent patogen unic şi 20 cazuri asociat);

E. coli F5 enteropatogen a fost identificat în fecalele a doi viţei din 308 examinate (într-un singur caz ca agent patogen unic şi un caz asociat).

Cu privire la evoluţia criptosporidiozei în asociere cu alţi enteropatogeni rezultate comparative efectuate în diferite arii geografice sunt prezentate în cele ce urmează.

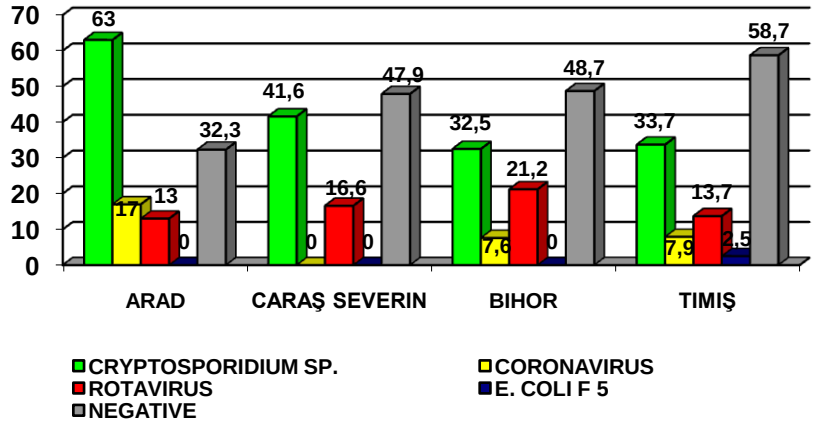


Fig. 1. Reprezentarea grafică a ponderii celor patru enteropatogeni pe judeţe în partea de vest a României

Acest studiu demonstrează că, *Cryptosporidium* spp. a fost cel mai prevalent agent enteropatogen (44,1 %) la viţeii sub vârsta de şase luni în cele patru judeţe din partea de vest a României

Tabel 1 - Sinopticul probelor positive la kitul BIO K 151 în cele patru judeţe vestice la bovine

Judeţ	Nr. Probe	Probe pozitive																		Negative	
		Cry. sg		Rota. sg		Corona. sg.		*E. coli* F5 sg.		*Cry.* + Rota		*Cry.* + Corona.		*Cry.* + *E. coli* F5		Rota. + Corona.		*Cry.*+ Rota.+ Corona.			
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Arad	100	48	48	7	7	2	2	0	0	3	3	12	12	0	0	3	3	0	0	25	25
Bihor	80	18	22,5	12	15	3	3,8	0	0	5	6,2	3	3,8	0	0	0	0			39	48,7
Caraş – Severin	48	17	35,4	5	10,4	0	0	0	0	3	6,2	0	0	0	0	0	0	0	0	23	47,9
Timiş	80	14	17,5	5	6,2	0	0	1	1,2	5	6,2	6	6,7	1	1,2	0	0	1	1,2	47	58,7
Total	**308**	**97**	**31,4**	**29**	**9,4**	**5**	**1,6**	**1**	**0,3**	**16**	**5,2**	**21**	**6,8**	**1**	**0,3**	**3**	**0,9**	**1**	**0,3**	**134**	**43,5**

Legendă: *Cry-Cryptosporidium* spp., Rota-rotavirus, Corona.-coronavirus, *E.- Escherichia,* sg.- singur

Procentul total de detectare a *Cryptosporidium* spp. tinde spre valorile obţinute de de la Fuente şi col. (1998b) în centrul Spaniei (52, 3%) care au făcut investigaţii epidemiologice la tineretul bovin în prima lună de viaţă [7]. În Germania, la viţeii sub trei săptămâni de viaţă, Otto şi col. (1995) găsesc o pozitivitate de 52,5%, procent care se apropie destul de mult de pozitivitatea găsită de noi [14].

În Spania cercetările lui García şi col. (2000) scot în evidenţă o pozitivitate mult mai mare pentru *Cryptosporidium* spp. (85,2 %) decât cea indicată în acest studiu [9]. Rata de detecţie a infecţiei cu criptosporidii găsită de noi este mult mai mare decât cea găsită de Reynolds şi col. (1986) (14%), Snodgrass şi col. (1986) (14%), Abraham şi col. (1992) (0%) J. Quílez şi col. (1996) (19,7%) sau Pérez şi col. (1997) (11%) [1, 15, 16, 17, 18].

Unii autori în urma cercetărilor efectuate, au ajuns la concluzia că, rotavirusul ar fi cel mai prevalent agent al diareei la viţei.

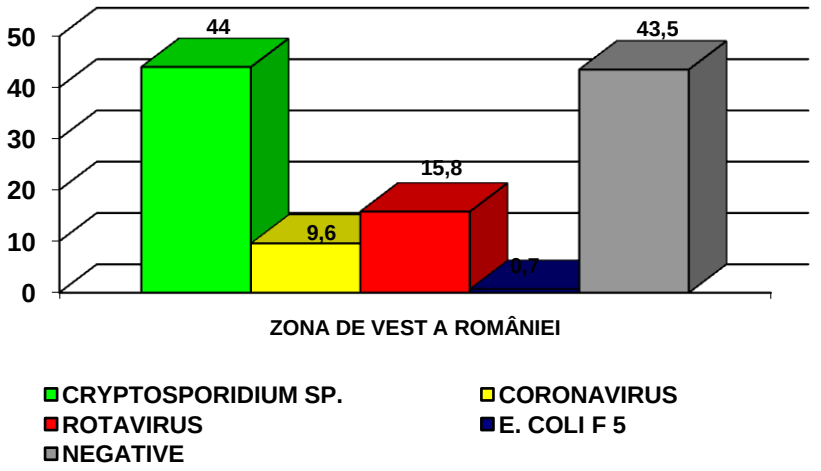


Fig. 2. Reprezentarea grafică a ponderii celor patru enteropatogeni în partea de vest a României

Procentul de infecţie cu rotavirus găsit de noi (15,8%) este mult mai mic decât cel găsit de Solana şi col. (1985) (43,6%) în Spania, de Fagan şi col. (1995) (38,9%) în Irlanda, de Brenner şi col. (1993) (41,4%) în Israel respectiv de De la Fuente şi col. (1998a) 42,7% în Spania [3, 6, 8, 19].

Valori mai apropiate de ale noastre au fost semnalate de Abraham şi col. (1992) în Ethiopia (16,7 %), García şi col. (2000) în Spania (20,4%) respectiv de Pérez şi col. (1997) (7%) la viţeii cu diaree în cantonul Tilarán (Costa Rica) [1, 9, 15].

Infecţii cu *E. coli* F5 (K99) au fost semnalate în fecalele diareice ale viţeilor într-un procent de 0,7. Într-o lucrare, de la Fuente şi col. (1998a) semnalează sensibilitatea redusă a kitului ELISA (Tetravalent) (28,6%) în identificarea tulpinii *E. coli* F5 faţă de cultura bacteriană (97,4%). Acest fapt ar explica în parte slaba prevalenţă a infecţiei cu *E. coli* F5 în prezentul studiu [6].

Un procent de 43,5 din fecalele analizate au fost negative pentru cei patru enteropatogeni. Această valoare coincide cu negativitatea găsită de alţi autori [2, 11]. În asemenea situaţii, pe lângă cei patru enteropatogeni pentru care s-au făcut investigaţii, în etiologia diareii ar mai putea fi implicaţi în special calicivirusurile, Breda virusul, *Salmonella* spp. sau Torovirusurile [6, 15]. Infecţii mixte între *Cryptosporidium spp.* şi rotavirusuri au fost semnalate într-un procent de 5,1%. În cazul nostru cea mai frecventă asociaţie a fost între criptosporidii şi coronavirusuri (6,1%). Acest lucru este în contradicţie cu rezultatele publicate în majoritatea studiilor din întreaga lume care susţin că, cea mai comună infecţie mixtă ar fi între *Cryptosporidium spp*. şi rotavirusuri.

Neidentificarea corona- şi rotavirusurilor în fermele din judeţul Caraş - Severin în care se practică vaccinarea, demonstrează eficacitatea vaccinului şi protecţia oferită de acesta în primele trei luni de viaţă.

Pe baza acestui studiu se poate spune că, de departe, criptosporidiile, în cele patru judeţe vestice ale României, sunt cei mai frecvenţi enteropatogeni ce produc diareile la viţei. Pe lângă infecţia cu *Cryptosporidium* spp., rotavirusurile, coronavirusurile şi *E. coli* F5 contribuie de asemenea la morbiditate, singure sau în infecţii asociate.

CONCLUZII

1. Investigaţiile epidemiologice efectuate la bovinele din patru judeţe vestice ale României scot în evidenţă o prevalenţă de 44% pentru criptosporidioză, 15,8% pentru rotaviroză, 9,6% pentru coronaviroză respectiv 0,7% pentru colibaciloza bovină determinată de *E. coli* F5 enteropatogen.

MULŢUMIRI

Lucrarea a fost realizată pe baza unui grant (nr. 7/102) obţinut de către drd. Kálmán Imre din partea CNCSIS.

BIBLIOGRAFIE

2. **Abraham, G., Roeder, P.L., Roman Zewdu,** 1992. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. J. Tropical Animal Health and Production, 24, 1573-1589.
3. **Bellinzoni, R.C., Blackhall, J., Terzolo, H.R., Moreira, A.R., Auza, N., Mattion, N., Michedo, G.L., la Torre, J.L., Scodeller, E.A.,** 1990. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 22, 130-137
4. **Brenner, J., Elad, D., Markovics, A., Grinberg, A., Trainin, Z.,** 1993. Epidemiological study of neonatal calf diarrhoea in Israel-a one-year survey of faecal samples. Isr. J. Vet. Med. 48, 113-116
5. **Dărăbuş, Gh.,** 1996. Criptosporidioza: cercetări privind etiologia, epidemiologia, patogenia, diagnosticul şi tratamentul în infecţiile naturale şi experimentale., Teză de doctorat, Facultatea de Medicină Veterinară – Timişoara
6. **de Graaf, C.D., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E.,** 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. Int. J. Parasitol., 29, 1269-1287.
7. **de la Fuente, R., Luzón, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., García, A., Cid, D., Orden, J.A., García, S., Sanz, R., Gómez-Bautista, M.,** 1998. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-days-old diarrheic dairy calves in central Spain. Vet Parasitol. 80, 179-185.
8. **de la Fuente, R., García, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Luzon, M,, Cid, D., Garcia, S., Orden, J.A., Gomez-Bautista, M.,** 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. Preventive Veterinary Medicine 36, 145-152.
9. **Fagan, J.G., Dwyer, P.J., Quinlan, J.G**., 1995. Factors that may affect the occurence of enteropathogens in the faeces of diarrhoeic calves in Ireland. Irish Vet. J. 48, 17-21.

10. **Garcia, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Orden, J.A., Cid, D., Sanz, R., Gómez-Bautista, M., de la Fuente, R.,** 2000. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. Comp. Immun. Microbiology & Inf. Diseases. 23, 175-183.
11. **Martín, S., Ortega, L.M., Pilar, M., Rojo, F.A., Pereira, J.,** 1995. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en terneros en la provincía de León. IV Congreso Ibérico Parasitología, Santiago de Compostella, Spain, pp. 118-119.
12. **Mc Donough, S.P., Stull, C.L., Osburn, B.I.,** 1994. Enteric pathogens in intensively reared veal calves. Am. J. Vet. Res. 55, 1516-1520
13. **Moga, M.R.,** 2001. Boli produse de *E. coli*. In Moga M.R. (ed): Boli infecţioase ale animalelor – Bacterioze, Ed. Brumar, Timişoara, pp. 1-25.
14. **Moore, D.A., Zeman, D.H**., 1991. Cryptosporidiosis in neonatal calves: 277 cases (1986-1987). J. Am. Vet. Med. Assoc., 198, 1969-1971.
15. **Otto, V.P., Elschner, M., Günthner, H., Schulze, F.,** 1995. Vergleichende Untersuchungen yum nachweis von Rotaviren, Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxigen *E. coli* im Kot durchfallkranker Kälber. Tierärztl Umschau 50, 80-86
16. **Pérez, E., Kummeling, A., Janssen, M.M.H., Jiménez, C., Alvarado, R., Caballero, M., Donado, P., Dwinger, R.H.,** 1997. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilárán, Costa Rica. Preventive Veterinary Medicine 33 195-205
17. **Quilez, J., Sánchez-Acebo, C., del Cacho, E., Clavel, A., Causapé, A.C.**, 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). Vet Parasitol. 66, 139-146
18. **Reynolds, D.J., Morgan, J.H., Chanter, N., Jones, P.W., Bridger, J.C., Debney, T.G., Bunch, K.J**., 1986**.** Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. Vet. Rec. 119, 34-39.
19. **Snodgrass, D.R., Terzolo, H.R., Sherwood, D., Campbell, I., Menzies, J.D., and Synge, B.A**., 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. The Veterinary Record 119, 31-34 .
20. **Solana, A., Gómez-Tejedor, C., Marcotegui, M.A,, Castro, J.M.,** 1985. Diarrea de los terneros. Estudio preliminar de la incidencia de rotavirus en España. Med. Vet. 2, 299-304

SINDROMUL DE ŞOC TOXIC FATAL ÎN URMA INFECŢIEI CU STREPTOCOCCUS CANIS LA PISICĂ: PREZENTARE DE CAZ

TOXIC SHOCK SYNDROME IN STREPTOCOCCUS CANIS INFECTION IN CAT. CASE STUDY

TIMEA KISS, L. KŐBŐLKUTI, C. POPOVICI*, D. CADAR, A. URICARU, MIHAELA NICULAE
Facultatea de Medicină Veterinară, USAMV Cluj-Napoca
timcyke@yahoo.com

A seven months old European tomcat was presented to a veterinary consultation because the owner noticed a small nodule on his upper left lip. Local and systemic anti-infectious therapy was started immediately, and the efficacy of the antibiotics used was verified by performing an antibiotic susceptibility test. In spite of the treatment, the lesions progressed rapidly, becoming deep ulcers that reached the bone. The general condition of the patient also deteriorated, after the initial feverish reaction, the temperature dropped below normal, and after a 6 day course, the disease had a fatal outcome. Gross lesions indicated toxic shock/septicemia as the cause of death. Cultures from the organs and bone marrow revealed a heavy growth of Streptococcus canis, identified using the API 20 Strep system (BioMerieux, France).

Key words: Streptococcus canis, septicemia, cat

Streptococcus canis face parte din grupa serologică Lancefield G de streptococi β-hemolitici, împreună cu *S. anginosus* şi *S. dysgalactiae ssp. equisilmilis*, izolate de la om. Specia *S. canis* a fost descrisă pentru prima dată de Devriese şi colab. în 1986 şi este considerată ca făcând parte din flora epifită a pielii şi mucoaselor la animale domestice, în special câini şi pisici, cu potenţial patogen la om (Bert, 1997). Totuşi în unele situaţii poate duce la infecţii oportuniste, la pisici manifestate mai ales ca artrite, suprainfecţii ale rănilor, septicemie şi şoc toxic (Lyskova, 2007). Au fost raportate chiar şi evoluţii enzootice ale unor forme grave de fasciită necrozantă la pisici întreţinute în colectivităţi mari, cu o mortalitate de 30 %. Nu a fost demonstrată prezenţa în aceste episoade a unor suşe deosebit de virulente de *Streptococcus canis* faţă de cele implicate în alte afecţiuni (Bert, 1997).

MATERIAL ŞI METODĂ

Un motan în vârstă de 7 luni, de rasă europeană, cu o greutate de 3,1 kg, a fost prezentat la consultaţie din cauza unei formaţiuni nodulare la nivelul buzei superioare stângi. Examenul clinic general nu a relevat modificări majore, apetitul era prezent, temperatura corporală în limite normale. Examenul intern al cavităţii bucale a relevat un ulcer de dimensiuni reduse pe faţa internă a buzei, corespunzător formaţiunii nodulare. Tratamentul instituit a constat în aplicarea de Germostop bucal (S.C. Pasteur) de trei ori pe zi şi administrarea pe cale generală de amoxicilină şi acid clavulanic (Synulox, RTU) în doză de 14 mg amoxicilină/kc, respectiv 3,5 mg acid clavulanic/kc (0,3 ml), i.m., o dată pe zi.

După două zile, formaţiunea crescuse în volum şi fistulizase în exterior, lăsând să se scurgă un puroi gălbui, cremos, amestecat cu strii de sânge. Temperatura era în limite normale, dar proprietarul a descris animalul ca fiind uşor abătut. Cavitatea rămasă a fost supusă toaletei mecanice şi apoi a fost aplicat un amestec de Rivanol şi pulbere de rifampicină. Cu acestă ocazie a fost recoltată şi o probă cu tampon steril, fără mediu de transport, pentru antibiogramă. Nu s-a făcut examen bacterioscopic; antibiograma a fost efectuată pe agar nutritiv, iar citirea efectuată la 24 de ore de la însămânţare a indicat sensibilitate la enrofloxacină, amoxicilină cu acid clavulanic. Conform acestor rezultate, s-a continuat tratamentul descris.

Peste alte două zile starea generală a motanului se deteriorase, apetitul era absent, iar la examenul general s-a constatat o deshidratare de ~8%, temperatura rectală având o valoare de 39,0° C. Ulcerul de la nivelul buzei superioare se mărise considerabil, atât ca întindere cât şi ca profunzime; au fost observate alte două formaţiuni nodulare pe partea dreaptă, una pe buza superioară, iar celalaltă la nivelul buzei inferioare; mucoasa lingual era de asemenea ulcerată. S-a continuat tratamentul local cu amestec de Rivanol şi pulbere de rifampicină şi Germostop cicatrizant (A&S), cele două formaţiuni nou observate au fost drenate, iar pe cale generală s-a trecut la administrarea de cefquinome (Cobactan, Intervet Schering-Plough) în doză de 6mg/kc de două ori pe zi, i.m.; de asemenea, a fost instituită şi terapia de susţinere cu Ringer lactat, glucoză 5%, şi complex vitaminic. În plus, pe leziunile din interiorul cavităţii bucale a fost aplicată glicerină boraxată 10%.

În cursul zilei următoare temperatura rectală a atins valori de 40,0°C, respiraţia devenind dispneică. Tratamentul local şi cel general antiinfecţios şi de susţinere a rămas acelaşi, şi s-a recoltat o nouă probă pentru testarea sensibilităţii la antibiotice. De această dată recoltarea s-a făcut cu tampon steril în tub cu mediu de transport, iar ca şi mediu de cultură a fost folosit agarul cu glucoză. După alte 24 de ore, starea generală a animalului a fost foarte gravă, cu dispnee severă, iar temperatura rectală a scăzut la 37,4°C. Pe baza noilor rezultate de laborator, care au indicat sensibilitate la penicilină, s-a început administrarea de penicilină G sodică i.v. în doză de 40000 UI/kc, dar la câteva ore după administrare, pacientul a decedat.

Examenul necropsic a fost efectuat în aceeaşi zi.

În cursul necropsiei au fost prelevate probe pentru examen bacteriologic (abcesele cutanate, laringele, un lob hepatic, splina, femur nedeschis), din care s-au făcut însămânţări pe câte două medii solide (agar cu glucoză şi agar cu sânge de oaie 5%), şi pe câte un mediu lichid selectiv pentru streptococi, conţinând azidă. De asemenea s-au efectuat amprente din organe şi frotiuri din culturi, care au fost colorate prin metoda Gram. Caracterele biochimice ale coloniilor obţinute pe agarul cu glucoză au fost testate cu sistemul API 20 Strep (BioMerieux, Franţa).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Examenul necropsic a relevat următoarele leziuni: colecţie sero-hemoragică în cavităţi, limfonoduli edematoşi, congestionaţi, laringită purulentă, zone cu edem gelatinos şi peteşii în ţesutul conjunctiv subcutanat, pe seroase şi pe mucoasa gastrică şi intestinală, congestie, edem şi hemoragii pulmonare, degenerescenţă hepatică şi renală. La nivelul primului premolar superior stâng, la rădăcina dintelui, osul era macerat şi era prezentă o colecţie purulentă; este posibil ca acest abces dentar să fi fost punctul de plecare al infecţiei. Diagnosticul necropsic a fost de insuficienţă cardiorespiratorie consecutivă şocului toxic. Din motive obiective, examenul histopatologic nu a putut fi efectuat.

În 24 de ore, pe toate mediile solide însămânţate cu probe recoltate la necropsie, s-a observat formarea unor colonii de dimensiuni mici, de tip S, translucide; pe agarul cu sânge s-a observat o hemoliză de tip β. Mediile lichide au prezentat o turbiditate moderată. Frotiurile efectuate din mediile de cultură şi colorate Gram au confirmat prezenţa streptococilor. Profilul API citit în urma incubării a fost 0373405, ceea ce indică prezenţa lui *Streptococcus canis* cu o precizie de 99,9%.

În episoadele de infecţie cu *S. canis*, descrise în literatura de specialitate, au fost identificate două forme clinice majore. Primul tablou simptomatologic este caracterizat de ulcere cutanate şi infecţie respiratorie cronică, care a progresat în unele cazuri complicându-se cu sinuzită necrotică şi meningită. Cea de-a doua formă este reprezentată de fasciită necrozantă cu ulceraţii cutanate, localizate în special la nivelul membrelor posterioare, ce evoluează rapid spre şoc toxic, septicemie şi moarte (Pesavento, 2007; Sura, 2008). Cazul descris mai sus pare a fi o combinaţie dintre cele două forme de manifestare, evoluţia sa cuprinzând leziuni cutanate localizate exclusiv la nivelul capului (flegmoane, ulceraţii) şi afectarea aparatului respirator, dar şi septicemie cu o evoluţie rapidă şi

deznodământ fatal. Nu au fost realizate investigații pentru identificarea unei stări de imunosupresie sau infecții virale latente preexistente care să explice agresivitatea deosebită manifestată în acest caz de germenul în mod obişnuit epifit.

Deşi există numeroase raportări în literatură a unor enzootii produse de *Streptococcus canis*, respectiv streptococi din grupa G, mai ales în cazul pisicilor menținute în colectivități mari (animale de laborator, adăposturi) (Tillman, 1982; Pesavento, 2007), cu contagiozitate ridicată în unele episoade (Tillman, 1982), alte două pisici care coabitau cu motanul afectat, nu au prezentat nici un simptom de boală în ciuda faptului că hrana şi apa le-au fost oferite în acelaşi vas de către proprietar, cel puțin în primele zile de la debutul bolii. Pisicile au fost urmărite în continuare, rămânând clinic sănătoase, ceea ce indică o contagiozitate redusă a suşei bacteriene implicate în acest caz şi face foarte probabilă existența unei imunosupresii cel puțin moderate la animalul afectat.

Fig. 1. *Ulcere profunde şi fistule la nivelul cavității bucale; mucoasa lingual ulcerată, acoperită cu exudat purulent*

Fig.2. *Aspectul ulcerului profound de la nivelul buzei superioare stângi, cu vizualizarea planului osos*

Fig.3. *Colecție purulentă la rădăcina primului premolar de pe arcada superioară stângă şi macerarea osului maxilar la nivelul alveolei*

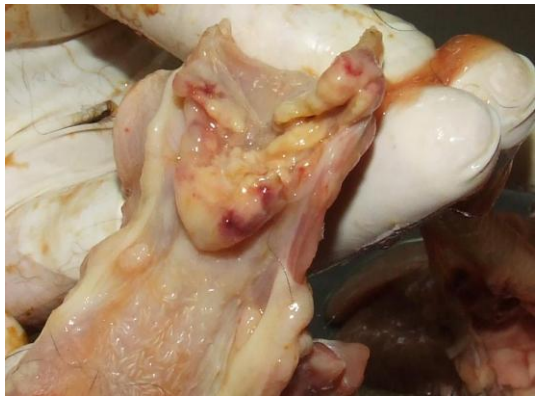


Fig. 4. *Laringită purulentă*

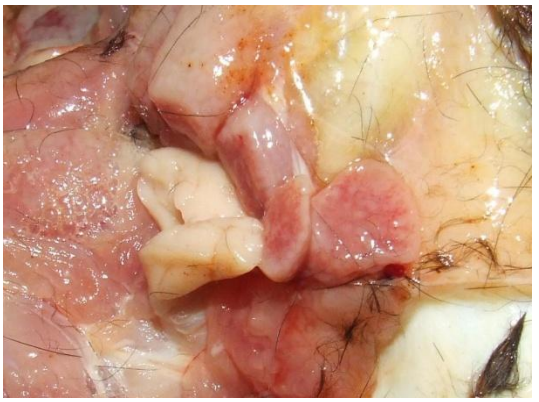


Fig. 5. *Limfonoduli mandibulari reacţionaţi, edematoşi, cu puncte hemoragice*

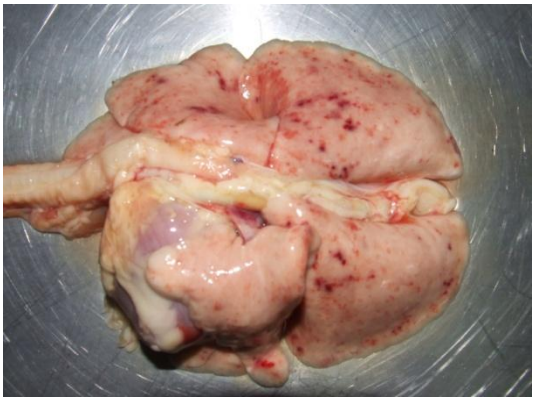


Fig. 6. *Congestie, edem şi hemoragii pulmonare*

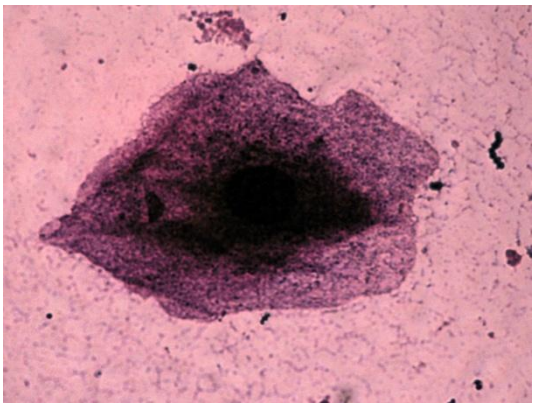


Fig. 7. *Frotiu colorat Gram din probă prelevată de la nivelul ulcerului maxilar: coci Gram-pozitivi dispuşi în lanţuri şi cheratinocit*

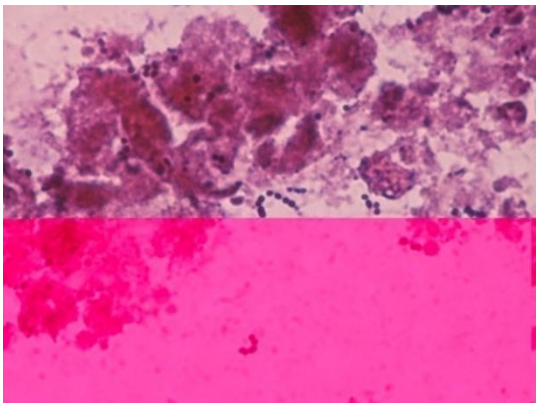


Fig. 8. *Amprentă de la nivelul măduvei osoase femurale, coloraţie Gram: numeroşi coci Gram-pozitivi izolaţi şi dispuşi în lanţuri*

Administrarea amoxicilinei cu acid clavulanic, indicată ca fiind eficientă de către prima antibiogramă, nu a avut rezultate în urma administrării *in vivo*. Una din cauzele posibile a acestei erori rezidă în folosirea de agar simplu, care nu a favorizat creşterea coloniilor de streptococ, faţă de cea a altor specii bacteriene, de suprainfecţie sau epifite. Un alt motiv ar putea fi reprezentat de folosirea tampoanelor de recoltare uscate, care nu oferă condiţii bune de supravieţuire germenilor mai sensibili cum ar fi *Streptococcus spp* (Quinn, 1994).

În concluzie, trebuie precizată importanţa atât a identificării cât mai precoce a agentului patogen, cel puţin la nivel de gen, pentru a putea folosi antibioticul cel mai potrivit până la sosirea rezultatelor antibiogramei, cât şi luarea tuturor măsurilor pentru ca aceste rezultate să fie cât mai corecte. În acest scop este de preferat utilizarea tampoanelor sterile cu mediu de transport, iar mediul folosit pentru cultură trebuie să fie îmbogăţit cu glucoză, ser sau sânge pentru a oferi condiţii bune de dezvoltare şi germenilor mai pretenţioşi cum ar fi *Streptococcus spp*. O alternativă ar fi folosirea mediilor selective, ex. mediul cu azidă. Antibioticele de elecţie în acest caz ar fi fost penicilina G sau ampicilina, la care toate tulpinile izolate în cadrul unui studiu (86 de tulpini) au fost sensibile (Bart, 1997). Datele obţinute ar fi putut fi completate prin testarea motanului afectat pentru

FIV şi FeLV, calicivirozã, herpesvirozã, şi prelevarea de probe microbiologice orale de la pisicile expuse pentru a identifica o eventuală stare de purtător.

BIBLIOGRAFIE

1. Bert F., N. Lambert-Zechovsky (1997) Septicemia caused by Streptococcus canis in a human, Journal of Clinical Microbiology, Mar. 1997, p. 777-779
2. Lyskova P., M. Vydrazalova, D. Kralovocona, J. Mazurova (2007) Prevalence and Characteristics of *Streptococcus canis* Strains Isolated from Dogs and Cats, Acta Vet. Brno, 76:619-625
3. Pesavento, P.A., M.J. Bannasch, R. Bachmann, B.A. Byrne, K.F. Hurley (2007) Fatal Streptococcus canis infections in intensively housed shelter cats, Vet Pathol 44:218-221
4. Sura R.., L. S. Hinckley, G.R. Risatti, J.A. Smyth (2008) Fatal necrotising fasciitis and myositis in a cat associated with Streptococcus canis, The Veterinary Record 162:450-453
5. Tillman, Philip C., Nancy D. Dodson, Mary Indiveri (1982) Group G Streptococcal epizootic in a closed cat colony, Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1982, p. 1057-1060
6. Quinn, P.J., M.E. Carter, B. Markey, G.E. Carter (1994) Clinical Veterinary Microbiology, Ed. Mosby Wolfe, p. 95-102, 127-137.

ARTERIOGRAFIA CU SUBSTANŢE DE CONTRAST NONIONICE (OPTIRAY 350), LA CÂINE

ARTHERIOGRAPHY WITH NONIONIC CONTRAST SUBSTANCES (OPTIRAY 350), IN DOG

R. LĂCĂTUŞ, I. PAPUC, R.C. PURDOIU
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj Napoca
Facultatea de Medicină Veterinară
Calea Mănăştur, nr. 3-5, Cluj Napoca, jud. Cluj, România

Due to complexity of the cardiovascular system, an examination with contrast substances can be based on a selection of the segments requirering diagnosis. Therefore the next steps can be taken: angiocardiography (the cardio segment and it's vessels) – arteriography (underlyning certain segments of the artries and branch arteries) – phlebography (different veins or venar segments of different calibre are being shown, thorugh radiological exposure). The examination of the vasculary system refers to testing and examinating arteries, veins and capliaries through investigating, palpation, listening, grafical recording, blood pressure measurements, catheterization and Doppler technique.

Following elements can be obtained performing an arteriography with nonionic contrast substances:

Radiological investigation of arteries at the dog;

The visual recording of the course, calibre, uniformity, thickness of the arterial wall and some obstacles at the arterial level (thrombosis) and tumors of the blood vessels (hemongiomas);

Aretrial Catherization with special probes on large and medium caliberd arteries;

Diagnosis, but also therapy in the case of blood cloth or arteronmas etc. that can block the blood flow in some areas;

Key words: Optiray 350, angiography, arteriography, nonionic

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul biologic pentru cercetare a fost reprezentat de un număr de 10 câini, cu vârste diferite şi de talie mare. Câinii au fost grupaţi în două loturi. Lotul I format din 5 indivizi, la care s-a urmărit gradul de toleranţă la administrarea de Optiray 350 şi dozele necesare pentru obţinerea unor imagini radiologice optime şi lotul II, format tot din 5 indivizi, care au fost utilizaţi pentru a identifica cele mai bune tehnici de investigare radiologică a sistemului arterial. Substanţa de contrast nonionic utilizată pentru investigaţii, a fost, Optiray 350, substanţă recomadată a fi folosită în neuroradiologie (mielografie, ventriculografie), angiografie (arteriografie cerebrală, arteriografie coronariană, aortografie toracică, aortografie abdominală, angiocardiografie, arteriografie periferică, arteriografie viscerală, flebografie), precum şi în urografie, artrografie şi fistulografie.

Alte materiale folosite la realizarea arteriografiei, au fost: instrumentarul chirurgical de diereză şi exereză, trusa angiografică ce conţine ace pentru puncţia vasului, ghid metalic flexibil, dilatatoare de arteră, cateter, heparină, seringi.

La pacienţii cu o patologie de tip epileptic trebuie acordată o atenţie mărită la administrarea substanţelor nonionice, deoarece acestea pot declanşa un episod acut.

Înainte de administarea substanţei câinii au fost supuşi unei diete alimentare de 12 – 14 ore, apa fiind la discreţie. Cercetările au fost efectuate pe animale aflate sub neuroleptanalgezie cu Acepromazină în doză de 0,5 – 1 mg/kg. m.c., în asociere cu Ketamină, 10 mg/kg.c. Pentru a preveni reacţiile secundare la administrarea substanţei de contrast câinii au fost supuşi unei premedicaţii cu atropină 1 %, în doză de 0,2 mg/kg.c.

Identificarea arterelor femurală şi brahială, ca artere de elecţie pentru realizarea angiografiei, se face prin inspecţie şi palpaţie.

Pentru investigaţiile arteriografice s-a utilizat tehnica Seldinger, de cateterism retrograd, prin puncţionarea arterei femurale, după o prealabilă evidenţiere a acesteia chirurgical.

Tot pentru bunul mers al investigaţiilor a fost necesară pregătirea unei truse de intervenţie, în caz de reacţii secundare, care să conţină corticosteroizi, antihistaminice, atropină, lichide perfuzabile.

După efectuarea neuroleptanalgeziei, zona de elecţie, pe faţa internă a coapsei, la nivelul triunghiului Scarpa, a fost toaletată prin tundere, spălare, radere, pensulare cu tinctură de iod, iar câinele a fost contenţionat pe masa de intervenţie chirurgicală.

După izolarea şi evidenţierea arterei femurale denudate, s-a introdus un ghid metalic flexibil până la nivelul de explorare stabilit, după care acul de puncţionare este retras şi în arteră se introduce dilatatorului de arteră.

Prin dilatatorul de arteră se introduce cateterul cu ajutorul ghidului de sârmă până la nivelul de explorare stbilit, urmată de extragerea ghidului (Fig. 1).

Pentru a evita coagularea sângelui, pe cateter se introduce o soluţie diluată de 1/10 Heparină.

Fig. 1. – Introducerea canulei în artera femurală şi extragerea ghidului de sârmă

Animalul astfel pregătit se transportă pe masa de expunere radiologică, unde se administrează substanţa de contrast, incălzită la temperatura corpului.

Stabilirea dozelor de substanţe s-a efectuat pentru fiecare preparat în parte, prin administrări crescânde în funcţie de segmentul urmărit. Pentru aortografie toracală şi abdominală, dozele au fost testate începând de la 0,5 ml/, 1 ml/kg, 1,5 şi 2 ml/kg.corp. Optiray 350.

Pentru arteriografia periferică, dozele folosite au fost mai mari, comparativ cu cele folosite în aortografie, rezultate bune obţinându-se cu doze de 1 –1,5 ml/kg.corp Optiray 350.

Expunerile radiologice au fost efectuate seriat, la intervale scurte de timp, atât în timpul administrării cât şi imediat după administrare. Intervalul dintre expuneri a fost de 1 – 2 – 4 – 6 secunde de la începutul injectării, fiind necesare explorări multiple pentru stabilirea limitelor dozelor de substanţă de contrast ce produce o opacifiere de calitate a segmentelor urmărite, precum şi o influenţă minimă asupra organismului.

După administrarea substanţei de contrast şi efectuarea radiografiilor seriate, s-a retras dilatatorul de arteră şi s-a realizat hemostaza prin pansament compresiv timp de 15 minute, şi prin sutura vasculară, urmată de sutura pielii în două puncte separate.

Atât în timpul administrării substanţelor de contrast cât şi după, animalele au fost ţinute sub observaţie, monitorizându-se principalele constante fiziologice: temperatură, frecvenţă cardiacă şi respiratorie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Porţiunea toraco-abdominală a arterei aorte descendente are o foarte bună evidenţiere radioopacă în prima secundă de administrare a substanţei „în bol".

Pentru evidenţierea ramurilor arteriale descendente din artera aortă, imaginile radiografice au fost obţinute la 4 secunde de la începutul administrării, când substanţa a fost administrată lent şi maxim la 1 - 2 secunde când substanţa a fost administrată rapid (Fig. 2), iar conturul, ramificaţiile şi integritatea lor este perfect vizualizată.

Fig. 2 –Evidenţierea ramurilor colaterale din artera aortă descendentă, în urma perfuzării lente a substanţei de contrast

Pentru vizualizarea arterei iliace externe, ca ramură terminală a aortei descendente, se impune ca poziţia animalului să fie latero-laterală sau dorso-ventrală, iar expunerea va fi latero-laterală, respectiv ventro-dorsală.

În arteriografiile selective ale arterei iliace externe se pot surprinde pe imaginea radiologică şi colateralele acesteia, reprezentate de artera circumflexă iliacă profundă, artera cremasterică (la masculi) şi artera uterină medie (la femele), şi artera femurală profundă.

În timpul administrării substanţelor de contrast, pacienţii au fost monitorizaţi din punct de vedere al temperaturii, respiraţiei şi frecvenţei cardiace, la diferite intervale de timp, obţinând următoarele rezultate (tabel 1).

Din analiza datelor obţinute după administrarea lentă de Optiray 350, valorile marilor funcţii nu se modifică semnificativ, ceea ce demonstrează, că administrarea lentă a substanţei, este cea mai indicată mtodă.

Tabel 1. – Monitorizarea pulsului, respiraţiei şi temperaturii înainte şi după administrarea lentă de Optiray 350

Constante / Timpi	Frecvenţa cardiacă	Frecvenţa respiratorie	Temperatura (^{0}C)
Înainte de administrare	118	28	38,8
La 10 min. după administrare	118	26	38,7
La 30 min. după administrare	110	25	38,4

Administrarea substanţei de contrast non-ionice « în bol » (tabel 2), provoacă modificări ale respiraţiei (bradipnee). După 10 minute de la administrara de Optiray 350, de la 53 respiraţii/minut, se înregistrează 20 respiraţii/minut, iar după 30 minute de la administare, de la 53 respiraţii/minut se ajunge la 17 respiraţii/minut.

Ținând cont de acest aspect, recomandăm, perfuzia lentă de Optiray 350.

Imaginea optimă, arteriografică, se obține când injectarea substanței de contrast se face cât mai aproape de zona pe care dorim să o vizualizăm.

Obținerea unor imagini radiologice de bună calitate se realizează prin poziționări diferite ale corpului, cu scopul de a vizualiza corespunzător segmentele urmărite. În acest sens, poziționarea latero-laterală a animalului, cu partea stângă pe caseta radiografică oferă imagini bune şi foarte bune ale cordului şi originii arterei aorte.

Tabel 2 – Monitorizarea pulsului, respirației şi temperaturii înainte şi după administrarea « în bol » de Optiray 350

Constante / Timpi	Frecvența cardiacă	Frecvența respiratorie	Temperatura (^{0}C)
Înainte de administrare	112	53	38,5
La 10 min. după administrare	120	20	38,7
La 30 min. după administrare	112	17	38,5

CONCLUZII

1. Cercetările privind investigarea radiologică a sistemului arterial se pot efectua numai pe animalele tranchilizate.
2. Examenul radiologic cu substante de contrast a sistemului circulator permite diagnosticarea modificărilor funcționale şi morfologice la diferite niveluri.
3. Pentru obținerea unor imagini radiologice de calitate a cordului şi a arterei aorte este recomandat ca animalul să fie poziționat latero-lateral.
4. Substanța utilizate în investigațiile radiologice ale aparatului circulator, Optiray 350, duce la obținerea unor imagini excelente.
5. Dozele folosite pentru obținerea unor rezultate foarte bune în arteriografia toracală au fost de 1,5 – 2 ml/kg.corp, iar pentru arteriografia periferică de 1 – 1,5 ml/kg.corp Optiray 350.
6. Intervalul dintre expuneri a fost de 2 – 6 secunde, fiind necesare expuneri multiple şi seriate.
7. Opacifierea cordului şi a sistemului arterial este posibilă numai în urma administrării rapide a substanței de contrast.
8. Arteriografiile efectuate la nivelul segmentelor periferice depind de efectuarea corectă a cateterismului zonei vizate, şi de administrarea lentă a substanțelor nonionice, într-un timp relativ lung, urmată de expuneri seriate.

BIBLIOGRAFIE

1. GONSETTE R.E., L. LIESENBORGH, 1980 – New contrast media in cerebral angiography: animal experiments and preliminary clinical studies. Invest Radiol 15 (Suppl 6): 270-274, p. 29
2. GOSPOS GH., N. FREUDENBERG, M. ELKE, 1983 – Wirkung von Rontgenkontrastmitteln auf das Endothel der Vena ca va der Ratte. Rofo 139: 553-555, p. 43
3. GRANCEA V., 1996 – Bazele Radiologiei si Imagisticii Medicale, Ed.Medicală AMALTEA;
4. KEALZ J.K, H.McALLISTER, 2000 – Diagnostic radiology and Ultrasonography of the dog and cat, Ed.W.B.Saunders;
5. KHOURY G.A., J.C. HOPPER, Z. VARGHESE, K. FARRINGTON, R. DICK, J.D. IRVING, P. SWENY, O.N. FERNANDO, J.F. MOORHEAD 1983 – Nephrotoxicity of ionic and non-ionic contrast material in digital vascular imaging and selective renal arteriography. Br J Radiol 56: 631-635
6. LĂCĂTUŞ R. şi col., 2004 – Angiografia la câine cu substanțe de contrast nonionice (Ultravist 300). Lucrări ştiințifice. U.S.A.M.V.B., seria C, vol. XLVI – XLVII, 2003-2004, p. 656-658
7. Lăcătuş R., 2007 – Contribuții privind utilizarea substanțelor de contrast nonionice la câine şi la pisică, Teză de doctorat
8. PAPUC I., 2004 – Semiologie şi Imagistică Medicală Veterinară, Ed.Accent, Cluj- Napoca;

COMPLEXITIES OF STIFLE STABILITY IN CANINE CRANIAL CRUCIATE DISEASE

NICOLAAS E., LAMBRECHTS
Clinical Associate Professor
Department of Veterinary Clinical Sciences
625 Harrison Street, Lynn Hall
Purdue University
West Lafayette, IN 47907-2026 USA
Email: nlambrec@purdue.edu

How is the normal stifle stabilized?

The complex movement and stability of the canine stifle is provided for by the incompletely understood and intricate interaction and synergy of structures. These include anatomically passive structures including the opposing articular shape and elastic deformation, the menisci, the collateral and cruciate ligaments, with dynamic and coordinated muscular activity. Note that the contraction of muscle groups is not unidirectional. Their complex anatomy, spanning one or more joints, provides a range of contraction vectors and mechanical effects, depending on the prevailing joint angle. Not only do these structures provide the obvious flexion/extension and slight internal rotation, but they also provide for force transfer and dissipation across the joint and importantly, stability (resistance to abnormal translation and hyperextension) in a joint that is not anatomically congruent.

How is this controlled and coordinated? In part, through reflexes: Mechanoreceptors (Pacini, Ruffini and possibly Golgi tendon organ-like receptors[1,2]) within the cranial cruciate ligament (CCL), as well as a number of periarticular structures (including the infrapatellar fat pad, joint capsule and surrounding muscles), play a sensory role by providing proprioceptive and mechanical information which through reflex arcs, allow for instantaneous contractions and relaxation of antagonistic muscles to protect the joint from damaging forces or movements. For example, contraction of the hamstrings (an "on demand load regulator"), while simultaneously relaxing the quadriceps, and the gastrocnemius muscles, would oppose cranial tibial translational forces and CCL strain overload [3]. These effects would be somewhat dependent on stifle angle. These sensory inputs may also provide input to spinal central pattern generators which control gait pattern and resultant joint loading4.

Is the cranial cruciate ligament integral in the functional stability of the stifle?

Although conventional wisdom suggests that the answer to this question is yes, there is conflicting information on the matter. In fact, a lucrative industry is based on the paradigm supporting this belief. Researchers have argued that the conservative treatment of dogs >15kg with failure of the CCL's was not successful, and that these dogs required stabilization[5]. However, in this retrospective report, the investigators were unable to demonstrate a relationship between instability (cranial drawer) and degree of lameness. Kinematic studies of cruciate-deficient stifle joints demonstrated significant and persistent cranial tibial subluxation during the stance phase up to 2 years following CCL transection, indicating that compensatory muscle contraction and/or relaxation, was insufficient to oppose this translation and implying that the cranial cruciate ligament is a primary constraint to cranial tibial translation during the stance phase[6,7]. Note that these were experimental animals and not cases of naturally-occurring CCL disease.

In theory, balanced muscle activity around the joint should be able provide joint stability. In human cadaver studies, co-contracture of the hamstrings with the quadriceps, resulted in a

significant reduction of strain in the anterior cruciate ligament (ACL)[8]. Further, investigators have shown that certain ACL-deficient individuals were able to dynamically compensate by simultaneously increasing activity in their hamstring while relaxing their gastrocnemius and quadriceps muscles[9]. The concept of a dynamically stabilized knee, during certain flexion angles, is further supported by mathematic modelling, where simultaneous contraction of the quadriceps, gastrocnemius and hamstrings resulted in complete unloading of the ACL at flexion angles above 22°[10]. Finally, stifle laxity in man does not necessarily result in clinically important joint instability[11]. Can and does this occur in our canine patients? To my knowledge, similar studies have not been conducted in dogs. The biomechanics of canine (quadrupeds) is very different to that of humans with their extended knees. Muscle action has been reported to provide at least partial joint stability in animals[3,12], although these studies were not conducted in dogs.

It is not uncommon to see and examined tense dogs with CCL failure, where cranial drawer and tibial thrust can only be appreciated after the animals have been sedated and their stifle muscles are relaxed. Sometimes it is very difficult to demonstrate laxity even the sedated animal. Do these animals have clinically important joint instability that requires surgical stabilization? You may have also encountered dogs (>15 kg) that have supposedly unstable joints due to failed CCL that either receive no stabilizing technique or have a premature failure of their stabilizing technique, that seem to do as well clinically, as well as those that have had a successful surgical stabilizing technique performed. This has been reported by Conzemius[13] among others. How do these individuals achieve functional stability? Do they, for example, improve their defective joint proprioception and spatial control through improved muscle reflex action over time, thus protecting their CCL-deficient joints from damaging translation and subsequent microtrauma that could trigger and perpetuate stifle osteoarthritis?

How is stifle stability disturbed following CCL disease/insufficiency and what are the clinical consequences?

The answer to this question is not fully understood. Following CCL degeneration and failure, some of the above-mentioned functions are lost or diminished. The consequences include un- or incompletely restrained cranial tibial translation, generated largely through quadriceps muscle contraction, opposed by the patella tendon and projecting through the patella into the femoral trochlea, together with gastrocnemius muscle action. This patella-femoral force has been calculated through finite element analysis to approximate 60% of body weight at a walk[14]. There is also excessive/unchecked internal rotation of the tibia and diminished stabilizing compression of the femoral condyles into the menisci when the ligament is under tension[15].

The neuromuscular consequences of CCL failure and the concomitant articular/periarticular disease process are not well defined. In an experimental cranial cruciate transection model, investigators demonstrated that osteoarthritic destruction of the stifle joint was markedly accelerated if combined with sensory interruption from that limb through dorsal root ganglionectomy. The joint degradation was much more gradual without ganglionectomy and was absent if only ganglionectomy was performed[16]. In man with ACL-deficient knees, reflex hamstring contraction latency, a measure of knee proprioception, was prolonged, contributing directly to knee instability[17]. The primary, fast-acting reflex from mechanoreceptors in the ACL to hamstrings is lost. A slower-to-respond arc, from receptors elsewhere (muscle spindles or joint capsule) continues to result in hamstring contraction and quadriceps inhibition[3]. One can speculate that the same holds true for dogs with CCL disease; that there is diminished reflexive muscle protection of the joint. The muscle atrophy and weakening and resultant osteoarthritis following CCL disease may also have an underlying neuromuscular cause, through “reflex inhibition” of specific muscle groups[18]. I think it is reasonable to believe that even rapid reflex contraction of the “hamstrings” and relaxation of the

quadriceps and gastrocnemius muscles will be unable to prevent stifle subluxation if large or very rapidly transmitted loads are brought to bear on the knee.

The clinical consequences of CCL disease are well known and include progressive osteoarthritis, as well as apparent late injury to the menisci, particularly the medial meniscus. Are these changes solely as a result of joint instability? This would seem unlikely and the following questions warrant consideration: What role does functional instability play in the progression of stifle disease? Is stifle laxity clinically relevant? One study found evidence that an increased cranial drawer sign, although not an indication of functional stability, was associated with a better clinical outcome than animals with less drawer[19]. Finally, disproportional flexor (gastrocnemius) tone across the stifle joint during endochondral ossification has been suggested[20] as a cause of excessively large tibial plateau angles. If this is true, could this unbalanced (by for example "hamstring" contraction) force persist into adulthood and be a cause of CCL failure and subsequent chronic tibial subluxation with secondary osteoarthritis?

How effectively should and do currently popular surgical techniques address the instability caused by CCL disease?

An aim of a surgical technique could be to effectively stabilize the stifle, ideally reproducing the function of the intact cranial cruciate ligament; to mitigate against the developing osteoarthritis; prevent further damage to the joint e.g. postliminary (subsequent) meniscal injuries. No current surgical technique provides short and long-term stability to the stifle joint to the extent that the intact ligament can provide. Osteoarthritis continues unabated, gait analysis indicates that limb function does not return to normality and medial meniscal injuries are reported following all surgical procedures (an incidence of >6%).

It is also apparent, based on the available literature, that the clinical outcome of the current popular surgical procedures is often surprisingly similar and, reportedly, quite good[21,22]. Admittedly, this may be due to the absence of randomised long-term comparative objective studies. It may also be that the current techniques are just not good enough to achieve better clinical outcomes or that the underlying disease process, which we do not fully understand, will result in progressive disease irrespective of the surgical technique used. In humans, 50% of patients with ACL tears and meniscal injuries will develop clinically significant osteoarthritis. Based on available reports, ACL reconstruction does not appear to provide protection against progressive osteoarthritis nor improve long-term outcome. There is also no current evidence that treatment restores neuromuscular function and muscle strength, of which the lack of either may perpetuate osteoarthritis[23]. Knee laxity correlates poorly with dynamic stability, function, or clinical signs. There is also evidence that additional joint injuries (e.g. bone bruising at the time of cruciate ligament failure) may determine the clinical outcome irrespective of stability achieved. Although the pathophysiology of cruciate failure probably differs between man and animals, it would be reasonable to believe that the same sequelae could apply to dogs.

We should also be investigating how different surgical techniques stabilize the stifle and how it is possible for such surgical variation to produce apparently similar results. With the tibial osteotomies, cranial tibial subluxation is dynamically counteracted by altering the geometry of the bone and the forces transmitted across the joint. Although this appears successful, one must bear in mind that these procedures do not address internal rotation, nor have the long-term consequences of these geometric alteration been worked out[15,24]. It is also not certain whether tibial thrust can be neutralized against the full range of physiological forces generated across the stifle joint.

With intracapsular ligament techniques, the graft material undergoes remodelling and initially becomes profoundly lax, with long-term strengthening following. Periarticular tissue stabilization does not appear to play an important role with this technique[25].

With lateral suture stabilization, the joint is initially turned into a simple hinged joint with 1 plane of movement. As the isometric attachment points may be difficult to locate, the joint may be alternately overly compressed and overly relaxed depending on the stifle angle. In addition, the stabilizing material progressively stretches and often fails over time. What then provides long-term stability to the joint? The literature claims the fibrotic thickening of the joint capsule and retinaculum does so[26]. However, fibrous tissue stretches and cannot logically provide stability of anything like the intact cruciate ligament. How do these animals manage to do so apparently well? How is it possible for the fibrous tissue to stabilize the joint yet not massively reduce the joints range of motion? What is the contribution of periarticular fibrous tissue stabilization in cases that have been treated by means of one of the proximal tibia osteotomies? Is it possible that the outcomes we are seeing are occurring in spite of the surgical procedures? Have we overemphasized surgical stabilization? Do we really need to be performing surgical stabilization on all cases of dogs >15kg? These are questions for which we do not yet know the answers, yet are integral in determining appropriate treatment techniques and understanding treatment failures.

It is also clear that no surgical procedure can address the neuromuscular consequences of CCL disease. On the contrary, they not only ignore these consequences, but possibly exacerbate them through further joint damage (e.g. destruction of mechanoreceptors through partial ablation of the infrapatella fat pad and in the case of stifle arthrotomy, joint capsule damage). In addition, the stabilising effect of the body's most powerful muscles is relegated in pursuit of the instant gratification of a surgical stabilizing process!

CONCLUSION

1. We need to better understand the effects (if any) of bone geometry and periarticular neuromuscular activity as etiological causes of cranial cruciate disease.
2. We need better understanding of the neuromuscular control of joint stability.
3. We need to understand the consequences CCL disease on neuromuscular function and muscle strength and develop effective ways of rebuilding these.
4. We need to determine whether unstabilized stifles actually fare worse and whether the incidence of meniscal tears is higher than in cases that are surgically stabilized. Such studies are underway[13].
5. We need better long-term prospective studies, controlled and randomized for technique, evaluating the efficacy of our techniques.
6. We need to develop realistic outcome measurements for CCL disease.
7. We need to determine whether we should be treating this condition more individually, and be able to identify which cases require what kind of treatment. We may find that the complex procedures we currently prefer may not be necessary in some cases.
8. We need to determine the neuromuscular effects of surgery on the stifle and identify ways to limit the impact.

REFERENCES

1. Adachi N, Ochi M *et al*: Mechanoreceptors in the anterior cruciate ligament contribute to the joint position sense. Acta Orthop Scand 73:330-334, 2002
2. Arcand MA, Rhalmi S, Rivard C-H: Quantification of mechanoreceptors in the canine anterior cruciate ligament. Int Orthop 24:272-275, 2000
3. Solomonov M, Baratta R *et al*: The synergistic action of the anterior cruciate ligament and thigh muscles in maintaining joint stability. Am J Sports Med 15:207-213, 1987
4. Vilensky J: Neuromuscular system. Innervation of the joint and its role in osteoarthritis. In Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS (eds) Textbook on Osteoarthritis (ed 4). Oxford University Press 2003, pp161-167

5. Vasseur PB. Clinical results following non-operative management for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. Vet Surg 13:243-246, 1984
6. Korvick DL, Pijanowski GJ *et al*: Three-dimensional kinematics of the intact and cranial cruciate ligament-deficient stifle of dogs. J Biomech 27:77-87, 1994
7. Tashman S, Anderst W *et al*. Kinematics of the ACL-deficient canine knee during gait: serial changes over 2 years. J Orthop Res 22:931-941, 2004
8. Li G Rudy TW *et al*: The importance of quadriceps and hamstring muscle load on knee kinematics and in-situ forces in the ACL. J Biomech 32:395-400, 1999
9. Limbird TJ, Shiavi R *et al*. EMG profiles of knee joint musculature during walking: changes induced by anterior cruciate ligament deficiency. J Orthop Res 6:630-638, 1988
10. O'Connor JJ: Can muscle co-contraction protect knee ligaments after injury or repair? J Bone Joint Surg [Br] 75-B:41-48, 1993
11. Bull AM, Amis AA. The pivot-shift phenomenon: a clinical and biomechanical perspective. Knee 5:141-158, 1998
12. Todhunter RJ, Lust L. Synovial joint anatomy, biology and pathobiology. In: Equine Surgery. In Auer JA (ed). Saunders 1992, 99844-866
13. Conzemius M: Stabilization of the CCL deficient joint: Do we need it? Proceedings ACVS Veterinary Symposium, Chicago, USA, p332, 2007
14. Shahar R, Milgram J. Biomechanics of the tibia plateau levelling of the canine cruciate-deficient stifle joint. A theoretical model. Vet Surg 35:144-149, 2006
15. Smith GK: Revisiting the mechanics of canine stifle stability and stabilization procedures. Proceedings ACVS Veterinary Symposium, Chicago, USA, pp300-303, 2007
16. Vilensky JA, O'Conner BL *et al*. Serial kinematic analysis of the canine hind limb joints after deafferentation and anterior cruciate ligament resection. Osteo Cart 5:173-182, 1997
17. Beard DJ, Kyberd PJ *et al*: Proprioception after rupture of the anterior cruciate ligament. An objective indication of the need for surgery? J Bone Joint Surg [Br] 75-B:311-315, 1993
18. Stokes M, Young A. The contribution of reflex inhibition to arthrogenous muscle weakness. Clin Sci (Lond) 67:7-14, 1984
19. Hill CM, Conzemius MG *et al*: Bacterial culture of the canine stifle joint following surgical repair of ruptured cranial cruciate ligament. Vet Comp Orthop Traumatol 12:1-5, 1999
20. Macais C, McKee WM, May C: Caudal proximal tibial deformity and cranial cruciate ligament rupture in small-breed dogs. J Small Anim Pract 43:433-438, 2002
21. Conzemius MG, Evans RB *et al*. Effect of surgical technique on limb function after surgery for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. J Am Vet Med Assoc 226:232-236, 2005
22. Aragon CL, Budsburg SC. Application of evidence-based medicine: cranial cruciate injury repair in the dog. Vet Surg 34:93-98, 2005
23. Lohmander LS, Englund PM *et al*. The long-term consequences of the anterior cruciate ligament and meniscus injuries. Am J Sports Med 35:1756-1769, 2007
24. Kim SE, Pozzi A *et al*. Tibial osteotomies for cranial cruciate ligament insufficiency in dogs. Vet Surg 37:111-125, 2008
25. Hart RC, Hulse DA *et al*: Contribution of periarticular tissue to stabilization of the canine stifle joint after cranial cruciate ligament reconstruction. Vet Comp Orthop Traumatol 16: 21-25, 2003
26. Vasseur PB. Stifle joint. In: Slatter D (ed) Textbook of Small Animal Surgery (ed 2) 1993, pp1817-1865

PREVALENCE OF HELICOBACTER SPP. IN DOGS THAT UNDERGO GASTROSCOPICAL EXAMINATIONS

D.C. LESCAI[1], A. POPOVICI[2], F. DUMITRESCU[1], I. BURTAN[3], L. HARBUZ[4]
[1]Salvavet-Ilioara Animal Hospital, Bucharest
[2]Sanitary Veterinary Direction, Bucharest
[3]Faculty of Veterinary Medicine, Iasi
[4]Secretary of state, Ministry of Agriculture, Romania

Helicobacter spp. have a long history in human medicine as a concurrent agent in different stomach diseases. The purpose of the study is to establish a local statistic concerning the prevalence of Helicobacter like organisms in dogs that undergo gastric endoscopical procedures after presenting digestive symptoms that would indicate this procedure as a diagnostic one. Another strong point for such a study is the importance for the human-animal interaction that can be a way of sharing the Helicobacter strains.

Key words: helicobacter, gastroscopy, dog, digestive symptoms.

This study has developed after a number of diagnostic gastroscopies performed in dogs presenting superior digestive symptoms as chronic vomiting, weight loss, food intolerance, vomiting with blood traces or just intermittent vomiting or chronic diarrhea or other digestive symptoms without a clear cause (3). All of the subjects were prior submitted to different therapeutically procedures that were inefficient. The technique used is the endoscopical examination of the esophagus and stomach and the initial duodenum (3), each of these procedures being concluded with biopsy samples of the stomach mucosa that were submitted to cytological examinations (5). Considering that in human medicine the presence of Helicobacter organisms is linked with gastritis (1,2), gastric ulcers and even cancer (4), it is a reason for this study to assess the presence of such organisms in the dogs that are presented for gastroscopy and also to assess the importance of this method of investigation.

MATERIAL AND METHODS

Subjects of this study are dogs that form a heterogeneous group considering the age, sex and breed but more important a homogeneous group considering the urban origin and close, in house contact with owners. Age of the subjects is between 5 months and 10 years. Number of subjects is 16 and all of them had digestive problems that required endoscopic examination. All subjects were submitted to gastroscopy with biopsy sampling. All examinations were performed at Salvavet-Ilioara Animal Hospital using an Olympus gastroscope. All samples were processed at Sanitary Veterinary Direction from Bucharest using microscopic examinations of sample impressions using as methods the Ziehl-Nielsen method, Pappenheim method, Diff-Quik method. Microscopic examinations executed by impression method, revealed epithelial cell reactive dysplasia. There is also an overflow of inflammatory cell population as neutrophils or/and mostly lymphocytes and macrophages, accordingly with lesion aspect of endoscopic findings. Besides inflammatory cell population there were identified bacillary-like organisms, with curved or spiral aspect, 2-3 microns of length, in groups, outside of cells, with characteristic Helicobacter morphology. The subjects were under general anesthesia during examinations and they were under close monitoring. As anesthetic procedure it was used acepromazine or benzodiazepines for premedication; ketamine or propofol for induction and isoflouran for mentainence, after intubation.

Analgesia of all subjects was controlled with tramadol or butorphanol. There was no atropine used, as this is not allowed during gastroscopy with the exception of cardiac patients. All subjects had

at least 24 hour diet. Samples were obtained from all areas of the gastric mucosa, even if there were no lesions present as follows, 4 samples from areas with pathologic appearance and 4 samples from areas with normal aspect, from every anatomical region of the stomach. Macroscopically, the endoscopic image of the gastric mucosa that is usually found on the subjects from the study is with congestive areas, without the specific glance, areas with local hypertrophy, most of the affected areas being found in the antrum area (60%). The presence of Helicobacter spp. was diagnosed even in samples from areas with normal aspect.

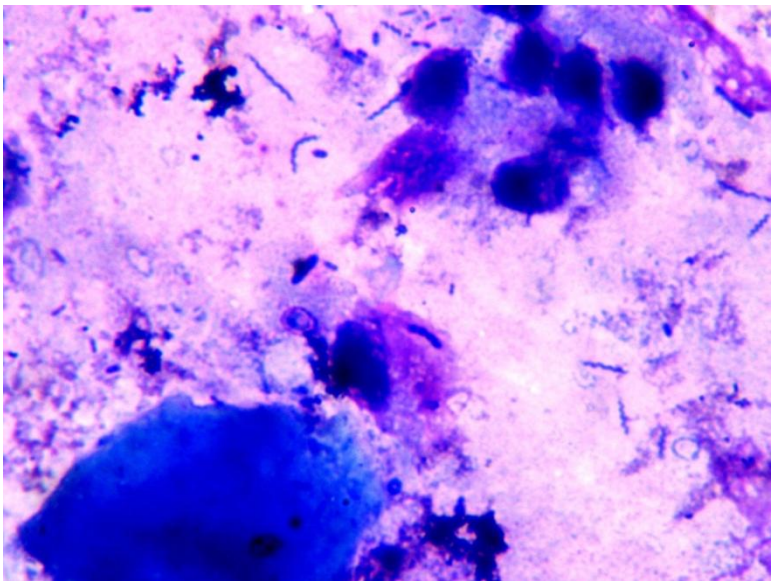


Fig. 1. presence of spiral shape Helicobacter spp. on a biopsy sample obtained after a gastroscopy. MGG stain, x1000

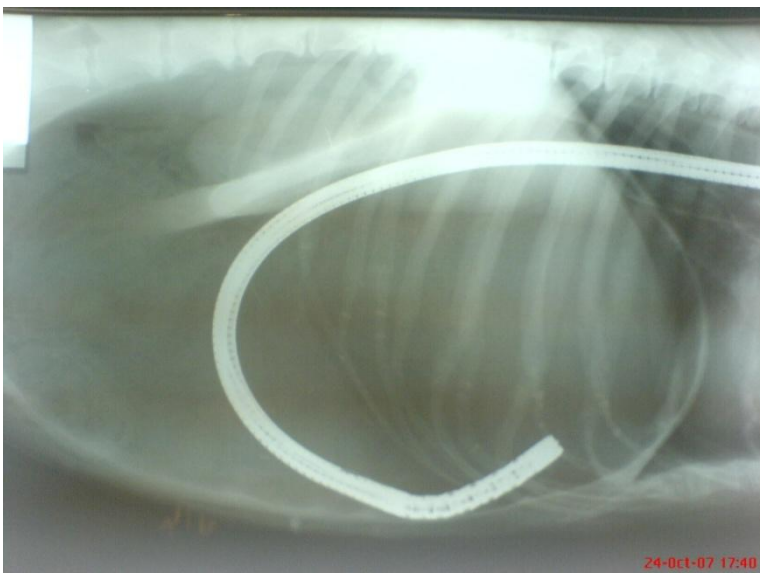


Fig. 2. plane radiography showing the presence of the endoscope inside the stomach executing a so called J maneuver used for cardia visualisation

RESULTS AND DISCUTIONS

From 16 dogs with digestive problems that required endoscopic examination, 5 of the subjects (31%) presented as negative subjects for Helicobacter spp.

The rest of 11 subjects (69%) were positive for Helicobacter spp. presence. Note that 2 of the positive subjects group (12,5%) were also positive for Simonsiella spp.. Consequently, all positive subjects received also, during treatment protocols, active medication against Helicobacter spp.. The presence of Helicobacter spp. was diagnosed even in samples from areas with normal aspect. For the negative subjects the technical report of the smear reading contains data that suggest a gastritis with other cause then the infectious one. Microscopic examinations executed by impression method, revealed epithelial cell reactive dysplasia. There is also an overflow of inflammatory cell population as neutrophils or/and mostly lymphocytes and macrophages, accordingly with lesion aspect of endoscopic findings. Besides inflammatory cell population there were identified bacillary-like organisms, with curved or spiral aspect, 2-3 microns of length, in groups, outside of cells, with characteristic Helicobacter morphology. Macroscopically, the endoscopic image of the gastric mucosa that is usually found on the subjects from the study is with congestive areas, without the specific glance, areas with local hypertrophy, most of the affected areas being found in the antrum area (60%). The presence of Helicobacter spp. was diagnosed even in samples from areas with normal aspect.

CONCLUSIONS

1. The high number of subjects that are positive for Helicobacter spp., is a clear indication that this spiral shape organism has a high prevalence, at least among dogs with upper digestive problems that live in urban areas in close contact with owners.
2. Microscopic examinations of the samples obtained after gastroscopy are a rapid and straight forward method for evaluation of the gastric mucosa for Helicobacter spp., and other organisms, contamination that would require reassessing the treatment protocols. This conclusion requires a reconsideration of the importance of the endoscopic examination as one of the best method of diagnostic for digestive problems.
3. The actual size of the samples form pathologic areas was considerably bigger in comparison to the samples from normal areas, the consistency of the affected mucosa being modified in a way in which the grasp of the sample is better.
4. The presence of Helicobacter spp. was diagnosed even in samples from areas with normal aspect.
5. During the examination there were no complications as cardio-respiratory problems. In the post-examination period, there were no complications regarding the sampling process.

REFERENCES

1. Popovici A, Contributions for utilizing rapid diagnostic methods for histological and cytopathologic examination in veterinary medicine, USAMV 2003.
2. Dumitrescu F., Normal and pathological aspects of digestive tract in dogs and cats, USAMV Bucharest, 2005
3. Fox JG: Gastric *Helicobacter* infections. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Ed. Greene CE, 4th ed W.B. Saunders Company, Philadelphia. PP 343-351, 2006.
4. Hwang CY, Han HR, Youn HY. Prevalence and clinical characterization of gastric *Helicobacter* species infection of dogs and cats in Korea. *J Vet Sci.*;3(2):123-33. Jun 2002
5. Wiinberg B, Spohr A, Dietz HH, Egelund T, Greiter-Wilke A, McDonough SP, Olsen J, Priestnall S, Chang YF, Simpson KW. Quantitative analysis of inflammatory and immune responses in dogs with gastritis and their relationship to *Helicobacter* spp. infection. *J Vet Intern Med*. Jan-Feb;19(1):4-14, 2005

DIAGNOSTICUL GASTRITELOR SECUNDARE NEFRITEI CRONICE LA CÂINE

THE DIAGNOSIS OF CANINE GASTRITIS SECONDARY TO CHRONIC NEPHRITIS

R. N. MĂLĂNCUŞ, GH. SOLCAN, V. VULPE
FMV Iaşi
razvanmalancus2002@yahoo.co.uk

We made a study concerning the diagnosis of gastritis secondary to chronic nephritis in dogs. The diagnosis was appreciated after the corroboration of the clinical examination, biochemical blood testing, ultrasonographic and radiologic examinations.

The main sign found after the clinical examination was vomiting while the biochemical blood examinatiorevealed high values of BUN (58,58±18,40) and creatinine (2,8±1,35) associated with a low value for total proteins (4,71±0,82)

The echographic examination revealed a thickened gastric wall with uniform structure which denote the presence of gastritis. We also observed the renal condition with small kidneys and lesions to cortical area.

The contrast radiologic examination exposed the affected gastric areas and also the renal dysfunction.

Key words: gastritis, chronic nephritis, dog

MATERIAL ŞI METODĂ

Investigaţiile s-au realizat pe 12 câini de rase şi vârste diferite ce s-au prezentat la Clinica Medicală a Facultăţii de Medicină Veterinară din cadrul Universităţii Agronomice”Ion Ionescu de la Brad” Iaşi, în perioada decembrie 2008 – martie 2009.

Diagnosticul s-a formulat în urma coroborării datelor obţinute la examenul clinic, biochimic al sângelui, examenul ecografic şi cel radiologic.

Examenul biochimic al sângelui s-a efectuat cu ajutorul analizatorului automat Accent 200 al firmei Cormay, folosind kit-uri specifice şi urmărindu-se determinarea principalilor parametri cu semnificaţie pentru tulburările aparatului urinar (uree, creatinină, proteine totale), precum şi a altor parametri de importanţă în diagnosticarea unei afecţiuni generale (ALT, amilază).

Examenul ecografic s-a realizat la 7 cazuri cu ajutorul ecografului Aquila Pro Vet folosind sondele de 5 şi 7,5 MHz. Ecografia stomacului permite aprecierea grosimii peretelui gastric precum şi diferenţierea straturilor ce îl compun. Pentru o mai bună evidenţiere a structurilor gastrice s-a dispus păstratrea unei diete prin înfometare timp de 12 ore.

Examenul radiologic s-a efectuat la toate cele 12 cazuri cu ajutorul subtanţelor de contrast folosindu-se suspensie de bariu (20% greutate/volum), 13 ml/kg. Examinarea s-a realizat repetat pentru a se putea observa regiunea gastrică în dinamică.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Examenul clinic a relevat prezenţă vomitării, hematemezei, a diareei, inapetenţei, slăbirii precum şi a poliuriei sau oliguriei, însoţite de polidipsie. Semnul predominant a fost vomitarea, acesta fiind motivul principal de prezentare a proprietarilor cu pacienţii la consultul de specialitate.

După cum se poate observa în tabelul 1 vomitarea a fost un semn constant, aceasta fiind prezentă la 11 din cele 12 cazuri. Deasemenea, într-o pondere ridicată (83,33%) s-a constatat slăbirea

animalelor, aceasta fiind progresivă, întinzându-se pe o perioadă de câteva luni. Inapetența și diareea a fost remarcată la 7, respectiv 6 cazuri din cele examinate iar poliuria, respectiv oliguria s-a constatat la câte 3 cazuri fiecare. Hematemeza a fost observată la 2 cazuri din cele examinate, având o pondere totală de 16,66%.

Tabelul 1

Ponderea semnelor clinice diagnosticate

Nr.crt.	Simptomul	Număr cazuri	Procentul (%)
1.	Vomitare	11	91,66
2.	Slăbire	10	83,33
3.	Inapetență	7	58,33
4.	Diaree	6	50
5.	Polidipsie	5	41,66
6.	Poliurie	3	25
7.	Oligurie	3	25
8.	Hematemeză	2	16,66

Alături de simptomatologia prezentată s-a mai observat la 2 cazuri prezența unei dermatite apărute în urma complicațiilor de insuficiență renală cronică.

Examenul biochimic al sângelui s-a realizat în vederea determinării prezenței unei afecțiuni renale, parametrii determinați confirmând simptomatologia evidențiată.

Din tabelul 2 se observă valorile foarte mari ale creatininei și ale azotului ureic, valori medii duble în cazul BUN și aproape duble în cazul creatininei. Astfel BUN are o valoare medie pentru cei 12 subiecți de 58,58±18,40 mg/dl față de o valoare normală de 8,8-26 mg/dl. Deasemenea,valori crescute am întâlnit la creatinină cu 2,8±1,35 mg/dl față de 0,5-1,6 cât se întâlnește în mod normal.

S-au realizat determinări biochimice și pentru ALT, amilază sau glucoză, determinări ce au vrut să excludă existența altor leziuni organice. Cum singurele modificări observate au fost la nivelul BUN, creatininei și proteinelor totale s-a putut stabili cu certitudine existența unei afecțiuni renale.

Tabelul 2

Rezultatele determinărilor biochimice efectuate la cei 12 subiecți

Nr. crt.	Parametrul biochimic determinat					
	BUN (mg/dl)	Creatinină (mg/dl)	Proteine totale (g/dl)	Glicemie (mg/dl)	Amilază (μ/l)	ALT (μ/l)
1.	74,4	3,5	4,9	74,3	766,4	45,9
2.	63,9	3,2	4,7	102,9	1320,6	61,5
3.	101,1	6,5	3,2	83,8	1669,0	66,9
4.	54,3	1,9	3,8	76,9	966,9	34,6
5.	47,9	2,5	5,2	77,9	1002,0	62,2
6.	63,9	2,7	4,9	56,5	1876,3	52,5
7.	76,3	3,1	4,8	178,9	2187.9	44,9
8.	39,8	1,8	6,1	112,5	732,9	32,7
9.	43,8	2,3	5,3	76,7	232,1	37,9
10.	54,0	3,1	3,6	70,0	2321,4	43,0
11.	39,7	1,6	4,7	67,9	1076,9	32,8
12.	43,9	1,4	5,4	87,7	987,3	21,8
Medie	58,58± 18,40	2,8± 1,35	4,71± 0,82	88,83± 32,12	1070,12± 586,58	44,72± 13,83
Referință (Merck 8th Edition)	8,8-26	0,5-1,6	5,5-7,5	62-108	270-1462	8,2-57

Examenul ecografic efectuat la 7 cazuri a pus în evidenţă îngroşarea peretelui gastric la 5 din subiecţi asociată alterării ecogenităţii şi fără păstrarea individualizării straturilor ce îl compun. Deasemenea s-a constatat creşterea în dimensiuni a faldurilor rugale cu pierderea stratificării şi cu mineralizarea mucoasei gastrice. Mineralizarea mucoasei apare ca o linie puternic ecogenică la suprafaţa mucoasei gastrice. La 4 din cele 5 cazuri la care s-a constatat îngroşarea peretelui gastric aceasta a fost difuză iar la un caz a fost localizată la nivelul zonei fundice.

În ceea ce privesc leziunile renale s-a constatat atrofie renală la 5 cazuri şi creşterea în dimensiuni a rinichilor în 2 cazuri. S-a remarcat creşterea ecogenităţii la nivelul zonei medulare precum şi imposibilitatea individualizării clare dintre corticală şi medulară. Tot la examinarea ecografică renală s-a observat la 2 cazuri prezenţa unui inel hiperecogen la exteriorul corticalei, prezenţă ce denotă existenţa unei inflamaţii.

Fig. 1 ***Nefrită cronică – zonă centrală hiperecogenă şi pierderea individualizării între medulară şi corticală***

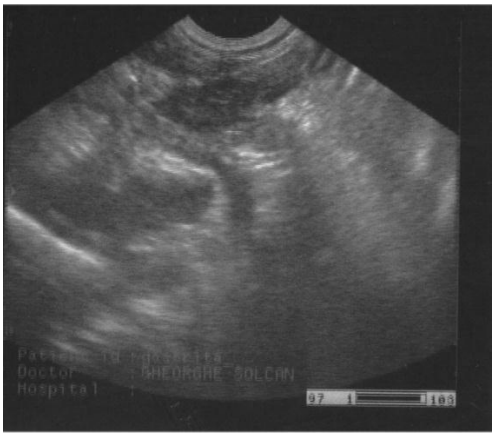


Fig. 2 ***Aspect ecografic al stomacului cu mucoasa îngroşata difuzşi fără păstrarea individualizării structurilor parietale***

La 2 subiecţi s-au observat şi semne asociate ulcerului gastric cu evidenţierea sângelui localizat intraluminal sub forma cheagurilor, zone focale hiperecogenice şi spasm parietal.

Examenul radiologic efectuat cu substanţă de contrast a pus în evidenţă ariile gastrice afectate şi deasemenea leziunile renale. S-a putut observa opacitatea crescută la nivel renal însoţită de creşterea în dimensiuni a parenchimului renal la 4 cazuri şi scăderea dimensiunilor acestuia la 6 cazuri din cele examinate. S-au remarcat deasemenea leziunile de gastrită ulceroasă la 3 din subiecţii examinaţi cu evidenţierea zonelor preulceroase şi ulceroase (fig. 4), celelalte cazuri luate în studiu prezentând leziuni gastrice nespecifice (fig. 3).

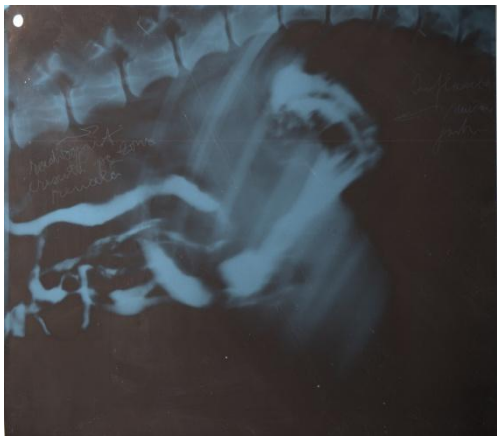


Fig. 3. ***Opacitate crescută la nivelul zonei renale cu îngroşarea mucoasei gastrice***

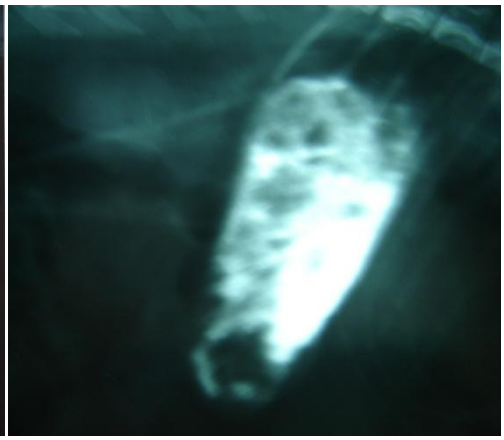


Fig. 4. ***Gastrită cu prezența zonelor preulceroare în zona mediană și zone ulceroase în porțiunea superioară a stomacului***

Consecutiv efectuării examenelor paraclinice se poate stabili cu acuratețe diagnosticul de gastrită aceasta fiind datorată leziunilor de nefrită cronică.

CONCLUZII

1. Diagnosticul gastritelor secundare nefritei cronice este complex, pentru confirmarea acestuia apelându-se la examenele paraclinice de biochimie și la cele imagistice.
2. Examenul ecografic a putut stabili modificările survenite la nivel gastric precum și pe cele renale, la 71,42% din câinii cărora li s-a efectuat examen ecografic putându-se observa leziunile structurale parietale.
3. Examenul radiologic a realizat confirmarea de certitudine a afecțiunilor gastrice precum și prezența modificărilor renale.
4. Examenul biochimic sanguin a evidențiat valori crescute ale azotului ureic (58,58±18,40 mg/dl) și creatininei (2,8±1,35 mg/dl) și valori scăzute ale proteinuriei (4,71±

BIBLIOGRAFIE

1. Bârză H., May I., Ghergariu S., Hagiu N., 1992, Patologie şi clinică medicală veterinară. Ed.didactică şi pedagogică, Bucureşti.
2. Ghergariu S., 1994-1995, Bazele patologiei medicale a animalelor domestice., vol.I-II, Ed. ALL., Bucureşti.
3. Hall E., Simpson J., Williams D., 2005, BSAVA Manual of canine and feline gastroenterology, 2nd Edition, BSAV[A].
4. Solcan Gh., Boghian V., Rollin F., 2005, Patologie și clinică medicală veterinară, Ed. „Ion Ionescu de la Brad", Iași.
5. Vulpe V., 2003, Semiologie medicală veterinară, Ed. Pim, Iași.

STUDIU EPIDEMIOLOGIC PRIN ELISA ASUPRA PARAZITISMULUI CU *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. LA MIEI [1]

EPIDEMIOLOGICAL STUDY USING ELISA ON THE PARASITISM WITH *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. AT LAMBS

NARCISA MEDERLE, K. IMRE, GH. DĂRĂBUŞ, I. OPRESCU., S. MORARIU, M. ILIE, D. INDRE, A. BALINT, MIRELA PALCA, IONELA HOTEA
Facultatea de Medicină Veterinară, Disciplina de Parazitologie, Timişoara, România
narcisa.mederle@yahoo.com

We performed an epidemiological study in January – April 2008 on 66 lambs (3 weeks old) from four counties of Roumania: Arad, Bihor, Satu-Mare and Timiş. The faeceas were individual prelevated from rectum and examined for Cryptosporidium, rotavirus, coronavirus and E. coli F5. This study was performed with ELISA - BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) kit. The criptosporidium prevalence in lambs was 9,09 %. The rotavirus infection prevalence in lambs was 1,51 %. We diagnosed neither coronavirus infections, nor association between enteropathogens.

Key words: criptosporidium, lamb, ELISA

Criptosporidioza ovină a fost descrisă pentru prima oară la mieii cu diaree în Australia de către Baker şi Carbonell în 1974. Mai mulţi autori l-au raportat ca principal enteropatogen la această specie cu un procent crecut de morbiditate şi mortalitate în efectivele în care evoluează (5, 6, 10). Pierderile economice se reflectă nu numai prin mortalitate şi morbiditate crescută, ci şi prin reducerea sporului în greutate, asistenţă veterinară şi alte investigaţii suplimentare de laborator.

Larga răspândire a criptosporidiilor la miei este demonstrată printr-o serie de investigaţii epidemiologice efectuate prin metode microscopice şi de biologie moleculară (4,12). Pe plan naţional criptosporidioza ovină a fost investigaţă în mai multe zone, în special în partea centrală a Ardealului, dar nu şi în zona de vest a României. Interacţiunea criptosporidiilor cu alţi enteropatogeni precum şi ponderea acestora în etiologia polifactorială a diareii la mieii nou născuţi sunt două motive pentru iniţierea unor cercetări în acest domeniu.

Luând în considerare cele expuse mai sus, prezenta investigaţie îşi propune să aducă date noi fundamentate ştiinţific în cunoaşterea epidemiologiei criptosporidiozei mieilor în zona de vest a României.

MATERIALE ŞI METODE

Investigaţiile epidemiologice au fost efectuate în perioada ianuarie-aprilie 2008, pe un efectiv de 66 de miei în primele trei săptămâni de viaţă cu proveniență din cinci localităţi a patru judeţe vestice (Arad, Bihor, Satu-Mare şi Timiş) ale ţării. Pentru fiecare miel investigat s-a întocmit o fişă individuală care cuprindea: numărul matricol (la cele existente), vârstă şi sex.

Materiile fecale diareice au fost recoltate individual direct din rect, depozitate în coprocultoare şi examinate pentru cei patru enteropatogeni vizaţi: *Cryptosporidium*, rotavirusuri, coronavirusuri şi *E. coli* F5. Examinarea probelor s-a făcut prin tehnica ELISA utilizând kit-ul BIO-X EASY-DIGEST (BIO K 151) (Bio-X Diagnostics, Belgia) care este un kit de diagnostic antigenic „in vitro" din fecale şi care respectă principiile tehnicii ELISA „dublu – sandwich".

1 Cercetări finanţate din grant 51-034

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele investigaţiilor epidemiologice efectuate la tineretul ovin în câteva localităţi din patru judeţe vestice ale ţării sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 1

Localitatea	Nr. Probe	Probe pozitive pentru				Negative
		Rotavirus	Coronavirus	*E. coli* F5	*Cryptosporidium spp.*	
Carei	20	1	0	0	0	19
Finiş	8	1	0	0	0	7
Arad	8	0	0	0	2	6
Bazoşu Nou	18	2	0	0	1	15
Timişoara SDE	12	1	0	1	3	7
Total	**66**	**5**	**0**	**1**	**6**	**54**

În localitatea Carei (judeţul Satu Mare) o probă din 20 prelucrate a fost pozitivă pentru infecţia cu rotavirusuri. Nu s-au identificat infecţii cu *Cryptosporidium* spp.

În localitatea Finiş (judeţul Bihor) o probă din opt analizate a fost pozitivă la infecţia cu rotavirusuri. Nu s-au identificat infecţii cu *Cryptosporidium* spp.

În localitatea Arad (judeţul Arad) două probe din opt prelucrate au fost pozitive pentru infecţia cu *Cryptosporidium* spp.

În localitatea Bazoşu-Nou (judeţul Timiş) într-o singură probă din 20 analizate s-au diagnosticat oochisturi de *Cryptosporidium* spp. Alte două probe au fost pozitive pentru infecţia cu rotavirusuri.

În Staţiunea Didactică şi Experimentală Timişoara (judeţul Timiş) în trei probe din 12 prelucrate s-au evidenţiat coproantigene de *Cryptosporidium* spp. În alte două probe s-au diagnosticat rotavirusuri respectiv infecţii cu *E. coli* F5.

În nici una din fermele luate în studiu, coronavirusurile nu a fost identificate, ca fiind implicate în producerea diareei la tineretul ovin.

Studiul materiilor fecale prin tehnica ELISA, privind ponderea agenţilor enteropatogeni implicaţi în producerea diareilor la tineretul ovin, arată că:

- *Cryptosporidium* spp. a fost identificat la un număr de şase probe din 66 analizate neasociat cu alţi enteropatogeni investigaţi
- rotavirusurile au fost întâlnite în cinci probe din 66 analizate, în toate cazurile ca unici agenţi patogeni;
- E. coli F5 a fost diagnosticat într-o singură probă din 66 analizate.

Rezultatele anchetei epidemiologice, privind modul în care vârsta influenţează extensivitatea infecţiei cu enteropatogeni la tineretul ovin arată că trei cazuri au fost diagnosticate la categoria de 0-7 zile şi alte trei cazuri la categoria de 7-14 zile. Din cele cinci cazuri de rotaviroză două au evoluat în prima săptămână de viaţă, unul în a doua săptămână şi celelate două la categoria de 14-21 de zile. Colibaciloza, identificată într-un singur caz, a fost semnalată la un miel în vârstă de patru zile.

Pe ansamblu, prevalenţa infecţiei criptosporidiene la tineretul ovin investigat a fost de 9,09 % cu variaţii între cele cinci localităţi în care s-au făcut investigaţii de la 0 % la 25 %.

În tabelul 2 sunt prezentate, ca şi termeni de comparaţie, rezultatele mai multor studii epidemiologice "non - moleculare" asupra prevalenţei criptosporidiozei ovine efectuate în diferite arii geografice.

Tabel 2 - Prevalenţa criptosporidiozei la miei determinat prin metode microscopice în diferite arii geografice [după Santín şi Trout, 2007, modificat].

Ţara	Nr. de animale	Prevalenţa (% pozitive)	Referenţi
Egypt	120 miei	36-82 %	Abd-El-Wahed şi col. 1999 (1)
Marea Britanie	90 miei	53-74 %[a]	Chalmers şi col., 2005 (4)
Marea Britanie	255 miei	12,9 %	Sturdee şi col., 2003 (10)

continuare tabel 2

Mexic	556 miei	33,5 %	Alonso-Fresan şi col., 2005 (2)
Polonia	60 miei	18,3 %	Majewska şi col., 2000 (6)
Serbia	126 miei	42,1 %	Mišič şi col., 2006 (7)
Spania	583 miei	59 %	Causapé şi col., 2002 (3)
Spania	69 miei	1,45 %	Villacorta şi col., 1991 (11)
S.U.A.	32 miei	84,4 %	Xiao şi col., 1993 (12)
S.U.A.	31 miei	77,4 %	Santín şi col., 2007 (9)
Trinidad şi Tobago	90 miei	20 %	Kaminjolo şi col., 1993 (5)
Ungaria	53 miei	22,6 %	Nagy, 1995 (8)

Proporţia criptosporidiozei la miei, prezentată în acest studiu (9,09 %), se înscrie în limite foarte variabile întâlnite, de altfel, în toată Europa şi, în general în lume. În acest sens, procente mai apropiate privind criptosporidioza la miei sunt relatate în Marea Britanie (12,9 %) [10], Polonia (18,3 %) [6], Trinidad şi Tobago (20 %) [5] şi Ungaria (22 %) [8]. Prevalenţe mult mai mari comparativ cu cele obţinute în acest studiu au fost raportate în Serbia (42,1 %) [7], Spania (59 %) [11] şi S.U.A. (84,4 %) [12].

CONCLUZII

1. Prevalenţa infecţiei criptosporidiene la tineretul ovin investigat a fost de 9,09 %.
2. Prevalenţa infecţiei cu rotavirusuri la tineretul ovin investigat a fost de 7,57 %.
3. Prevalenţa infecţiei cu rotavirusuri la mieii investigaţi a fost de 1,51 %.
4. Nu s-au diagnosticat infecţii cu coronavirusuri sau asociaţii între enteropatogeni.

BIBLIOGRAFIE

1. **ABD-EL-WAHED, M.M.** 1999. *Cryptosporidium* infection among sheep in Qalubia Governatore, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 29: 113-118
2. **ALONSO-FRESAN, M.U., GARCIA-ALVAREZ, A., SALAZAR-GARCIA, F., VAZQUEY-CHAGOYAN, J.C., PESACADOR-SALAS, N., SALTIJERAL-OAXACA, J.,** 2005. Prevalence of *Cryptosporidium* in asymptomatic sheep in family flocks from Mexico State. *J. Vet. Med.* 52: 482–483.
3. **CAUSAPÉ, A.C., QUILEZ, J., SANCHEZ-ACEDO, C., DEL-CACHO, E., LOPEZ-BERNAD, F.** 2002. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 104: 287–298.
4. **CHALMERS, R.M., FERGUSON, C., CACCIÒ, S., GASSER, R.B., ABS EL-OSTA, Y.G., HEIJNEN, L., XIAO, L., ELWIN, K., HADFIELD, S., SINCLAIR, M. AND STEVENS, M.** 2005. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int. J. Parasitol.* **35**: 397–410.
5. **KAMINJOLO, J.S., ADESIYUN, A.A., LOREGNARD, R., KITSON-PIGGOTT, W.** 1993. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in livestock in Trinidad and Tobago. *Vet. Parasitol.* 45: 209–213.
6. **MAJEWSKA, A.C., WEMER, A., SULIMA, P., LUTY, T.** 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. *Vet. Parasitol.* 89: 269–275.
7. **MISĬC, Z., KATI´C-RADIVOJEVIC, S. A., KULIS˘I´C, Z.** 2006. *Cryptosporidium* infection in lambs and goat kids in Serbia. *Acta Vet.* (Beograd) 56: 49–54
8. **NAGY, B.** 1995. Epidemiologic data on *Cryptosporidium parvum* infection of mammalian domestic animals in Hungary. Magyar Allatorvosok Lapja **50**: 139–144.
9. **SANTIN, M., TROUT, J.M., FAYER, R.** 2007. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet. Parasitol.* 146: 17–24.
10. **STURDEE, A.P., BODLEY-TICKELL, A.T., ARCHER, A., CHALMERS, R.M.,** 2003. Long term study of Cryptosporidium prevalence on lowland farm in the United Kingdom. Vet. Parasitol. **116**: 97-113.
11. **VILLACORTA, I., ARES-MAZAS, E. AND LORENZO, M.J.** 1991. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (N.W. Spain). *Vet. Parasitol.* 38: 249–252.
12. **XIAO, L., HERD, R. AND RINGS, D.** 1993. Diagnosis of *Cryptosporidium* on a sheep farm with n
13. eonatal diarrhea by immunofluorescence assays. *Vet. Parasitol.* 47: 17–23

DIAGNOSTICUL ECOGRAFIC AL ENDOCADIOZEI VALVULARE MITRALE LA CÂINII METIŞI AI RASELOR DE TALIE MICĂ

ULTRASOUD DIAGNOSIS OF DEGENERATIVE MITRAL VALVE DISEASE ON SMALL CROSSBREED DOGS

DIANA MOCANU, N. HAGIU
Facultatea de Medicina Veterinara Iasi
mocanu.diana@uaiasi.ro

The aim of the study is to diagnose by ultrasound method degenerative mitral valve disease and evaluate the consequences of mitral insufficiency. Based on ecographic quantitative variables and symptoms of the patient, we tried to establish a correspondence between them.

15 small crossbreeds dog were diagnosed with degenerative mitral valve disease, based on direct and indirect ultrasound signes. We evaluate the LA/Ao, LVDs, LVDd and SF to establish the echocardiographic stage of the disease and we correlate them with the clinical variables.

MVD was more frequent in males (73,33%) then in females. Using the clinical signs we classified in ISACHC classes all the dogs: class I 26,66% (4), class II 40% (6) and class III 33,33% (5).The minimum average of LA/Ao ratio was 1,02 for class I dog, and the maximum average vas 2,23 for class III dog.

The ecographic stage of the disease it is well correlated with the ISACHC heart failure classification. From all ecographic parameters evaluated, the left atrium to aorta ratio is the best indicator of the heart failure class. Shortening fraction (SF) during the evolution of the disease it stays in normal limits or can increase in stage 3, but it can not be used as an indicator of mitral valve disease.

Key words: degenerative mitral valve disease, echocardiography, heart failure, small crossbreed dog

Endocardioza valvulară, cunoscută şi sub denumirea de boală degenerativă valvulară este cea mai frecventă cardiopatie dobândită la câine. Leziunile degenerative apar cel mai frecvent la nivelul valvulelor atrioventriculare, cu precădere la nivelul valvulei mitrale[2]. Aceste leziuni se traduc prin coaptarea sistolică deficitară a foiţelor valvulare, ducând la refularea sângelui în atriul stâng.

Valvulopatia degenerativă se caracterizează macroscopic prin îngroşarea nodulară si scurtarea foitelor valvulare de la extremitate pana la baza[2,3].

Obiectivul lucrării este stabilirea ecografică a leziunilor ce apar în endocardioza valvulară mitrala la câinii de talie mică şi evaluarea consecinţelor fiziopatologice la nivelul cordului datorate insuficienţei mitrale. Totodată am urmărit corelarea parametrilor ecografici evaluaţi cu variabilele clinice observate.

MATERIAL ŞI METODĂ

In studiu au fost incluşi 15 câini, metişi ai raselor de talie mică (Pekinese, Teckel, Bichon, Cavalier King Charles şi altele), cu greutatea medie de 8,58±2,95kg. Examenul cardiologic s-a realizat în cadrul Clinicii de Medicală FMV Iaşi.

Fiecărui pacient i s-a întocmit fişa clinică cardiologică cu ajutorul căruia am stabilit gradul de insuficienţă cardiacă (IC) conform recomandărilor ISACHC[6]. Variabilele clinice urmărite au fost: aspectul mucoaselor aparente, timpul de reumplere capilară, tipul şi localizarea suflului cardiac, tusea (apariţia ei, tipul, momentul apariţiei), toleranţa la efort, ascita (prezenţa sau absenţa ei).

Ecocardiografia transtoracică s-a realizat cu sondă microconvexă cu frecvenţa de 5-7,5 Mhz. Toate examinările s-au realizat pe animale vigile şi în poziţie patrupodală, uşor contenţionate.

Măsurătorile ventriculare au fost realizate pe imaginile obținute în modul M cu ghidaj bidimensional în secțiunea transventriculară (axul scurt la nivelul cordajelor tendinoase). Parametrii evaluați au fost: grosimea septumului interventricular în sistolă şi diastolă (SIVs şi SIVd), diametrul ventriculului stâng în sistolă şi diastolă (DVSs şi DVSd) şi grosimea peretelui liber al ventriculului stâng în sistolă şi diastolă(GPLVSs şi GPLVSd). În funcție de aceşti parametrii am calculat fracția de scurtare (FS = DVSd-DVSs/DVSd). Măsurătorile la nivelul aortei şi a atriului stâng s-au efectuat în secțiunea bidimensională transaortică în diastolă, urmărind diametrul aortei (Ao) şi diametrul atriului stâng (AS).

Diagnosticul de endocardioză valvulară mitrală (EVM) l-am stabilit pe baza : 1.anamnezei (în istoricul recent al pacientului nu s-au înregistrat boli infecțioase); 2.prezența suflului sistolic apexian stâng (de diferite intensități); 3. semnele ecografice directe şi indirecte. Semnele directe (îngroşarea şi/sau scurtarea foițelor valvulare mitrale şi hiperecogenitatea cordajelor tendinoase) s-au observat în abordare parasternală dreaptă cu vederea în axul lung pe secțiunea celor 4 camere. Semnele indirecte (consecințele insuficienței mitrale) l-am evaluat prin calculul raportului între diametrului atriului stâng (AS) si diametrul aortei (Ao) în diastolă.

Toți pacienții au fost evaluați de acelaşi examinator (DM).

REZULTATE ŞI DISCUȚII

Distribuția celor 15 pacienți în funcție de vârsta si sex este redată in tabelul nr.1.

Din această populație diagnosticată cu EVM procentul cel mai mare a aparținut masculilor 73,33% (11/15). Mai multe studii au arătat că atât prevalența, cât şi evoluția EVM sunt dependente de sex, însă până în prezent nu s-au realizat investigații în această direcție [2,4]. Şi în acest studiu EVM la masculi a fost superioara femelelor. Totuşi a fost emisă o ipoteză în acest sens care implică efectul protector al hormonilor estrogeni, însă studiile realizate pe animale castrate au relevat aceleaşi valori.

Vârsta medie a pacienților a fost de 11± 3,27 ani, cel mai tânăr câine având vârsta de 4 ani, iar cel mai bătrân de 16 ani. Relația între vârstă şi prevalența acestei patologii bine cunoscută din literatura de specialitate, ce descrie ca medie de vârstă pentru apariția EVM între 9-11ani.

Tabel nr.1 – Caracteristicile pacienților diagnosticați cu EVM

Câini	Metişi	nr. 15 (100%)
Sex	Masculi	11 (73,33 %)
	Femele	4 (26,66 %)
Vârsta (ani)		11 ± 3,27

Semnele directe observate ecografic (figura nr.1) în patologia EVM au fost reprezentate de: aspectul neregulat, îngroşat şi scurtat al foițelor valvulare, rotunjirea vârfurilor si hiperecogenitatea cordajelor tendinoase aferente valvulei mitrale.

Numărul cel mai mic de pacienți (4/15) din acest grup a fost reprezentat de câinii asimptomatici, care au fost incluşi în primul stadiu al IC pe baza prezenței suflului sistolic apexian stâng. Tusea cronică şi dispneea au reprezentat cele mai frecvente semne clinice, la 80% (12/15) dintre câini, fiind principalele motive de prezentare la consultație. În funcție de gravitatea dispneei şi momentul apariției tusei, pacienții au fost încadrați în stadiile de insuficiență cardiacă II şi III. Prezența epanşamentului abdominal s-a constatat numai la câinii (5/15) aflați în stadiul al III-lea de IC, agravând dispneea deja existentă.

În funcție de parametrii ecocardiografici urmăriți am calculat la toți pacienții examinați doi indici: raportul AS/Ao şi FS.

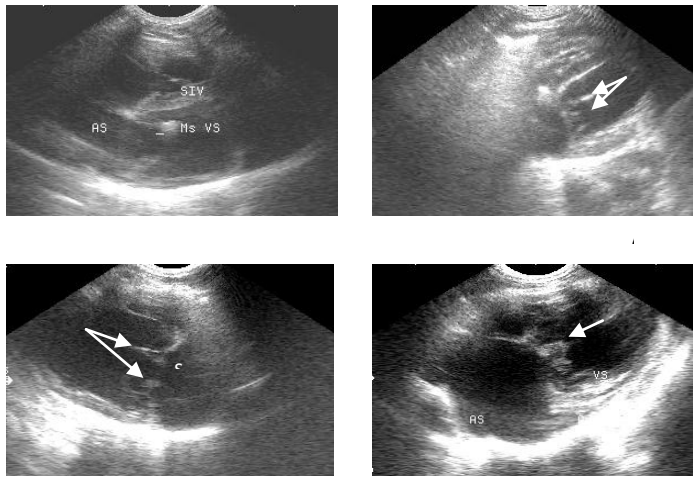


Figura nr. 1 Diferite aspecte ecografice ale valvulei mitrale în secţiunea celor 4 camere, vederea în axul lung cu abordare parasternală dreaptă. A. Aspect nodular al foiţei mitrale septale; B. Hiperecogenitatea cordajelor tendinoase aferente valvulei mitrale; C. Scurtarea şi aspectul neregulat al foiţelor valvulei mitrale; D. Îngroşarea foiţelor mitrale.
AS - atriul stâng, VS- ventriculul stâng, SIV- septumul interventricular, C-cordajele tendinoase, Ms–foiţa valvulară mitrală septală, Mp–foiţa valvulară mitrală parietală

Raportul As/Ao reprezintă un indice al gradului de dilataţie atrială[3,4] Acesta s-a corelat semnificativ statistic (p<0.001) cu gradul de IC. Valoarea medie raportului AS/Ao de 2,02 ± 0,21 a fost obţinută la pacienţii cu IC de gradul III, valoarea maximă fiind 2,23, iar la câinii cu IC de gradul I valoarea medie obţinută a fost 1,2±0,17 cu valoarea minimă de 1,02.

Al doilea indice evaluat FS nu s-a corelat semnificativ statistic cu stadiul de IC.

FS, al doilea indice calculat, ce permite aprecierea contractilităţii ventriculului stâng, nu s-a corelat semnificativ statistic cu gradul de IC. Valorile medii înregistrate la pacienţii în stadiul I şi II de IC s-au păstrat aproximativ constante 39,75 % si 39,91%, in limitele de referinţa, crescând la cei în stadiul III de IC la valoarea medie de 48,6%, peste limita maximă pentru rasele de talie mica.

Tabel nr.3 Parametrii ecocardiografici evaluaţi la 15 câini diagnosticaţi cu EVM

	Gradul Insuficienţei cardiace după clasificarea ISACHC		
	IC I	IC II	IC III
Nr. de câini (%)	4 (26,66)	6 (40)	5 (33,33)
Raportul AS/Ao * *Valori normale 0,8-1,13*[3]	1,20 ± 0,17	1,67 ± 0,35	2,02 ± 0,21
FS% * *Valori normale 29-45%*[3]	39,75 ± 2,87	39,91 ± 11,03	48,6 ±11,1

** valoarea medie ± deviaţia standard*

Dilataţia atriului stâng apare datorită refulării sângelui în timpul sistolei ventriculare. Progresiv presiunea în camera atrială va creşte determinând implicit şi o creştere a presiunii la nivelul capilarelor venoase pulmonare ce se finalizează prin apariţia edemului pulmonar (insuficienţa cardiacă stângă), exprimat clinic prin tuse, dispnee şi intoleranţă la efort. Totodată prin volumul său, atriul stâng deplasează şi determină o presiune exterioară asupra trunchiului traheobronşic agravând simptomele respiratorii. Astfel cu cât atriul stâng a fost mai mare în volum cu atât simptomele fazei

decompensate s-au agravat, observând-se o corelare pozitivă între raportul AS/Ao şi stadiul de insuficienţă cardiacă. Acest indice ecografic este un indice valoros în stabilirea stadiului de evoluţie a insuficienţei cardiace determinată de EVM.

Valoarea fracţiei de scurtare depinde de diametrului cavităţii ventriculare în sistolă şi la sfârşitul diastolei. În timpul sistolei ventriculul stâng ejectează sângele, în primă fază, în camera cu presiune mai scăzută, adică spre cavitatea atriului stâng. În cea de a doua fază sângele este ejectat spre zona cu presiune crescută, adică spre aortă. În insuficienţa mitrală, neîntâmpinând nici o rezistenţă în prima fază a contracţiei diametrul cavitaţii ventriculare stângi va fi mai mic, sângele refulând în atriul stâng[2]. Astfel în urma calculului fracţia de scurtare va avea valori normale sau poate uşor crescute faţă de valorile de referinţă, chiar daca ar exista deja tulburări ale inotropismului cardiac. Un alt posibil motiv pentru care acest indice nu se corelează cu evoluţia semnelor clinice ale IC este că în patogeneza EVM leziunile degenerative apar la nivel valvular si nu afectează miocardul.[4]

Ecocardiografia bidimensională reprezintă singura metoda non-invaziva si in timp real de vizualizare şi caracterizare a valvulei mitrale şi a cordajelor tendinoase[3]. Observarea imaginilor în secţiunea celor 4 camere pe axul lung al cordului, in derulare cu frecventa scăzuta permite evaluarea morfologiei foitelor valvulare mitrale (septală şi parietală) şi cinetica acestora.

CONCLUZII

1. În studiu au fost luaţi 15 câini, metişi din rasele de talie mică, diagnosticaţi cu endocardioză valvulară mitrală pe baza simptomatologiei clinice coroborate cu examenul ecocardiografic.

2. În această populaţie cu media de vârstă de 11 ± 3,27 ani, prevalenţa bolii a fost mai mare la masculi decât la femele.

3. Semnele ecografice directe, esenţiale în diagnosticarea endocardiozei valvulare au fost reprezentare de modificări ale foiţelor valvulare mitrale observate în secţiunea axului lung al cordului pe imaginea celor 4 camere.

4. Raportul AS/Ao poate fi considerat un indice al gradului de evoluţie a IC, corelându-se pozitiv cu gravitatea simptomatologiei.

5. FS nu poate fi folosit ca un indicator al endocardiozei valvulare mitrale, necorelându-se cu gradul de IC.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Borgarelli Michele, Zini E., D'Agnolo G., Tarducci A., Santilli R.A., Chiavegato D., Tursi M., Prunotto M., Haggstrom J. – Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds, J Vet Cardiology vol 6, p27-34, 2004.
2. Chetboul Valerie – Maladie valvulaire degenerative du chien, Encyclopedie Veterinaire, Cardiologie 0600, Elsevier Masson Paris 2008
3. Chetboul Valerie, Pouchelon J.L., Dominique Tessier-Vetzel, Sophie Bureau-Amaglio, Blot S., Cotard J.P., Simon M., Tainturier D. – Echographie et Doppler du Chien et du Chat, Atlas en couleur; Ed. Masson, Paris 2005;
4. Serfass P., Chetboul Valerie, Sampedrano C. Carolina, Nicolle Audrey, Benalloul T., Laforge H., Gau C., Herbert C., Pouchelon J.L., Tissier R. – Retrospective studz of 942 small-sized dogs: prevalence of left apical systolic heart murmur and left-sided heart failure, critical effects of breed and sex, J. Vet. Cardiology vol.8, p 11-18, 2006;
5. Thomas WP, Gaber E. Cathy, Jacobs J.G., Kaplan M.P, Lombard W.C, Moise Sydney, Moses L.B. - Recommendations for standards in transthoracic 2-dimensional echocardiography in the dog and cat , J. Vet. Intern Med 7:247, 1993).
6. The International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC) – Recomandations for the diagnosis and the treatment of heart failure in small animals, ISACHC, p5, 2004.

CERCETĂRI PRIVIND DIAGNOSTICUL ÎN BOALA NAVICULARĂ LA CABALINE

RESEARCHES CONCERNING DIAGNOSIS OF NAVICULAR DISEASE IN HORSES

A. MUSTE, MELANIA CRIŞAN, FL. BBETEG, I. PAPUC , R. LĂCĂTUŞ, ALINA DONISĂ, M. MUSTE
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca
Facultatea de Medicină Veterinară
muste-aurel@email.ro

This study propose is to show some diagnoses methods in navicular diseases, and if exist the possibility to use them in that way, we speak about other tests than magnetic resonance and scintigraphy. In this way there have been taken in observation 17 horses, in an interval of two years (2007-2009).The diagnoses of those equine, has been catalogue in clinical exams and have been interpretated trough 4 manifestation degree and radiological exam; next we made a casuistry classification and appreciation following the elaborated criteria of Floyd Andreea (2007).

Also, we pursue the possibility of using echography as diagnoses test in navicular syndrome. After we made those exams, we can specify that radiological exam is relevant and easy to apply if the hoof is in right position. Trough clinical exam and his frame in appreciated criteria already known, we can suspect the navicular syndrome and the precise diagnoses is establish trough radiological exam and magnetic resonance. In our casuistry after the clinical, echography and radiological exam the modifications of navicular syndrome were: arthritis of navicular bone, bone degenerescence, inflammation of navicular bursa and navicular fracture.At the echographic exam, we can distinguish soft tissue modifications from the hoof area like: collateral-lateral-ligament desmita.

Key words: horse, navicular disease, diagnostic

Boala naviculară la cai este o afecţiune cronică degenerativă a bursei podotrochleare şi a osului navicular. Prin dispoziţia osului navicular în ansamblul arhitectonic al copitei, diagnosticul navicular se face cu multă dificultate.

În acest sens, scopul lucrării noastre este acela de a catagrafia metodele pe baza cărora să putem stabili şi preciza diagnosticul de navicuartrită.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul a fost realizat în intervalul a doi ani pe un număr de 17 cabaline de ambele sexe cu vârsta cuprinsă între 4-12 ani, prezentate la Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca pentru precizarea diagnosticului şi instituirea tratamentului. Toate cazurile fac parte din categoria cailor de muncă şi preponderent se deplasează pe terenuri dure.

Pentru diagnosticarea bolii naviculare s-a folosit examenul clinic şi examenul paraclinic.

Examenul clinic s-a efectuat prin inspecţie, palpaţie şi plimbare pe teren moale şi suprafaţă dură în aluri specifice în astfel de situaţii: pas, trap, canter.

Examenul clinic se începe prin aprecierea şi catalogarea sensibilităţii existente la nivelul copitei cu cleştele de încercat copita într-o succesiune cunoscută. Se continuă apoi cu testul de extensie interfalangiană prin proba planului înclinat pentru diagnosticarea naviculartritei. Un alt test este cel a flexiunii digitale atât în mod pasiv cât şi dinamic. Dacă există dubii se va efectua blocajul nervos şi articular al regiunii implicate. În cazuistica noastră la 4 cai am efectuat anestezia articulaţiei interfalangiene distale (pentru anestezia bursei naviculare, a osului navicular, a tălpii), iar la alţi 4 cai am efectuat anestezia bursei naviculare. Pentru anestezia locală am utilizat 3 ml Procaină 2%.

În urma evaluării prin examenul clinic pacienții au fost incluşi într-un sistem de notare de la 1 la 4 (tabel 1.).

Tabel 1. - Încadrarea cazuisticii prin examen clinic

Gradul afecțiunii	Nr. animale	Caracteristici
1	6	Sensibilitatea, durere, scurtarea pasului în repaus
2	4	Sensibilitate, şchiopătură, sprijin în pensă
3	4	Sensibilitate, durere, şchiopătură, poziția membrului flexat
4	3	Şchiopătură gradul II, flexia articulației în repaus

Din cazuistica consultată rezultă faptul că prin examenul clinic semnele de durere, sensibilitate, poziția de flexie sau demiflexie a extremității membrului afectat nu sunt suficiente pentru diagnosticul de naviculartrită.

Datorită acestui fapt s-a efectuat examenul radiologic la fiecare din cazurile suspecte de naviculartrită. Considerăm că examenul radiologic este examenul de bază în diagnosticarea afecțiunilor naviculare. Pentru un examen corect se fac mai multe expuneri precum: latero-medială, dorso-proximal-palmaro-distal, oblică, palmaro-proximal-palmară şi dorso-palmară. Pentru localizarea precisă a unor modificări se mai poate folosi expunerea dorsală oblică laterală de 45^0 în direcția palmar-lateral. Pentru o bună vizualizare a regiunii membrul trebuie descoperit, copita toaletată, iar cele trei lacune se vor umple cu un material a cărui radiopacitate este similară cornului copitei (se poate utiliza plastelina) pentru a evita suprapunerile spațiilor pline cu aer peste razele osoase. După examinare, în funcție de modificările locale întâlnite cazurile clinice au fost clasificate după criteriile catalogate de Floyd Andreea 2007. Această clasificare cuprinde patru grade a afecțiunilor naviculare pe baza modificărilor osoase şi evidențiate radiologic (tabel.2).

La examenul radiologic se pot evidenția numeroase tipuri de afecțiuni ale micului sesamoid precum: neregularități ale marginii distale, cu evidențierea canalelor osoase (fig.1), modificarea unghiului copitei (fig. 2), datorate poziției şi aplatizării cranio caudale a micului sesamoid, prezența de osteofite marginale, scleroză medulară, formațiuni chistice, abrazia zonei de alunecare a tendonului flexor digital profund sau neregularități ale acestui tendon.

Fig. 1. Neregularitatea marginii distale cu evidențierea canalelor osoase

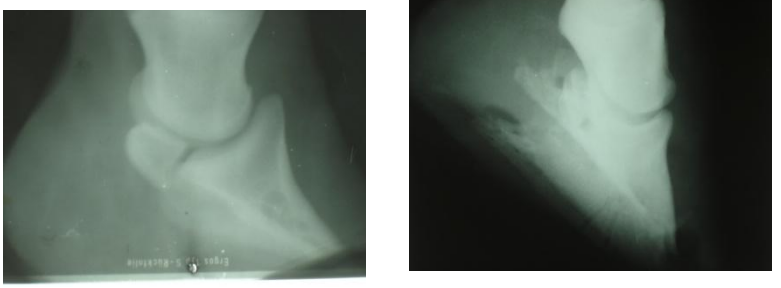


Fig.2. Modificarea unghiului copitei în sindromul navicular

Tabel 2. Clasificarea afecţiunilor naviculare prin examen radiologic

Grad leziun	Condiţie	Nr. cai exam.	Examen radiologic		
			Textura osului	Canalele vasculare	Marginile osului
0	Excelentă	-	Model trabecular fin, suprafaţa de contact dintre compactă şi spongioasă, la fel ca şi suprafaţa de inserţie a muşchiului flexor profund, sunt netede	Au dimensiuni reduse (0.1-0.3 mm) şi formă conică	Prezintă simetrie bilaterală
1	Bună	-	Model trabecular fin, suprafaţa de contact dintre compactă şi spongioasă, la fel ca şi suprafaţa de inserţie a muşchiului flexor profund, sunt netede	Unele canale au diametrul mărit (1-3 mm) şi formă modificată	Marginea distală are aspect rugos
2	Medie	8	Osteoporoză difuză sau, scleroza osului navicular la nivelul interfeţie dintre compactă şi spongioasă	Canalele osoase scurte alternează cu cele mărite în diametru, având formă conică sau ascuţită	Prezenţa fragmentelor osteocondrale
3	Slabă	4	Osteoporoză invazivă, scleroză osoasă cu pierderea liniei de demarcare dintre compactă şi spongioasă	Canale mărite în volum, de formă conică, ascuţită sau chiar rotundă	Prezenţa de neoformaţiuni osoase de-a lungul marginii proximale şi la nivelul extremităţilor laterale şi(sau mediale
4	Nesatis-făcătoare	5	Radioopacitate diminuată	Majoritatea canalelor osoase depăşesc dimensiunile normale, iar forma lor variază foarte mult	Extinderea neoformaţiunilor osoase, aspectul rugos al suprafeţei de inserţie a m. flexor profund, fractura osului navic

Examenul ecografic chiar dacă nu întotdeauna este relevant poate fi de un real ajutor în modificările ţesuturilor moi din boala naviculară pentru simplu motiv că metoda este puţin costisitoare şi non-invazivă. Pentru a fi edificatoare şi pentru ca ultrasunetele să străbată cornul copitei acesta trebuie pregătit prin aplicarea unui bandaj umed şi menţinerea lui pentru 30 de minute. La nivelul regiunii chişiţei şi al coroanei părul se tunde, iar regiunea se spală cu apă şi săpun după care se aplică gel ecografic pe regiunea examinată. Examinarea s-a efectuat cu sonda liniară având frecvenţa între 5-10 Mhz (fig.3).

Fig.3. Aplicarea sondei la nivelul

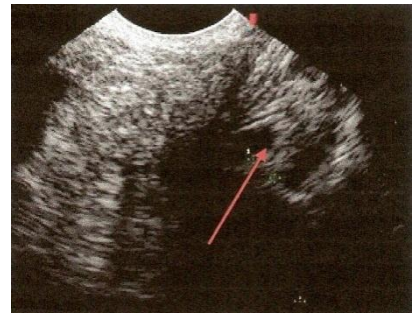


Fig. 4. Edemul bursei naviculare călcâiului

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Incidența naviculartritei la cabalinele de muncă este crescută în situația în care acestea se deplasează pe terenuri dure.

Examenul clinic exprimat prin poziția membrului afectat, prin sensibilitate, prin tocirea marginii anterioare a copitei, prin poziția în pensă, prin trecerea membrelor înaintea liniei de aplomb, nu sunt elemente certe diagnostic. Încadrarea cazuisticii în cele patru grade de apreciere relevă faptul că la toate cazurile se manifestă semne clinice de şchiopătură moderată, poziție antalgică fără caracteristicile certe pentru diagnostic de boală naviculară, dar cu suficiente elemente de orientare spre boala naviculară. De aceea trebuie efectuate şi alte examene.

Examenul radiologic se dovedeşte a fi extrem de important deoarece relevă cu acuratețe modificările locale apărute. În urma acestui examen, la cazuistica noastră, modificările locale au fost după cum urmează: naviculartrită la 8 cazuri, degenerescență naviculară la 6 cazuri, bursita navicularului 1 caz (fig.4), fractura osului navicular la 1 caz şi mineralizarea cartilajului micului sesamoid la 1 caz. Datorită spațiului limitat de la nivelul osului navicular, precum şi activității intense de la acest nivel, orice modificare sau leziune determină semne de şchiopătură sau impotență funcțională. Pentru a surprinde modificările de la acest nivel, trebuie o poziționare corectă a copitei sub un unghi de incidență care să permită vizualizarea modificărilor minore. La unele cazuri pentru o vizualizare şi interpretare corectă trebuie efectuate radiografii în diferite poziții. Modificările osoase identificate trebuie corelate cu vârsta, regimul de muncă şi cu antecedentele genetice.

Examenul ecografic rămâne o posibilitate complementară de evidențiere a modificărilor de la nivelul țesuturilor moi de la nivelul copitei.

Printr-o pregătire corespunzătoare a copitei şi a regiunii coronare, cu o sondă ecografică corespunzătoare se pot evidenția leziuni precum tendinita flexorului digital profund din zona de inserție, desmita ligamentului navicular, edem inflamator de la acest nivel, etc. La cazuistica luată în observație am evidențiat bursita naviculară la un caz care prezenta semne de naviculartrită.

CONCLUZII

1. Leziunile de la nivelul osului navicular sunt foarte variate, fiind întâlnite cu preponderență după vârsta de 4 ani.
2. Leziunile osoase de la acest nivel sunt preponderent cele inflamatorii, urmate de leziunile degenerative, fracturi şi bursite.
3. Prin examen radiologic se pot evidenția majoritatea leziunilor de la acest nivel cu condiția efectuării radiografiilor din mai multe poziții şi unghiuri. La cazurile dificile la care leziunile sunt ascunse sau de mică intensitate se recomandă efectuarea examenului de rezonanță magnetică acolo unde este posibil.

BIBLIOGRAFIE

1. Grewal J., S. McClure, L. Booth, R. Evans, Stephanie Caston, 2004 – Assessment of the ultrasonographic caracteristics of the podotrochlera apparatus in clinically normal horses and horses with navicular syndrome, JAVMA, Vol. 225, Nr. 12, USA.
2. Kristoffersen M., S. Dyson, M. Schramme, A. Boado Lama, 2004 – Magnetic Resonance Imaging and Scintigraphic Findings in Five Horses with Obscure Foot Lameness Associated with Penetrating Injuries, AAEP, USA.
3. McClure S. et all, 2004 – Extracorporal Shock Eave Theraphy for Treatment of navicular Syndrome, AAEP, Nr. 50, USA.
4. Ramey D., 2002 – Concise Guide to Navicular Syndrome in the Horse, Ed. Trafalgar Square Publishing, USA.
5. Sarratt S., D. Hood, 2005 – Evaluation of arhitectural changes along the proximal to distal regions of the dorsal laminar interface in the equine foot, AJVR, Vol. 66, Nr. 2, USA.
6. Vogel C., 2004 – Manual complet des soins aux chevaux, Ed. Vigot, Franța.

COMPUTER TOMOGRAPHY ASPECTS IN FRACTURES OF VERTEBRAL COLUMN IN DOG [1]

M. MUSTEAŢĂ[1], V. VULPE[1], S.I. IENCEAN[2], GH. SOLCAN[1]
[1] Faculty of Veterinary Medicine Iasi, M. Sadoveanu Alley, nº8, 700489
[2]Neurosurgery Hospital "N. Oblu" Iasi

Fractures of vertebral column were studied by radiology, mielography and computer-tomography in 7 adult dogs with street accidents. Computer-tomography allowed the localzation and evaluation of degree of compression of spinal cord. In our cases spinal cord compression was induced both by dorsal vertebral arch and by vicious calluses of vertebral body.The compression realized by dorsal vertebral arch induces a primary trauma on dorsal and dorso-lateral part of spinal cord affecting the fascicles involved in proprioceptive transmition and voluntary mouvements.Clinical recuperation of neurologial defficiences occured progressivelly, with aproximatively 2 Olby points/month, from 1 ± 1 to 7 ± 2,5.

Key words: vertebral colomn, fracture, dog, computer tomography

Computer tomography is used for diagnosis of traumatic, neoplasia, congenital, inflamatory or degenerative lesions of many organs.(2,3,5) The goal of the study was to evaluate the site and degree of medular compresion, in comparison with clinical answer in 7 dogs with trauma of spinal cord.

MATERIALS AND METHODS

Fractures of spinal cord were studied in 7 patients. Each patient was evaluated both clinically, by neurological and phisical exam and paraclinically (haematologic exam, blood biochemistry for liver and kidney prophyle, exam of cerebrospinal fluid) and by imagistic exam. Direct radiography and then mielography were performed to localize the traumatic lesion. Computer tomography – using the Siemens Emotion equipment was made both directly and with iodine contrast substance (Scan Lux, i.v., 750 mg/kg). The animals were generally anesthesied with medetomidine 0,03 mg/kg and ketamine 0,3 mg/kg. The patients recovery was apreciated using Olby recovery score (4)

RESULTS AND DISCUSSION

For all the 7 patients the cause of the fracture was the street accident. The most frequentlty involved were the segments Th3-L3 (in 6/7 patients). The segment L4-S3 of spinal cord were afected in 1/7 cases.

In patients with fracture of Th9-L1 segments paraparesis were installed suddenly, with signs of upper motoneuron (normo- or hyperrefflectivity of patelar and flexion reflexes), proprioceptive defficiency and hypersensitivity band at 1 or 2 vertebra after the site of traumatism. Deep pain – 4 hours after the trauma – was observed in 4/6 patients.

In patient with fracture of L4-S3 the signs of lower motoneuron were observed (hipo- or areactivity for patelar and flexion reflexes), faeces incontinency and partial urine incontinency, and absence of proprioception. (Table 1)

1.Researches financed from grant PN II 62-085

Table 1

Clinical aspects of the patients

Case n^{o}	Signalment	History	neurological examination	neurological localization	Imagistic findings
1	German shepard male, 3 y	street accident	NAT, UMN, SP T13, PR absent posterior T13, Schiff-Sherrington posture, DP 0	T3-L3	VC fracture T10-T11
2	Common rase, male, 5 y	street accident	HLr/l paresis, UMN, SP T12, DP +2 , RP absent posterior T13	T3-L3	VC fracture T9-T10
3	Bichon, female, 6 y	street accident	HLr/l paresis, UMN, DP +1, SP T12, RP absent posterior T11	T3-L3	VC fracture T9-T10
4	Pekingese, female, 3y	street accident	HLr/l paresis, UMN, DP +1 SP T10, RP absent posterior T10	T3-L3	VC fracture T8-T9
5	Common rase, male, 2 y	street accident	HLr/l paresis, UMN, DP 0, SP T13, RP decreased posterior T12	T3-L3	VC fracture T10-T11
6	German shepard male, 3 y	street accident	HLr/l paresis, UMN, DP +1, RP absent posterior L2	T3-L3	VC fracture T13-L1
7	Common rase, male, 1 y	street accident	HLr/l paresis, LMN, CP l+r absent, FLh r+l absent	L4-S2	VC fracture L7S1

CP – conscient proprioception
CT – computer tomography
DP – deep pain
FLh – flexion reflexus, hind limb
HL – hindlimb
L – left
LMN – lower motoneuron
NAT – nonambulatory tetraparesis
PR – panicular reflex
R – right
SP – superficial pain
TL – thoracolombar
UMN – upper motoneuron
VM – voluntary mouvements

Radiology and mielography evidentiated the site of spinal cord injury (Fig. 1, Fig. 2)

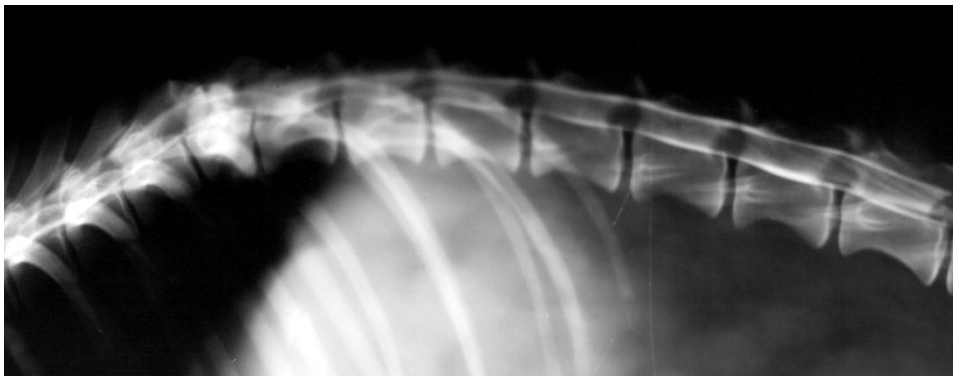


Fig. 1 –Pekingese, female dog 3 years old. Mielography – 2 months after the trauma. Fracture of the vertebral collumn, Th10; vicious callus. Deviation of contrast substance to medular channel. The image suggests an extramedular, extradural compression, dorso-ventrally. The subarahnoid lateral spaces are probably not affected.

Figure 2 – Common dog, 2 years. Mielography after atlantooccipital injection of the contrast medium. Fracture of Th10 and vicious callus, inducind a scoliotic posture. The contrast column are loosing progresivelly the intensity along the thoracal vertebrae and disappear at Th9. The deviation of contrast substance suggest an extradural, extramedular compression.

Computer tomography allowed the localization and evaluation of degree of medular compression. (Fig. 3-8)

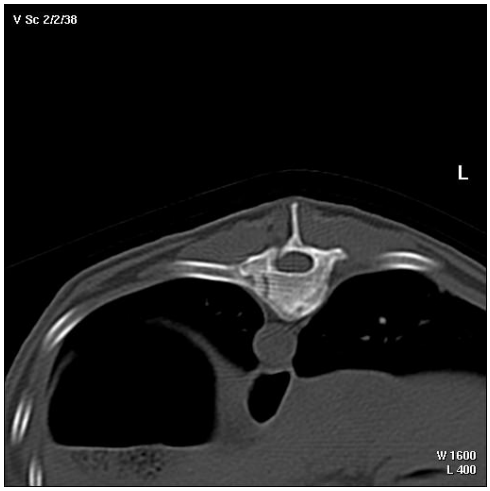


Figure 3 – Bichon, female dog, 3 years. Bone window. Fracture of certebral arch of Th10, with reparation callus. Dorsoventral compression of medula.

Figure 4 – The same case as in Fig.3. Bone window. Lateral reconstruction. Dorsal displacement of the medula and compression at the lvel of Th10.

In our cases spinal cord compression was induced both by dorsal vertebral arch and by vicious calluses of vertebral body.

The compression realized by dorsal vertebral arch induces a primary trauma on dorsal and dorso-lateral part of spinal cord affecting the fascicles involved in proprioceptive transmition and voluntary mouvements.

The indirect compression realized by passing the spinal cord ventrally, on the bottom of vertebral channel, also induces a slight antegrad compression realized by congestion of intravertebral venous plexus. In severe cases, compression of spinal cord ventrally, on the bottom of vertebral chanel, affecting the white substance of spinal cord induced the loose of cutaneus sensitivity and deep pain.

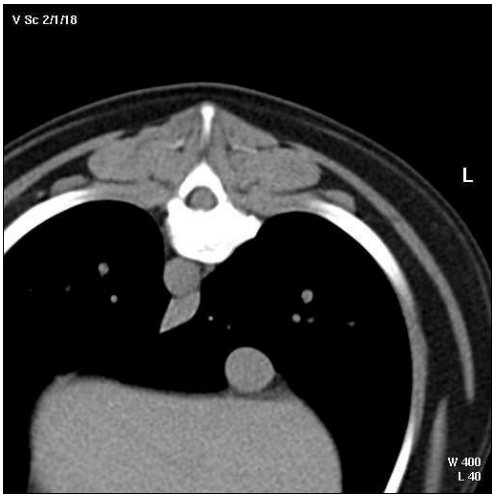


Figure 5 – Pekingese female dog. Native examination. Fracture of vertebral body Th10; vicious callus with excentric development on the left side.

Figure 6 – Pekingese female dog. Native examination. Fracture of vertebral body Th11 and of the vertebral arch. Vicious callus with loose of normal architecture of medular channel.

Figure 7 – Pekingese female dog. Lateral reconstruction of vertebral collumn. Dorsal displacement of the medulla and major strangulation zone of it on the level of Th11. Dimensions of the callus are observed.

Figure 8 – Pekingese female dog. Bone window at Th11. Fracture of vertebral body and dorsal arch, with vicious callus. Severe compression of spinal cord, both dorsoventrally and latero-median.

Clinically, the evaluation of Olby score for motility recuperation during 4 months was fair to good; aproximatively 2 point/month, from 1 ± 1 to 7 ± 2,5. The best Olby recuperation score was obtained in patient with fracture of L3-S1, and *cauda equina* paresis, finally it being of 11.

In spite of vicious calluses observed in all the cases, the architecture of spinal cord are progresively reorganized so as many of neurological defficiencies are recuperated during the time.

CONCLUSIONS

1. Fractures of vertebral column were studied by radiology, mielography and computer-tomography in 7 adult dogs with street accidents.
2. Computer-tomography allowed the localization and evaluation of degree of compression of spinal cord.
3. Clinical recuperation of neurologial defficiences occured progressivelly, with aproximatively 2 Olby points/month, from 1 ± 1 to 7 ± 2,5.

REFERENCE

1. Bhardwaj Anish, Ellegala B. Dilantha, Kirsch R. jeffrey, 2008, Acute brain and spinal cord injury – Evolving paradigms and management, Ed. Informa Healthcare NY, London,
2. Gandini G, Gentilini F, Cimatti L, Famigli Bergamini P, Cipone M., 2003 - Evaluation of the clinical signs and computed tomographic findings in 27 dogs with intracranial space-occupying lesions (1999-2000)., Vet Res Commun.; 27 Suppl 1:399-401.
3. Ohlerth S., Scharf G., 2007, Computed tomography in small animals – Basics principles and state of the art applications, The Veterinary Journal 173: 254-271
4. Olby Nj., De Risio L., Munana Kr., Wosar Ma., Skeen Tm., Sharp Njh., Keene Bw., 2001, Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries, AJVR, Vol 62, No. 10: 1624-1628
5. Polizopoulou ZS, Koutinas AF, Souftas VD, Kaldrymidou E, Kazakos G, Papadopoulos G., 2004 - Diagnostic correlation of CT-MRI and histopathology in 10 dogs with brain neoplasms., J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.;51(5):226-31

PHARMACOCLINICAL CONSIDERATIONS ON KETAMINE - DIAZEPAM, KETAMINE - ACEPROMAZINE AND PROPOFOL - BUTORPHANOL ANAESTHESIA IN DOGS

CONSIDERAŢII FARMACOCLINICE ASUPRA ANESTEZIEI CU KETAMINĂ – DIAZEPAM, KETAMINĂ - ACEPROMAZINĂ ŞI PROPOFOL – BUTORFANOL

Năstasă Valentin[1], Munteanu Nelu[2], Pavli Constantin[1], Mareş Mihai[1], Cernea Mihai[3], Cernea Cristina[3], Grecu Mariana[1], Moraru Ramona[1], Malic Luminiţa[1]

1. FMV-Iasi; 2. CSV-Vaslui; 3.FMV-Cluj Napoca

The study compared the pharmacoclinical effects following three injectable anaesthetic combinations having as main base the arilcyclohexamines group, represented by tiletamine and ketamine.

The observations were made on 60 clinical healthy bitches, of different ages and breeds that came to veterinary clinic Freyda vet SRL for ovariectomy. The bitches were randomly chosen in any of the A, B, C, groups. The following combinations were administered:

1. *Group A (n = 20) - 8 mg/kc ketamine and 1 mg/kc diazepam (I.M.).*
2. *Group B (n = 20) - 8 mg/kc ketamine and 0,5 mg/kc acepromazine (I.M.).*
3. *Group C (n = 20) - 0,25 mg/kc butorphanol (I.V.) and 4 mg/kc propofol (I.V. bolus).*

During the surgical act the anaesthesia was evaluated by assessing the following criteria: the incidence of voluntary and involuntary movements, intra operatory comfort and miorelaxation degree. The quality of these criteria was considered by taking into account the typical clinical manifestation of the dissociative anaesthesia.

For the criteria taken into study, significant data were registered between Group C and the other two groups (A and B), with an inferior risk of 5% ($p<0,05$). For the incidence of side effects were not registered significant differences among the study groups (A, B and C), with the exception of the muscular hypertonia.

Regarding the duration and quality of the surgical anaesthesia, it has been noticed that the Group C provides clearly superior significant results, in comparison with the other two groups.

Keywords: anaesthesia, arilcyclohexamines, propofol, dogs

The arilcyclohexamines (ketamine), due to „the safety" it proves when used and to easy administration, is frequently used in dogs' anaesthesia (**4**). Though, used separately, they cause beside anaesthesia some side effects that interacts and disturbs the intra operatory tranquillity and the safety of the patient. In order to eliminate or to reduce these side effects they were associated in our study with minor (diazepam) and major (narcoleptics - acepromazine) tranquilizers.

The aim of the study is to compare the pharmacoclinical effects of these 3 combinations: ketamine (8 mg/kc, i.m.)/diazepam (1 mg/kc, i.m.), ketamine (8 mg/kc, i.m.)/acepromazine (0,5 mg/kc, i.m.) with those of the combination propofol (4 mg/kg, i.v. bolus) - butorphanol (0,25 mg/kc, i.v.).

MATERIAL AND METHOD

Material

Animals

The observations were made on 60 clinical healthy bitches, of different ages and breeds that came to veterinary clinic Freyda vet SRL for ovariectomy, between 2006 - 2009. The history of the animals was without any diseases signs or previous surgical intervention. The animals selected for the study had a preoperatory diet (preparing diet) lasting for 12 hours.

Anaesthetic substances

The used substances are: Ketamine (Vetased®), Diazepam (Diazepam®), Acepromazine (Vetranquil®), Propofol (Recofol®), Butorphanol (Stadol®).

Method

Experimental design

Once it was made a lot of 3 bitches and after the general clinic examination, the bitches were weighted and randomly chosen in any of the A, B, C, groups. The following combinations were administered i.m.:

1. Group A (n = 20) - 8 mg/kc ketamine and 0,5 mg/kc acepromazine, i.m.;
2. Group B (n = 20) - 8 mg/kc ketamine and 1 mg/kc diazepam, i.m.;
3. Group C (n = 20) - 4 mg/kc propofol and 0,25 mg/kc butorphanol, i.v.

Concomitantly, there was prepared for each animal, beside the syringe with the whole dose, a syringe containing the half dosage, marking both the animals that needed supplementation of the dose, as well as the group they belong to.

At moment 0 it was administrated the contain of the syringe with integral dose, the animal was left for 10 minutes to calm down, time in which it was closely observed and tested. In the following 10 minutes the animal was prepared for the surgical intervention (disinfected), then transferred on the operation table and sterile sheets.

On minute 20 the dog was tested again and then again from 10 in 10 minutes till the end of the surgical act. The cutaneous incision was made on minute 20. After finishing the surgery (the ovariohysterectomy), the female is observed till she adopts the sternal decubitus.

During the surgical intervention, the quality of the anaesthesia was assessed by appreciating the following criteria: the incidence of the voluntary and involuntary movements, intraoperatory tranquillity and miorelaxation degree. The classification of these major assessment criteria of the dissociative anaesthesia on the combinations ketamine (8 mg/kc)/acepromazine (0,5 mg/kc), ketamine (8 mg/kc)/diazepam (1 mg/kc), propofol (4 mg/kc)/butorphanol (0,25 mg/kc), is presented in table 1**.**

The appreciation was made independently, by a specialised person, the opinion of the surgeon (the one who was performing the surgery) not being taken into consideration.

If the animal reaches 3rd level (stage 4), is administered again, intramuscularly, the contain of the half dosed syringe. If after 5 minutes from administration the dog does not present the criteria of an inferior level or if, during surgical act, presents again the signs of the 3rd level it will be administered half the integral dosage of the combination ketamine/diazepam, intravenously, in antebrachial cephalic vein, not taking into consideration the belonging group of the animal.

The observation was made based on certain clinical criteria. The clinical manifestations of the dissociative anaesthesia express the quality of these difficult criteria. The profound criteria of the classical anaesthesia, such as the absence of the palpebral or corneal reflexes, pupilar diameter, and ventral rotation of the ocular globs or the tonus appreciation of the maxillofacial muscles (buccinators) were not taken into account in this study. The only criteria that allowed the correct appreciation of the anaesthesia profoundness were respiratory and cardiac frequencies, the presence of movements and vocalises.

Table 1

Assessment criteria of the quality anaesthesia (anaesthetic efficiency) in dog

Level	Criteria
I. THE INCIDENCE OF THE VOLUNTARY AN INVOLUNTARY MOVEMENTS	
0	The absence of any movement type.
1	Body or limbs movements of weak amplitude, without disturbing the surgical act.
2	High amplitude isolated movements; the presence of the guts in surgical wound (isolated eventrations).
3	High amplitude generalised movements; the presence of the guts in surgical wound (isolated eventrations).
II. INTRAOPERATORY TRANQUILITY	
Excellent	The dog does not present any movements during the surgical act.
Good	The dog presents some movements during the surgical act, included in level 1.
Weak	The dog presents movements during surgical act, included in level 2
Insufficient	The dog presents movements during the surgical act, included in level 3 or in the case of repeated administration of a certain combination.
III. MIORELAXATION DEGEE	
Myorelaxation was carefully observed at 10, 20 and 30 minutes through subjective appreciation of the maseteric limbs extensor muscles tonus. Was marked as being *excellent, good, weak or absent*.	

There were also marked down the presence or the absence of different side effects due to arilcyclohexamines, such as: apneic respiration (with apneustic rhythm); hypersalivation; epiphora; agitated awaking.

Statistical analyse

The registered data were analysed from statistical point of view using chi^2 test with Yates as correcting factor with an inferior risk of 5% ($P < 0,05$).

RESULTS AND DISSCUTIONS

Results

Surgical tranquillity

Between group c on one hand, and the other two groups (A and B) on the other hand, was registered a significant difference having a risk inferior of 5% ($P < 0.05$) for the following criteria:

- excellent or good surgical tranquillity, 5 points (on 30, 60 and 90 minutes, it was significant after calculating with Yates correction factor);
- weak surgical tranquillity, 5 points (on 30, 60, and 90 minutes);
- insufficient surgical tranquillity, on 30 minute, between A and B groups. The registered data are presented in table 2, 3, and 4.

Table 2

Assessment of the intraoperatory calm quality after 30 minutes from mixtures administering in dog

Study Group	The studied combinations	The quality of the surgical tranquillity							
		Excellent		Good		Weak		Insufficient	
		no.	%	no.	%	no.	%	no.	%
A	Ketamine (8 mg/kc) and Acepromazine (0,5 mg/kc) (n = 20)	3	15	4	20	7	35	6	30
B	Ketamine (8 mg/kc) and Diazepam (1 mg/kc) (n = 20)	2	10	4	20	5	25	9	45
C	Propofol (4 mg/kc) and Butorphanol(0,25 mg/kc) (n = 20)	12	60	8	40	0	0	0	0

Table 3

Evaluation of the intraoperatory calm quality after 60 minutes from mixtures administering in dog

Study Group	The studied combinations	The quality of the surgical tranquillity							
		Excellent		Good		Weak		Insufficient	
		no.	%	no.	%	no.	%	no.	%
A	Ketamine (8 mg/kc) and acepromazine (0,5 mg/kc) (n = 20)	1	5	1	5	7	35	11	55
B	Ketamine (8 mg/kc) and diazepam (1 mg/kc) (n = 20)	0	0	3	15	4	20	13	65
C	Propofol (4 mg/kc) and Butorphanol(0,25 mg/kc) (n = 20)	7	35	10	50	3	15	0	0

Table 4

Evaluation of the intraoperatory calm quality after 90 minutes from mixtures administering in dog

Study Group	The studied combinations	The quality of the surgical tranquillity							
		Excellent		Good		Weak		Insufficient	
		no.	%	no.	%	no.	%	no.	%
A	Ketamine (8 mg/kc) and acepromazine (0,5 mg/kc) (n = 6)	0	0	0	0	1	17	5	83
B	Ketamine (8 mg/kc) and diazepam (0,5 mg/kc) (n = 9)	0	0	0	0	0	0	9	100
C	Propofol (4 mg/kc) and Butorphanol (0,25 mg/kc) (n = 20)	1	10	6	60	2	20	1	10

Miorelaxation

For the excellent, good or absent miorelaxation criteria, was noted a significant difference between C group and the other two groups (A and B) with an inferior risk of 5% ($P < 0,05$) on 10, 20 and 30 minutes. There were no recorded significant differences regarding miorelaxation criteria between group A and B, the miorelaxation, rarely observed, was not overcoming 20 minutes in only one case. The registered data are presented in table 5, 6 and 7.

Table 5

Evaluation of myorelaxation quality after 10 minutes from mixtures administering in dog

Study Group	The studied combinations	The quality of the surgical tranquillity							
		Excellent		Good		Weak		Absent	
		no.	%	no.	%	no.	%	no.	%
A	Ketamine (8 mg/kc) and acepromazine (0,5 mg/kc) (n = 20)	1	5	2	10	3	15	14	70
B	Ketamine (8 mg/kc) and diazepam (1 mg/kc) (n = 20)	0	0	3	15	3	15	14	70
C	Propofol (4 mg/kc) and Butorphanol(0,25 mg/kc) (n = 20)	11	55	9	45	0	0	0	0

Table 6

Evaluation of myorelaxation quality after 20 minutes from mixtures administering in dog

Study Group	The studied combinations	The quality of the surgical tranquillity							
		Excellent		Good		Weak		Absent	
		no.	%	no.	%	no.	%	no.	%
A	Ketamine (8 mg/kc) and acepromazine (0,5 mg/kc) (n = 20)	0	0	2	10	1	5	17	85
B	Ketamine (8 mg/kc) and diazepam (1 mg/kc) (n = 20)	0	0	0	0	3	15	17	85
C	Propofol (4 mg/kc) and Butorphanol(0,25 mg/kc) (n = 20)	11	55	9	45	0	0	0	0

Table 7

Evaluation of miorelaxation quality after 30 minutes from mixtures administering in dog

Study Group	The studied combinations	The quality of the surgical tranquillity							
		Excellent		Good		Weak		Absent	
		no.	%	no.	%	no.	%	no.	%
A	Ketamine (8 mg/kc) and acepromazine (0,5 mg/kc) (n = 20)	0	0	1	5	1	5	18	90
B	Ketamine (8 mg/kc) and diazepam (1 mg/kc) (n = 20)	0	0	0	0	1	5	19	95
C	Propofol (4 mg/kc) and Butorphanol(0,25 mg/kc) (n = 20)	9	45	7	35	3	15	1	5

Other side effects

There were registered significant data between group C and the other two groups (A, B) for the relative criteria of the side effects of the arilcyclohexamines, other than muscular hypertonia (table 8). Between group A and B there were no significant differences.

Table 8

The side effects registered for 60 dogs taken into study

Side effects (n = 60)	Study Group		
	Ketamine (8 mg/kc) / acepromazine (0,5 mg/kc) (n = 20)	Ketamine (8 mg/kc) / diazepam (1 mg/kc) (n = 20)	Propofol (4 mg/kc) and Butorphanol (0,25 mg/kc) (n = 20)
Intermittent Apneea	85%	95%	95%
Respiratory frequency < than 20 respirations/minute	45%	35%	20%
Rigidity for extensor muscles of limbs	40%	5%	0%
Vocalizations	70%	35%	0%
Epiphora	10%	0%	0%
Hypersalivation	5%	0%	0%
Agitated awaking	35%	20%	1%

Discussions

Regarding the *duration of the surgical anaesthesia*, was noticed that group C offers significant results, superior, in comparison with the other two groups (A, B).

The propofol, administered as i.v. bolus, induces a profound anaesthesia (narcotic effect), easy to control land lasting longer than ketamine (1, 6). Acepromazine and diazepam are increasing the duration of the anaesthesia induced by ketamine if they are injected with a few moments before it (4), but, some authors consider that (5) a single dose of diazepam administered simultaneous with ketamine does not increase its duration. For a change, butorphanol administered with 10 minutes before propofol increases the duration of the last one and beside, offers a superior analgesia (9). These observations confirm the points of view from speciality literature and when the administration of the anaesthetic was made by intravenous administration of 4 mg/kc propofol (active principle sequential control release.) and 0,25 mg/kc butorphanol, recovering of the animal from anaesthesia (obtaining a stable sternal decubitus for the patient) was obtained in maximum 15 minutes from the end of the surgical act.

The superior duration of the anaesthesia observed on bitches belonging to C group is probably due to a more lasting action of the propofol, administered sequentially, and to a better synergic effect between this one and butorphanol, synthetic opioid, that corrects very good the analgesic deficiency of the first.

Regarding the *quality of the anaesthesia*, the results obtained for C group, are also superior to the results registered for the other two groups (A and B). It is proved once again that the propofol is a strong anaesthetic and much easier to control than ketamine. In addition, between these substances seems to be an synergic – potentiating effect of the anaesthetic and analgesic effects, butorphanol having hypoalgesic and sedative exceptional qualities, depending on the dose.

Myorelaxation, during the first 30 minutes of the anaesthesia was much better for the dogs belonging to C group. Hence, the strong myorelaxation observed on C group is due to propofol. From this point of view its efficacy is superior to the one duet o diazepam injected intramusculary together with ketamine.

If the percentage of the dogs that presents satisfying myorelaxation, is not significantly different between A and B group, it was observed on 45% from the bitches belonging to A group a strong hypertonia of the extensor muscles of the four limbs, although acepromazine has myorelaxing qualities (7). More, this hypertonia is due to the action of ketamine. It seems that acepromazine antagonises the hypertonia induced by ketamine in comparison with ketamine and diazepam.

Although, from the point of view of the quality of the anaesthesia, (its duration and of myorelaxation), it seems that is obtained a better synergic effect with ketamine/diazepam (or ketamine/acepromazine) when the tranquilizer is administered before ketamine or simultaneous intravenously. Diazepam seems to have a neglecting effect on respiratory function (3). In the speciality literature there are no data referring to a depressing respiratory effect of acepromazine. In change, arilcyclohexamines are responsible of a respiratory depression in proportion with administrated.

To be noticed the fact that the decrease of the respiratory frequency to less than 20 respiration per minute was developed in groups A and B (7 dogs out of 8) in the first 10 minutes after administrating the dosage of that combinations. This aspect was blamed on the cumulating effect of the ketamine, yet unmetabolised after the first administration and the second that it just been administered. On integral dosage, the criteria are observed with a high frequency also for C group. For this group (C), the respiratory depression is easy to be noticed in the first 10 minutes from the administration. This answer is typically for the hypnotic anaesthetics and is caused by the doses that inhibit the activity of the central inspiratory activity determining the increase of the blood concentration in CO2.

Respiratory depression and apnea are marked as being the most important side effects after intravenous administration of the propofol (2, 8).

CONCLUSIONS

1. The duration and the quality of the surgical anaesthesia induced by the propofol (4 mg/kc)/ butorphanol (0,25 mg/kc) association, administered intravenously in dog, are significant superior to the one induced by ketamine (8 mg/kc)/acepromazine (0,5 mg/kc) and ketamine (8 mg/kc)/diazepam (1 mg/kc) associations.
2. In order to induce a quality anaesthesia using this combination, avoiding at the same time the prolongation of the anaesthesia and overdosing, has to be taken into account correct establishment of the administrated dose and rhythm (frequency, speed).
3. Regarding the induced respiratory depression by butorphanol (0,25 mg/kc) propofol (4 mg/kc) combination, it may be important from clinical point of view.
4. The respiratory depressing effect observed for A and B groups (7 bitches out of 8 had below 20 respirations/minute) was thought to be due to cumulating effect of the ketamine as a result of incomplete metabolization after the first administration and second administration. This aspect confirms, partially, the facts from speciality literature that claim about arilcyclohexamines are responsible of a respiratory depression proportionally with the administered dose.

BIBLIOGRAPHY

1. **Ikiw, J., 2002** - Injectable Anesthesia in dogs - Part 2: Comparative Pharmacology. In: Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Comparion Animals. Gleed R.D. and Ludders, J.W. (eds) A.1415.0702.
2. **Ilkiw, J.E., Pascoe, P.J., Haskins, S.C., Patz, J.D., 1992** - Cardiovascular and respiratory effects of propofol administration in hypovolemic dogs. Am. J. Vet. Res.; 53(12): 2323-2327.
3. **Mama, R.K., Steffey, P.E., 2006** – Injectable Anesthesia: Dissociatives: Pharmacology and Clinical Use of Contemporary Agents.
4. **Mandsager, R.E., Shawley, R.V., Ciark, D.M., 1991** - Evaluation of propofol or Acepromazine/diazepam/ketamine in the Greyhound Vet. Surg.; 20(1):80-81.
5. **Muir, W.W., 2005** - Cyclohexanone mixtures: the pharmacology of ketamine and ketamine drug combination. Proceeding of 2nd International Congress of Veterinary Anesthesia, Sacramento 8-10 october, Veterinary Practice Publishing Company, Santa Barbara; 5-14.
6. **Nolan, A., Reid, J., 1993 -** Pharmacokinetics of propofol administered by infusion in dogs undergoing surgery. Br. J. Anaesth.; 70: 546 – 551.
7. **Reid, J., Nolan, A.M., 1993** - Pharmacokinetics of propofol in dogs premedicated with acepromazine and maintained with halothane and nitrous oxide. J. Vet. Pharmacol. Therap.; 16: 501 – 505.
8. **Reid, J., Nolan, A.M., 1996 -** Pharmacokinetics of propofol as an inducion agent in geriatric dog. Res. Vet. Sci.; 61:169-171.
9. **Sawyer, D., 2006** - The practice of Small Animal Anesthesia. 1st ed. Philadelphia, Saunders, W.B.

EPIZOOTOLOGICAL ASPECTS REGARDING IN VITRO RESISTANCE OF LINGUATULA SERRATA LARVA STAGES

NEGREA O., O. LIVIU, V. MICLAUS, VIOARA MIRESAN, CAMELIA RĂDUCU
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, str. Mănăştur nr. 3–5, onegrea50@oo.com

It were done investigations "in vitro" for establishment of Linguatula serrata larva and nympha stages viability and resistance in different thermal conditions. On this way it were collected immediately after slaughtering, mesenteric lympho-nodular masses massively infested with L. serrata larva and nympha stages, from members of the Bovidae family, and distributed into 3 clean griddle. These were maintained to different thermic regimes : B sample, at refrigerator temperature (40C), C sample to freeze (-180C) and A sample to laboratory temperature (15 – 250C). Daily during 6 days, it were been done verifying controls of pre-image stages resistance, on 100 larva samples taken into Petri plates with physiologic solution, noting the mobility and possibly morphologic modifications. The 3 experiments done in laboratory conditions put in evidence different resistance capacities in correlation with environment temperature. So, L.serrata pre-image stages being present in lympho-nodular masses kept to freeze (-180C) are total destroyed in the first 24 hours, those preserved at the temperature of 15-250C are gradually reduced their resistance in a more low percent than the sample maintained to refrigerator (+40C) till the 6-th day, after which they are total destroyed.

Key words: liguatula serrata, herbivores, omnivores

Linguatulosis is a parasitose with chronic evolution, manifested in carnivorous, definitive host, as a rhino/sinusitis produced by Linguatula serrata development at nasal fosse and frontal sinuses level. On the other hand, the development of larva and nympha forms takes place in different organs (mesenteric lympho-nodules, liver, lung, etc) in herbivores and some omnivores, intermediate hosts. In these, the disease is asymptomatic developing.

MATERIAL AND METHOD

Researches regarding the resistance capacity of L.serrata larva and nympha stages "in vitro" (in different thermic conditions) were done on 20 lympho- nodular masses massively infested, collected from adult bovines immediately after slaughtering. For establishment of larva and nympha viability and resistance in different thermic conditions, was adopted the following method: mesenteric lympho-nodular masses massively infested with L.serrata were displayed, equally approximative, into 3 clean griddles which further were maintained to a different thermic regime, to refrigerator temperature of $+4^0$C (sample), to freeze of -18^0C (C sample) and to laboratory temperature ($15 – 25^0$C) (A sample).

During 6 days, it were done daily verifying controls of pre-image stages resistance on 100 larva sample collected in Petri plates with a warm physiologic solution, noting viability and possibly morphological modifications.

RESULTS

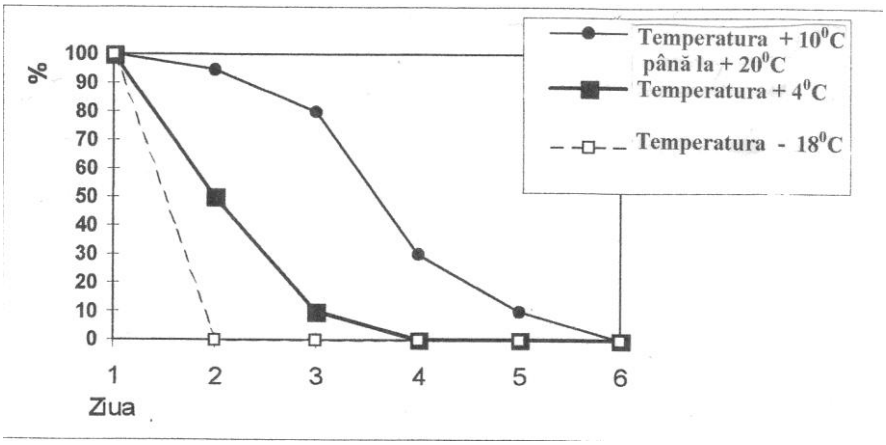
Laboratory experiment results regarding the resistance capacity of L.serrata larva and nympha stages kept in different temperature conditions, are put in evidence in table 1.

Dynamics of L.serrata pre-image stages resistance, in different temperatures.

Table 1.

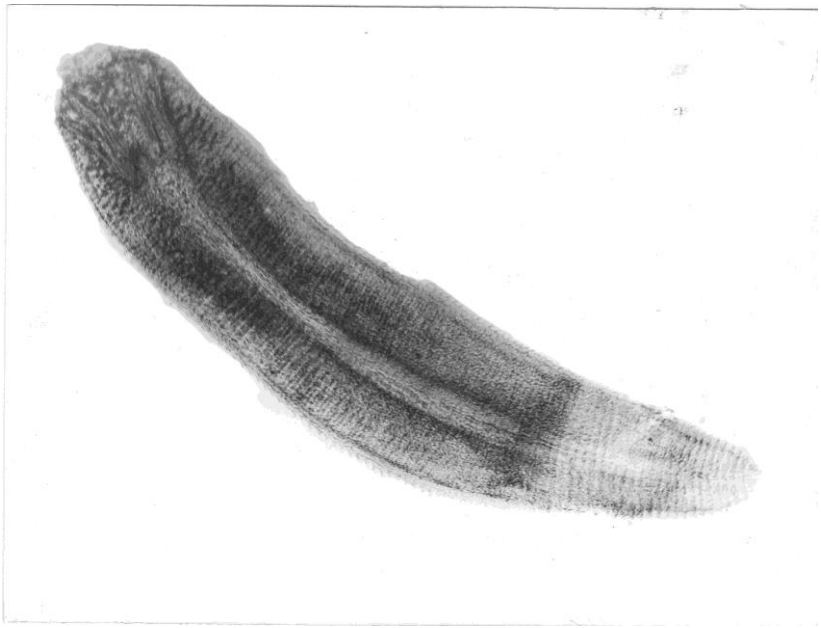
Day	Experiment A (temp+15^{0}C→+25^{0}C)					Experiment B (temp +4^{0}C)					Experiment C (temp -18^{0}C)				
Control after death	N	Alived larva and nimpha	%	Distroyed larva and nimpha	%	N	Alived larva and nimpha	%	Distroyed larva and nimpha	%	N	Alived larva and nimpha	%	Distroyed larva and nimpha	%
1	100	100	100,0	-	-	100	100	100,0	-	-	100	100	100,0	-	-
2	100	95	95,0	5	5,0	100	50	50,0	50	50,0	100	-	-	100	100,0
3	100	80	80,0	20	20,0	100	10	10,0	90	90,0	100	-	-	100	100,0
4	100	30	30,0	70	70,0	100	-	-	100	100,0	100	-	-	100	100,0
5	100	10	10,0	90	90,0	100	-	-	100	100,0	100	-	-	100	100,0
6	100	-	-	100	100,0	100	-	-	100	100,0	100	-	-	100	100,0

The 3 experiments done in laboratory conditions on L.serrata larva and nympha stages, collected from mesenteric lympho-nodular masses of adult bovines, immediately after slaughtering, point out different capacities of resistance in correlation with environmental temperature. So, larva and nimpha which are in lympho-nodular masses kept to -18^{0}C (freeze) are totally destroyed in first 24 hours, and those kept to constant temperature of +4^{0}C (refrigerator) survive in a much more low percent (50% in 2-nd day, and 10% in the 3-rd) and further they are destroyed. In turn, those preserved to laboratory temperature (+15^{0}C - +25^{0}C) diminish gradually their resistance in a much more reduced percent, surviving till the 5-th day (10% viable larva). It must be mentioned the fact that L.serrata larva and nympha resistance, under epidemiologic aspect, has a more low importance, since their viability "in vitro" is very reduced from a few hours in freezing conditions, to a few days in optimal temperature conditions (15^{0}C – 25^{0}C). Also, putrefaction processes negatively influence the surviving capacity of larva stages.



Picture 1 - Dynamics of L.serrata pre-image stages resistance, in different temperatures

Resistance curve variation in L.serrata larva and nympha stages, in correlation with environmental temperature, is presented in picture 1.



Picture 2. L.serrata: larva stage (ring-shaped aspect and the presence of cuticle thorns).

CONCLUSIONS

1. Epizootologic results effected, regarding the resistance capacity of L.serrata larva and nympha stages from mesenteric lympho-nodular masses collected from adult bovines immediately after slaughtering "in vitro", in different temperature conditions, put in evidence the following aspects:

- L.serrata larva and nympha resistance is different function of environmental temperature. So, larva stages being in lympho-nodular masses kept to -18^{0}C (freeze) are total destroyed in first 24 hours facing to those kept to constant temperature of +4^{0}C (refrigerator), which survive in a more diminished percent in days II and III (50% respectively 10%). In turn, those preserved to laboratory temperature (+15^{0}C - +25^{0}C) are diminishing gradually their resistance, surviving till the 5-th day (10%).

- Putrefaction processes progressively installed in lympho-nodular masses, negatively influence the surviving capacity of larva stages.

REFERENCES

1.Cosoroabă I., Dărăbuş Ghe., Oprescu I., (1995).-Compediu de Parazitologie Veterinară. Ed. Mitron. Timişoara.
2.Dulceanu N., Carmen Povcolnicu, Solcan Ghe., Hritcu L., (1996).-Observaţii privind morfologia speciei Linguatula serrata.(Frőchlide, 1789).Rev.Rom.Med.Vet.4.467.
3.Negrea O.,(2003).- Linguatuloza la ierbivore şi carnivore. Ed. Academicpres. Cluj-Napoca.
4. Riley J., (1986) – The biology of Pentostamids Advances in Parasitology, vol 25.Academic Press Inc.Limited (London).
5. Sukran D. (1982). –A study of the incidence of Linguatula serata and public health sigmficance.Ankara Univ. Vet. Fak Derg. 29 (3-4): 324-330
6. Şuteu I., V. Cozma(1998). – Bolile parazitare la animalele domestice. Ed. Ceres. Bucureşti.

DIAGNOSIS EPIDEMIOLOGIC OBSERVATIONS IN DOG LINGUATULOSIS

NEGREA O., O. LIVIU, V. MICLAUS, VIOARA MIRESAN, CAMELIA RĂDUCU, Z. MARCHIS

USAV Cluj Faculty Animal Sciences and Biotehnology Cluj-Napoca, str. Mănăştur nr. 3–5, onegrea50@oo.com

Epidemiologic aspects of linguatulosis, parasite disease that is met in dog as ulcer and necrotic rhino-sinusitis and asymptomatic in many species of domestic and wild herbivorous, are little studied. In consequence, it is lack of information regarding infestation sources, transmission mechanism and peculiarities of definitive and intermediate host receptivity state. With this purpose, for establishment of rhino-sinus linguatulosis incidence in dog, on age categories and performed service, it were effected investigations on a total guard dogs of 202 guard and company dogs from rural and urban environment of 4 transylvanian counties (Sibiu, Alba, Cluj and Bistrita-Nasaud), of different age, breed and maintenance state. Individualy were collected nasal secretions and faeces samples for parasitologic exams, using rhino- and coproscopy method of concentration by sedimentation. Values obtained point out differences of linguatulosis incidence in dog, function of area, age category and performed service. So, in Sibiu county we have an incidence of 4,6% (4,3% young stock and 4,7% adults),in Alba 0%, in Cluj 6,6% (0% young stock,10% adults), in Bistrita-Nasaud 7,5% (5,0% young stock and 13,0% adults).

In correlation with performed service (courtyard guard or flock guard and companion), the incidence of parasitosis presents important variations such as 1,8% (courtyard guardian dogs) and 5,6% (flock guard and companion dogs).

Key words: dog, linguatulosis, parasite

Linguatulosis is a parasitary disease manifested in dogs as rhino-sinusitis, with a chronic evolution. The disease is produced by development of Linguatula serrata adults (L. rhinaria) at the level of nostrils, ethmoid volutes and frontal sinuses in carnivores (dog, wolf, fox, etc) sometimes in humans. On the other hand, the development of pre-image forms (larva and nympha) take place in different organs (mesenteric lympho-nodules, liver, lung, kidney) in herbivores and some omnivores, to which the evolution of disease is asymptomatic.

MATERIAL AND METHOD

It were done investigations regarding rhino-sinusitis linguatulosis incidence in dogs, function of area, age category and performed service, on a total stock of 202 dogs, coming from population farms from some urban and rural localities of 4 Transylvanian counties (Sibiu – 107, Alba – 40, Cluj – 15, Bistrita-Nasaud – 40). Dogs submitted to control belong to Romanian Shepherd and common breeds, aged of 1 – 12 years, with service of courtyard guard or companion and sheep or bovines flocks guard. Animals are of different sexes and maintenance state. Individualy were collected nasal secretions and coprologic samples, and for the establishment of parasitosis incidence were used rhino- and coproscopy methods of enrichment by sedimentation.

Nasal secretions collection technique and rhinoscopy exam

With help of sterile tampons imbued into sterile physiologic solution it were done as much profound as possible intranasal tamponages , with care of avoid the mucosa lesion. Extracted tampon is introduced into a sterile test tube, which contains 3 ml physiologic solution. Moisten cotton is pressed with the help of clamp in the same test tube, and the content is centrifugated at

1500 shifts/min. for 3 minutes. From sediment are prepared microscopic samples, between lama and lamella, which are examined with 10x objective for L.serrata eggs screening selection.

For coproscopy exams were used ovoscopic methods of enrichment by active sedimentation (centrifugation).

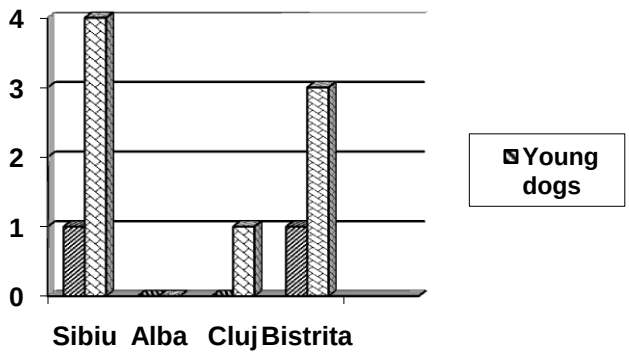
RESULTS AND DISCUSSIONS

Epidemiologic investigation results done on a stock of 202 dogs, coming from population farms from urban and rural areas of 4 Transylvanian counties,concerning the rhino-sinusitis linguatulosis incidence, on age categories, are presented in the table and graphic 1.

Table 1. Zonal incidence of rhino-sinusitis linguatulosis in dogs, in Transylvania.

Controlled zone	Number of examined samples		Total	Linguatulosis positive Samples.				Total	
	Young stock	Adults		Young stock		Adults			
				Hd.	%	Hd.	%	Hd.	%
Sibiu	23	84	107	1	4,3	4	4,7	5	4,6
Alba	15	25	40	-	-	-	-	-	-
Cluj	5	10	15	-	-	1	10,0	1	6,6
Bistrița-N	17	23	40	1	5,8	3	13,0	4	10,0
Total	60	142	202	2	3,3	8	5,6	10	4,9

From data analysis regarding rhino-sinusitis linguatulosis repartition function of age category, it can be observed that dog young stock presents a reduced infestation percent, 3,3%, facing to 5,6 in adult dogs. Disease prevalence at the level of controlled zones is most great in Bistrita-Nasaud county, such in dog young stock 5,8%, as in adult dogs 10,0%, while in Cluj county parasitosis incidence is only in adult dogs, 10%, and in Sibiu county the values obtained are appreciated in young stock 4,3% and in adult dogs 4,7%. In turn, in Alba county were not found linguatulosis positive cases in the controlled areas in carnivorous. Incidence of infestation with L.serrata in dog, on age category, is presented in picture 1.



Picture 1. Linguatulosis incidence variation in dogs, on age categories and counties.

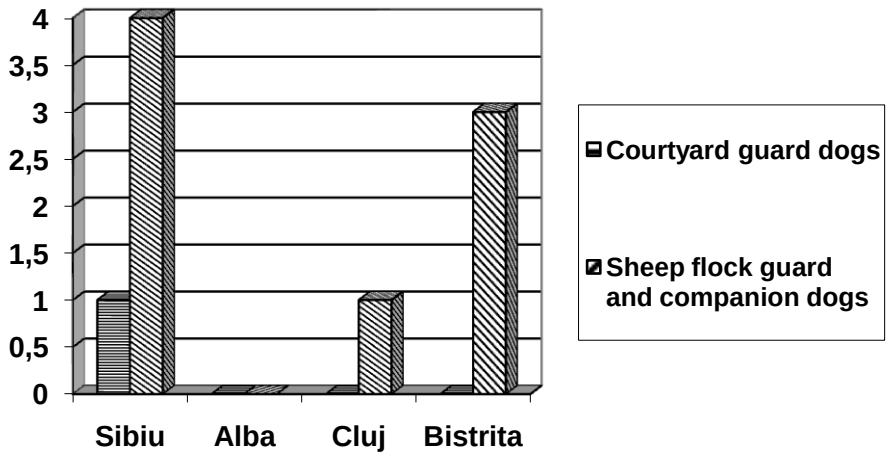
Rhino-sinusitis linguatulosis incidence in dog, in correlation with performed service (courtyard guard, flock guard and companion), from Transylvania areas taken in study, is presented in table 2.

Table 2. L.serrata infestation extent in dog, in correlation with performed service.

Controlled area	Examined samples		Total	Positive samples, L.serrata			
	Courtyard guard dogs	Sheep flock guard and companion dogs		Courtyard guard dogs		Sheep flock guard and companion dogs	
				Hd.	%	Hd.	%
Sibiu	17	90	107	1	5,8	4	4,4
Alba	28	12	40	-	-	-	-
Cluj	-	15	15	-	-	1	6,6
Bistriţa-N	9	31	40	-	-	3	9,6
Total	54	148	202	1	1,8	8	5,6

As it results from the above data the presence of linguatulosis in dogs of company and flock guardians is clearly superior (5,6%) facing to that of courtyard dogs (1,8%), with important variations function of zone. Thus, in Sibiu county the disease incidence in courtyard dog presents most high values (5,8%), and in Bistrita-Nasaud county the most high incidence is found in flock companion dog (9,6%). In Cluj county rhino-sinusitis linguatulosis only in flock dog (6,6%) is present.

Linguatulosis incidence variation in dog, in correlation with performed service is shown in picture 2.



Picture 2. L.serrata infestation extent in dogs in correlation with performed service.

CONCLUSIONS

Epidemiologic research results, effected on a total stock of 202 dogs coming from population households from urban and rural environment, of 4 Transylvanian counties (Sibiu – 107, Alba – 40, Cluj – 15, Bistrita-Nasaud – 40), concerning rhino-sinusitis linguatulosis incidence function of zone, age category and performed service, put in evidence the following aspects:

1. Rhino-sinusitis linguatulosis incidence in dogs, from urban and rural zones of Sibiu, Alba, Cluj and Bistrita-Nasaud counties, presents different values, function of origin zone. Thus, in Bistrita-Nasaud infestation extent has maximal values (10,0%), followed by Cluj (6,6%) and Sibiu (4,6%). It was not signaled in dogs from Alba county. The average value of infestation with L.serrata in tested dogs was of 4,9%.

2. Carnivores linguatulosis incidence in correlation with age category, presents notable variations: dog young stock is low infested (3,3%) while adult dogs are more infested (5,6%). On counties, dog populations of Bistrita-Nasaud have the most high percent, such in young dogs (5,8%), as in adults (13,0%), and in those of Cluj, parasitosis incidence only in adult dogs (6,6%). In turn, in dog populations of Sibiu the values are close to 4,3% in young stock and 4,7% in adult dogs.

3. Rhino-sinusitis linguatulosis focuses are more frequent in flock companion and guardian dogs (5,6%), facing to courtyard dogs (1,8%). On counties, maximal level of disease incidence is found in flock companion and guardian dogs (9,6%) from Bistrita-Nasaud and more reduced to those from Cluj (6,6%) and Sibiu (4,4%). In courtyard dogs, linguatulosis frequency is of 5,8% in Sibiu and in the other counties is lacking.

REFERENCES

1.Cosoroabă I., Dărăbuş Ghe., Oprescu I., (1995).-Compediu de Parazitologie Veterinară. Ed. Mitron. Timişoara.
2.Dulceanu N., Carmen Povcolnicu, Solcan Ghe., Hritcu L., (1996).-Observații privind morfologia speciei Linguatula serrata.(Frőchlide, 1789).Rev.Rom.Med.Vet.4.467.
3.Negrea O.,(2003).- Linguatuloza la ierbivore şi carnivore. Ed. Academicpres. Cluj-Napoca.
4. Riley J., (1986) – The biology of Pentostamids Advances in Parasitology, vol 25.Academic Press Inc.Limited (London).
5. Sukran D. (1982). –A study of the incidence of Linguatula serata and public health sigmficance.Ankara Univ. Vet. Fak Derg. 29 (3-4): 324-330
6. Şuteu I., V. Cozma(1998). – Bolile parazitare la animalele domestice. Ed. Ceres. Bucureşti.

CLINICAL, THERAPEUTICALLY AND HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS IN BOVINE SOLE ULCER

L. OANA, V. MICLAUS, C. PESTEAN, C. OBER, N. MATES, L. OGNEAN, O. NEGREA
UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE CLUJ-NAPOCA, ROMANIA, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, MANASTUR STR. NO. 3-5 CLUJ-NAPOCA, cj10ppc@yahoo.com

Rusterholz lesions are one of many problems causing lameness in dairy cattle The goal of this study was to obtain clinical, therapeutical and histological information in bovine sole ulcer. Sixteen milking cows suffering from sole ulcer have been treated surgically and locally with antibiotics and antiseptics. The sampling sites were settled at caudo-medial part in the center sole, regardless of the location's of the sole ulcer. Samples containing the corium and part of the epidermis were collected in two time intervals 1, 21 days and histopathologically exanimate. These samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and sections stained with hematoxylin and eosin. On day 1 were evident the inflammatory changes on day 21 the vascularization in the dermis was completed, the lesion was covered with differentiated cornified epidermis.

Key words: sole ulcer, bovine hoof, histopathological aspects, Intra Hoof-fit gel

Lameness is the third most important problem on many dairy farms after mastitis and reproductive failure. The considerable economic losses are attributable to the cost of treatment, decreased milk production, decreased reproductive performance and increasing culling (Azarabad H., et al, 2006). Rusterholz lesions are among the most frequent causes of lameness in dairy cattle. Sole ulcer is located on the sole-bulb junction of the lateral claw of the hind leg, usually nearer axial margin (Hemsworth, P.H. et al, 1995). It is a perforation of the horn layer, when the necrosis of the tissue is severe and extensive enough to obstruct permanently the horn production. The corium necrosis is usually focal. The lesions are impaired horn production, discoloration and softening in the horn of the sole (Ossent P. et al, 1997) The pathogenesis of sole ulcer include circulatory disturbance in the corium due to primary damage and the degeneration of the cells in the epidermis (Andersson L., 1981) A contributory factor in the development of sole ulcers in cattle is the localized contusion of the corium as a result of overloading and also heel horn erosion. Mechanical pressures on the corium produce ischemic necroses which lead to discoloration in the horn at the specific site because of poor-quality horn production and hemorrhage (Smedegaard H.H., 1985). In this study we investigate the clinical and histopathological changes after the treatment of sole ulcer.

MATERIALS AND METHODS

In this study, were included 16 Romanian spotted cattle with age between 2 and 5 years from a farm localized in Lechinta, Mures County, suffering from sole ulcer. In all cases the lameness and lesion score was assessed, the mean lesion size was 16X9 mm. Under neuroplegy and regional anesthesia the lesions were surgically treated by removing the protruding granulation tissue, leaving healthy pododerm, applying medical products like antibiotics: (Oxyvet spray, Asocilin, Mibazon, Germostop cicatrizant), antiseptics: (iodoform ether 10%, perogen) and Intra Hoof-fit gel. For histopathological examination were collected in day 1 and 21, samples containing the corium and part of the epidermis. These samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and sections stained with hematoxylin and eosin.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The 16 cattle had sole ulcer in different stages and the surgical and therapeutically treatment was applied repeatable until the sole was healed (fig. 1, 2, 3, 4).

Fig. 1 Sole ulcer in day 1 of treatment

Fig. 2 Sole ulcer after 1 week of treatment

Fig. 3 Sole ulcer after 2 weeks of treatment

Fig. 4 Sole ulcer after 3 weeks of treatment

Fig. 5 Products used in sole ulcer therapy

Fig. 6 Gauze roll bandage

The therapeutically treatment consist in topical therapy with different antibiotics and antiseptics powders, ointments or spray. A specific product used in the sole ulcer therapy was Intra Hoof-fit gel, which contains Aloe Vera plant extract, organic chelated minerals, nourishing and protective substances, special adhesives and stabilizing and emulsifying agents (fig. 5).

After topical medication, a bandage was needed to prevent or reduce swelling and edema, protect surgical sites from contamination or trauma. For bandages we used gauze roll and Tartape, a waterproofed tape with very strong adhesive glue (fig. 6, 7). This bandage keeps the wound dry and the period of time between bandage changing was substantially longer.

Fig. 7 Tartape bandage

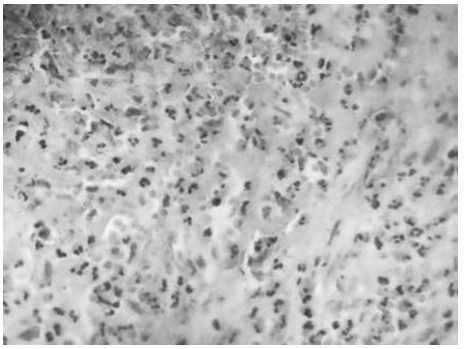


Fig. 8 Acute inflammatory changes

Histopathological study on biopsy sections in days 1 showed acute inflammatory changes due to disruption of the superficial dermis vessels. Red and White blood cells were scattered over the dermal and epidermal tissue. In the corium, congestion and edema in connective tissue were seen. Dermal vessels were plugged by thrombi and the living epidermis next to the wound margin shows necrosis, loss the cells in the stratum basale and stratum spinosum and dyskeratotic changes. Some areas and horn layer surrounding the ulcer shows dilated tubules which were parallel to the sole and microcracks extending to the stratum spinosum (fig. 8, 9).

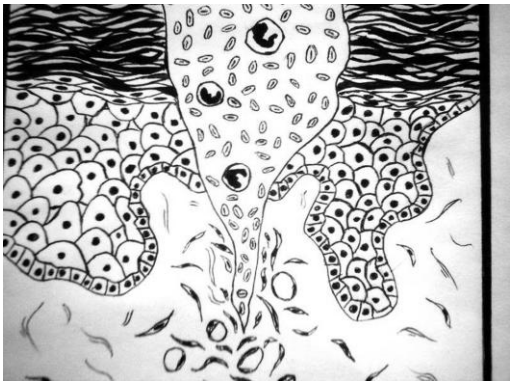


Fig. 9 Schematic inset in dermis and epidermis disruption of the superficial dermal vessels showing the damaged tissues and the blood cloth filling the defect

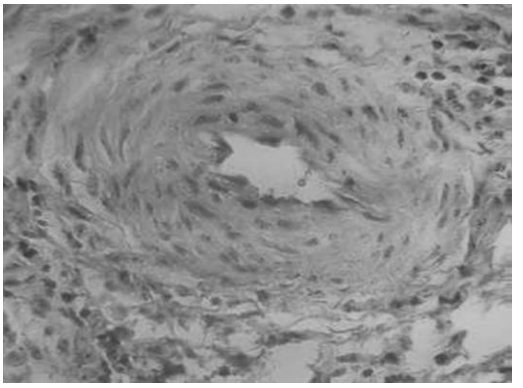


Fig. 10 Proliferation of tunica media in an arteriol

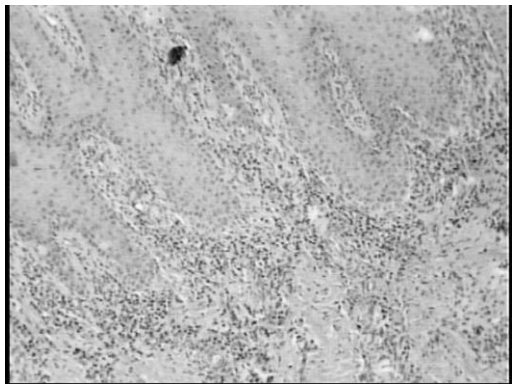


Fig. 11 Rete ridge formation in epidermis with acanthosis and parakeratotic hyperkeratosis

Fig. 12 Lesion covered by mature horn layer

In day 21 vascularisation in the dermis was almost completed. Reteridge formation in epidermis with acanthosis and parakeratotic hyperkeratosis (Degenerated cells) were seen. There were still areas with dyskeratosis resulting in a disturbed synthesis of keratin proteins and in attempt to close the ulcer, there was supra basal epidermal mitosis and proliferation of this layer, follows failure of normal proliferation and differentiation of the basal layer. Also massive proliferation of fibroblasts and vessels with proliferation of tunica media in arterioles was seen. The lesion was covered by moderate differentiated cornified epidermis. The dermal papillae showed marked mononuclear cells infiltrate (fig 10, 11, 12).

CONCLUSIONS

1. The surgical treatment and topical use of antibiotics, antiseptics on affected claw, combined with waterproof bandage represent a successful protocol for sole ulcer.
2. Healing process of sole ulcer took 21 days to form a closed horn layer and to complete the histological integrity of the epidermis.
3. The treatments applied in bovine lameness must be acompaniated with proper conditions regarding hygiene and technological aspects.

REFERENCES

1. **Andersson, L.,** 1981. Acta Vet. Scand., 22: 140-142.
2. **Azarabad H., Nowrouzian I., Soleymani E., Vakolgilani G., Seyedjavadi S. M.,** 2006, Wound healing process of uncomplicated "Rusterholtz" ulcer, following treatment by wooden block and Hoofgel in bovine hoof: histopathological aspects, American Journal of Animal and Veterinary Sciences 1 (2): 28-31.
3. **Hemsworth, P.H., J.L. Barnett, L. Beveridge** and **L.R. Matthews,** 1995, The welfare of extensively managed dairy cattle: A review. Appl. Ani. Behav. Sci., 42: S161-182.
4. **Ossent, P., P.R. Greenough and J.J. Vermunt,** 1997, Laminitis. In Lameness in Cattle (Eds. P.R.Greenough and A.D. Weaver), pp: 277-292. Philadelphia: Saunders Company.
5. **Smedegaard, H.H**.,1985, Pododermatitis Circumscripta: Atiologie und pradisponierende Faktoren. Wien Tierarztl Monatsschr, 72: S39-43.

OBSERVATIONS CONCERNING CLINICAL AND THERAPEUTIC ASPECTS IN INTERDIGITAL HYPERPLASIA IN COWS

OANA L., C. OBER, C. PESTEAN, N. MATES, V. MICLAUS, L. OGNEAN
University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj
cipri_ober@yahoo.com

Fourteen dairy cows were operated because of the presence of interdigital hyperplasia. For seven of them we excised the hyperplasia suturing after the wounds using no. 4 silk, and for seven after excisions we made thermal cauterization. Thermal cauterization is more efficient because it is expeditious and is followed by a low reccurence rate. Excisions and sutures are good choices also, but the method is more difficult because of an uncomfortable position of the surgeon in farm conditions and thickness of the interdigital derm.

Key words: interdigital hyperplasia;cow; cauterisation; excision

Interdigital hyperplasia is a firm, tumor-like mass located in the interdigital space. It is not common, except in certain breeds (eg, Herefords, in which it is considered to be heritable).The disease is an important cause of lameness in dairy cows in many countries (Cornelisse et al., 1981and Somers et al., 2003). It mostly occurs on the plantar aspect of the rear foot, affecting the skin adjacent to the interdigital cleft or the skin–horn junction of the heel bulbs. Occasionally, lesions are found adjacent to the dew claws or bordering the dorsal interdigital cleft (Blowey and Sharp, 1988 and Amstel et al., 1995). Most lesions are circular or oval, are clearly demarcated by borders with longer hair growing around the lesion and have a distinctive odour (Cornelisse et al., 1981). Histopathological and immunohistochemical evidence has indicated that papillomatous interdigital hyperplasia and interdigital hyperplasia are the same disease (Read and Walker, 1998).The aetiology of the disease is unknown, but is considered to be multifactorial (Rodriguez-Lainz et al., 1996, Rodriguez-Lainz et al., 1998, and Wells et al., 1999). Risk factors related to a high prevalence are wet floors, purchase of replacement stock, restricted grazing time, low parity, early lactation and serious heel horn erosion (Wells et al., 1999, Rodriguez-Lainz et al., 1996 and Somers et al., 2005).

The aim of this study was to describe the clinical presentation of interdigital hyperplasia in farm and some efficient therapeutical procedures.

MATERIALS AND METHODS

Study design

14 Holstein-Friesian dairy cows from a private farm (Lechinta, Mures) (Table 1) were examined respect interdigital hyperplasia in the hind limbs (Fig 1-2). The acropodium was cleaned with high pressure water and a brush.

Preoperative management

The light restraint was made in a chute. We performed a standard examination (cleaning of all four hoofs of each cow, inspection) regardless of the presence or absence of lesions.The hyperplasia was generally not painful on firm pressure with the thumb.

Anaesthesia

We performed a local analgesia using Bupivacaine, all around the tumefactions (Fig 3-4)

Surgical techniques

After a good local asepsy, we made incisions on both lateral sides of the tumefactions (Fig. 5). The hiperplasia was than catch with a surgical forceps and removed (Fig. 6). The mass was removed, leaving as much of the interdigital skin as possible. Also any fat protruded when the claws were pressed together, was removed. Good hemostasis was made all the time using hemostatic gauze (Fig. 7).

In seven cases we made thermal cauterization using thermal-cautery (Fig. 9). After cauterization we applied topical sprays with Terramycin (Pfizer, UK) (Fig. 10).

Fig. 1. *Clinical presentation of interdigital hyperplasia*

Fig. 2. *Interdigital hyperplasia (after cleaning)*

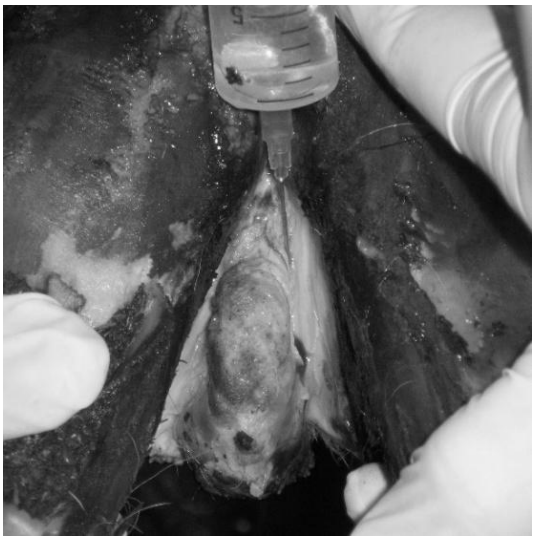


Fig. 3. *Local analgesia (lateral infiltrations)*

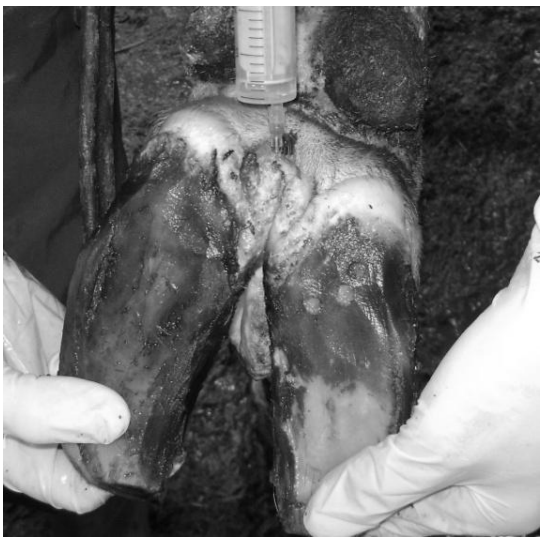


Fig. 4. *Local analgesia (infiltration at the base of tumefaction)*

Fig. 5. *Lateral incisions*

Fig. 6. *Excision of the hyperplasia*

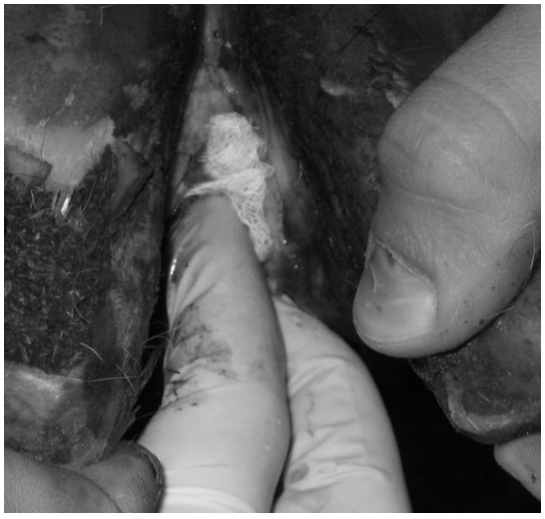


Fig. 7. *Hemostasis*

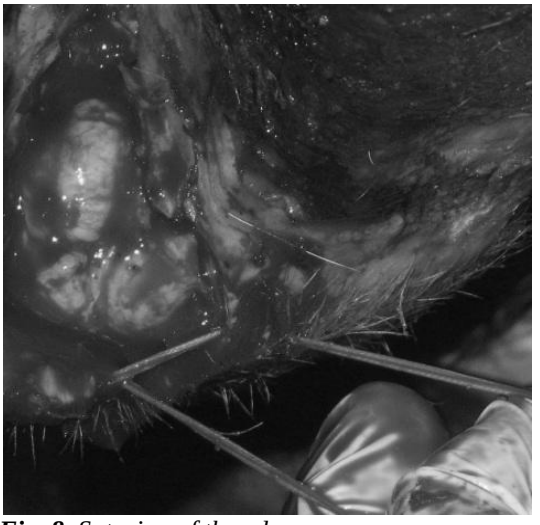


Fig. 8. *Suturing of the edges*

Fig. 9. *Thermal cauterization*

Fig. 10. *Spraying*

RESULTS AND DISSCUTIONS

All lesions were diagnosed in the rear claws of dairy cows. In ten cases (71.4%), both legs were affected. All lesions were located at or near the skin–horn border. Some of them were diagnosed on the plantar skin bordering the interdigital space. No deeply erosive lesions were diagnosed. Despite topical treatment, lesions remained transformed into chronic stage lesions.

The objective of this study was to describe the clinical presentation and surgical treatment of interdigital hyperplasya in fourteen dairy cows.

The disease was defined in terms of clinical signs and location of lesions. A total of 20 lesions were diagnosed in the rear claws of 14 cows.

Most of the clinical signs of active hyperplasia in this study, location of lesions, were similar to those described in earlier studies (Cheli and Mortellaro, 1974 and Vermunt and Hill, 2004).

In our study, the typical clinical presentation of hypeplasia was a superficial dermatitis with a diameter of 3-4 cm, mainly located in the region of the bulb and the coronet. In this study, pain on palpation was not present. Pain on palpation was mentioned as one of the main signs (Cheli and Mortellaro, 1974, Cornelisse et al., 1981 and Blowey and Sharp, 1988) in previous studies .

In the development of interdigital hyperplasia, digital dermatitis is an important factor or vice versa, interdigital hyperplasia may predispose to digital dermatitis or both conditions may have common causative agents and/or pathogenetic mechanisms (Laven, 2000 and Mülling and Budras, 2002).

Surgical treatment of the hyperplasia is a good choice. A local analgesia with Bupivacaine around the hyperplasia is ussualy enough for the surgical procedures. After excisions, suturing of the edges using surgical silk is good, but it is difficult to be performed because of the thickness of the interdigital derm. Another disadvantage of the procedure is the longer time for executions in an unconfortable position of surgeon.

A better option is thermal cauterization after excisions, which also has the advantage that delay reccurences. Care must be taken to avoid cutting deep structures such as the distal interphalangeal ligament. Cryosurgery is also an option *(The Merk Veterinary Manual).*

Claw trimming might be advised to improve ventilation of the interdigital space.

CONCLUSIONS

1. Surgical treatment of the hyperplasia in fourteen dairy cows was performed by two methods.
2. Suturing of the edges of the hyperplasia excised using surgical silk is good, but it is difficult to be performed because of the thickness of the interdigital derm and because of the longer time of surgery in an unconfortable position of surgeon.
3. Thermal cauterization after excisions, is more quickly and also has the advantage that it delay reccurences.

REFERENCES

1. Amstel S.R., S. van Vuuren and C.L.C. van Tutt, Digital dermatitis: report of an outbreak, Journal of the South African Veterinary Association 66 (1995), pp. 177–181.
2. Blowey R.W. and M.W. Sharp, Digital dermatitis in dairy cattle, Veterinary Record 122 (1988), pp. 505–508.
3. Cheli, R., Mortellaro, C.M., La dermatite digitale del bovino. In: Proceedings of the 8th International Conference on Diseases of Cattle, Milan, Italy, (1974), pp. 208–213.
4. Cornelisse J.L., D.J. Peterse and E. Toussaint Raven, A digital disorder in dairy cattle. Digital dermatitis?, Tijdschrift voor Diergeneeskunde 106 (1981), pp. 452–455.

5. Laven, R.A., Determination of the factors affecting the cause, prevalence and severity of digital dermatitis as a major cause of lameness in dairy cows. Milk Development Council Study 95/R1/11(May), (2000), pp. 1–5.
6. Mülling, C.K.W., Budras, K.D., Influence of environmental factors on horn quality of the bovine hoof. In: Proceedings of the 12th International Symposium Disorders of the Ruminant Lameness. Orlando, USA, (2002), pp. 90–98.
7. Read, D.H., Walker, R.L. Comparison of papillomatous-digital dermatitis and digital dermatitis of cattle by histopathology and immunohistochemistry. In: Proceedings of the 10th International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit and Lameness, Lucerne, Switzerland, 1998, pp. 268–269.
8. Rodriguez-Lainz A., D.W. Hird, R.L. Walker and D.H. Read, Papillomatous-digital dermatitis in 458 dairies, Journal of the American Veterinary Medical Association 209 (1996), pp. 1464–1467.
9. Rodriguez-Lainz A., P. Melendez-Retamal, D.W. Hird and D.H. Read, Papillomatous-digital dermatitis in Chilean dairy cattle and evaluation of a screening method, Preventive Veterinary Medicine 37 (1998), pp. 197–207.
10. Somers J.C., K. Frankena, E.N. Noordhuizen-Stassen and J.H.M. Metz, Prevalence of claw disorders in Dutch dairy cows exposed to several floor systems, Journal of Dairy Science 86 (2003), pp. 2082–2093.
11. Vermunt J.J. and F.I. Hill, Papillomatous-digital dermatitis in a Holstein-Friesian bull, New Zealand Veterinary Journal 52 (2004), pp. 99–101.
12. Wells S.J., L.P. Garber and B.A. Wagner, Papillomatous-digital dermatitis and associated risk factors in US dairy herds, Preventive Veterinary Medicine 38 (1999), pp. 11–24.

DEPISTATEA UNOR INCOMPATIBILITĂŢI SANGUINE CU RISC HEMOTRANSFUZIONAL LA CAINE

DETECTION OF BLOOD INCOMPATIBILLITIES IN DOGS WITH MAJOR RISKS IN BLOOD TRANSFUSION THERAPY

OGNEAN L., MEDA MOLDOVAN, CRISTINA CERNEA, L. OANA, A. GAL, C. OBER
Universitatea de Stiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca
Calea Mănăştur, nr.3-5, 400372, lognean@yahoo.com, Romania

The pets are considered real familly members and they should benefit of blood transfusion as a therapeutic procedure.This is already a current practic in dogs and cats and begins to extend in furrets.The aim of this study is to distinguish the aglutination or hemolisis reactions, using different Crossmatch techniques for the bearer detection of alloantibodies and for compatibility blood tests. In a familly of German Shepherd dogs (4), blood typed 1(-)B, were tested 3 crossmatch variants and choosed for checking in 22 patients the blood compatibillity with the rapid slide test along with blood typing using SHIGETA kits. In a patient with osteosarcoma it was tested the blood compatibillity with 12 potential donors, using other 3 type of minor and major crossmatch.

In patients with positive reactions of incompatibillity, the results were relevant in both variants (slide,tube), meaning the hight titre of plasmatic alloantibodies.Transfusion with whole blood in 22 patients, after testing the blood compatibillity, has made possible the recovery of 20 patients. 2 patients were very ill and after the 3-th or 4-th blood transfusin the hemolisis apeared and it was fatal.

The strong positive major crossmatch results obtained in the patient with osteosarcoma and 9 potential donnors, who never received a transfusion, suggest the possibility of producing alloantibodies to some foreign proteins induced by cancer and crossreact with the common erythocitar antigens.

The possitive results in the major crossmatch tests confirm once again the possibillity of plasmatic alloantibodies production in dogs, after blood transfusion .Even if the initial tests were compatible with more donors the sure source of compatible blood in the first transfusin remain the whelps.

Key words: dog, crossmatch, alloantibodies, compatibillity, blood transfusion.

Hemotransfuzia la animale presupune, la fel ca şi la om, stabilirea compatibilităţii sanguine între donator şi primitor, pe baza testelor de grupă sanguină sau de tip Crossmatch. Pentru siguranţa terapiei cu produse sanguine este esenţială depistarea anticorpilor implicaţi în producerea unor eventuale reacţii postransfuzionale imediate sau întârziate. În mod natural, faţă de cele 13 antigene eritrocitare canine nu se produc aloanticorpi plasmatici cu semnificaţie clinică, aşa cum se pot întâlni la pisică (*Giger,* 2005). Tot mai multe specii de animalele de companie pot beneficia actualmente de terapia hemotransfuzională, graţie progreselor realizate în testarea compatibilităţii sanguine, devenită deja o practică curentă la câine şi pisică, şi pe cale de extindere la păsările sau chiar dihorii de companie (Hohenhaus, 2004).

MATERIALE ŞI METODE

Pentru evaluarea compatibilităţii sanguine hemotransfuzionale am recurs la stabilirea relevanţei reacţiilor de aglutinare sau hemoliză în depistarea aloanticorpilor anti-antigene eritrocitare prezenţi în plasma donatorilor sau primitorilor, utilizând diferite variante ale testării încrucişate, cunoscută sub denumirea de Crossmatch.

A. Primul set de investigaţii a fost efectuat pe o familie de câini Ciobăneşti Germani,

formată din 4 femele de 3-8 ani, încadrate în grupa sanguină 1(-)B prin tipizare cu kituri SHIGETA (*Ognean* şi col., 2008), constând în testarea şi evaluarea următoarelor 3 variante de Crossmatch major:

1. *Aglutinare în tub pe concentrat eritrocitar (CE)*, bazată pe testarea CE al donatorului (prepararat din sângele heparinizat prin spălări repetate în ser fiziologic) faţă de plasma primitorului. Aceasta a constat în omogenizarea, timp de 4 minute, a unor cantităţi egale de CE şi plasmă (în soluţie salină 0,9% la 30-37 °C) şi centrifugarea lor 2 minute la 2400g;

2. *Aglutinare în tub pe sânge integral*, diferenţiată de prima variantă doar prin utilizarea de sânge integral în locul CE;

3. *Aglutinare rapidă pe lamă*, constând în tratarea directă pe lamă a CE preparat de la donator cu plasma primitorului, în proporţie de 1/10.

Interpretarea rezultatelor a vizat aprecierea prezenţei sau absenţei reacţiei de aglutinare şi/sau hemoliză, respectiv a intensităţii ei, cuantificată cu simbolurile convenţionale cunoscute (+, ++, +++, ++++) (tabel 1).

Relevanţa acestor 3 variante de teste preliminare a fost apropiată, ceea ce ne-a determinat să recurgem la utilizarea variantei rapide de Crossmatch major pe lamă, comparativ cu tipizarea grupelor sanguine din sistemul antigenic SHIGETA, în evaluarea compatibilităţii la un eşantion de 22 pacienţi supuşi hemotransfuziei ca procedură de terapie intensivă.

B. Al doilea set de investigaţii a fost reprezentat de un pacient cu anemie (câine Rottweiler de 10 ani, diagnosticat cu osteosarcom), care a necesitat investigaţii ample de verificare a compatibilităţii sanguine, constând în testarea a 12 potenţiali donatori, de rase şi vârste diferite. În rândul acestor potenţiali donatori clinic sănătoşi, am introdus şi un câine cu limfom pentru a releva o eventuală modificare comună de antigenitate eritrocitară în cazul celor 2 pacienţi cu cancer. Conform datelor anamnetice atât primitorul, cât şi potenţiali donatori n-au fost supuşi niciodată unor tratamente cu produse sanguine transfuzabile. A fost testată compatibilitatea pacientului cu cei 12 potenţiali donatori, precum şi a donatorilor între ei, prin 3 variante de Crossmatch major si minor, bazate pe utilizarea metodei rapide pe lamă şi a metodei în tub. În cazul pacientului am efectuat şi testul de control al autoaglutinării, respectiv controlul aglutinării cu hemotestele pentru grupele sanguine din sistemul OAB la om.

Testările în tub şi pe lamă au necesitat mai întâi prepararea de ser sau plasmă de la cei 2 parteneri, prin metodele cunoscute (*Ognean* şi col., 2006), respectiv de CE din hematii spălate. CE a fost preparat din sedimentul de sânge pe EDTA, obţinut prin centrifugare. Din sediment, am trecut câte o picatură de hematii în mai multe tuburi ependorf conţinând câte 2ml de ser fiziologic fiecare, amestecul rezultat a fost centrifugat 15 secunde la 2500 g, după care am decantat supernatantul, iar peste sedimentul rămas am adăugat din nou 2ml de ser fiziologic. Procedura s-a repetat încă de două ori rezultând în final 3 spălări succesive.

Metoda rapidă pe lamă a constat în cazul Crossmatch-ului major in omogenizarea a 3µ hematii de la donator cu 12µ ser/plasmă de la receptor şi invers în cazul Crossmatchului minor, respectiv omogenizarea aceloraşi cantităţi de CE şi ser/plasmă de la pacient pentru controlul autoaglutinarii. Prin miscări de rotaţie s-a urmărit apoi apariţia macroaglutinării, iar prin examen microscopic s-a evidenţiat prezenţa microaglutinării şi/sau hemolizei.

Metoda în tub a constat în cazul Crossmatch-ului major în adăugarea peste hematiile spalate ale donatorului a 2 picături din serul/plasma receptorului şi invers în cazul Crossmatch-ului minor, respectiv amestecarea aceloraşi cantităţi de hematii cu ser/plasmă pentru controlul autoaglutinării la pacient. După agitarea uşoară a fiecărui tub am depus câte o picatură pe o lama de microscop şi am evaluat mai întâi macroscopic şi apoi microscop prezenţa şi intensitatea aglutinării sau hemolizei, care a fost cuantificată cu simbolurile convenţionale cunoscute.

Varianta cu hemoteste pentru grupele sanguine umane, s-a efectuat prin metoda pe lamă, constând conform tehnicii cunoscute (*Ognean* şi col., 2005), în omogenizarea a câte o picatură din

serurile anti -A, anti-B si anti-D cu câte 3µ hematii de la pacient şi depistarea unei eventuale aglutinării.

Pentru toate variantele testeelor de tip Crossmatch, am utilizat sânge recoltat pe EDTA, exceptând câteva plasme care au fost preparate şi din sânge citratat, respectiv oxalatat.

REZULTATE ŞI DISCUȚII

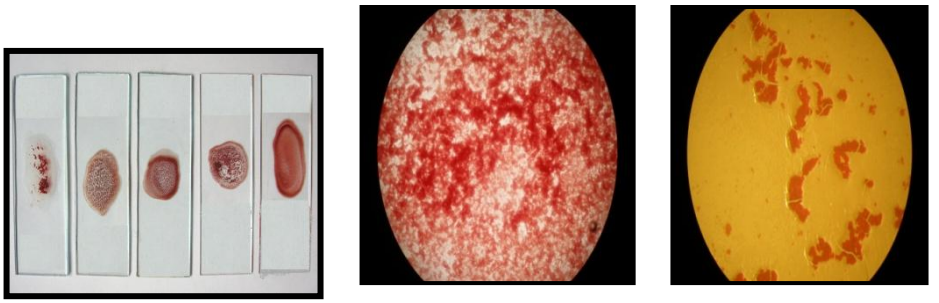
La toate testele de Crossmatch major efectuate între cele 4 femele, din familia de Ciobănesc German, am obținut reacții negative. Ele au fost încadrate în grupa 1(-)B din sistemul SHIGETA, fiind totodată şi DEA1 negative, prin extrapolare în sistemul DEA. Reacțiile de Crossmatch major negative şi apartenența la aceeaşi grupă sanguină corespund nivelului maxim de compatibilitate sanguină, ceea ce reflectă şi omogenitatea genotipică a acestei familii. Utilizarea acestor teste de compatibilitate şi în cazul eşantionului de pacienți transfuzați cu sânge integral (n = 22), a contribuit la recuperarea lor în cea mai mare proporție (90, 9%). Aflați în stare clincă critică, 2 dintre pacienți au avut evoluții foarte grave, asociate cu hemoliză fatală după a 3-a, respectiv a 4-a transfuzie cu sânge de la donatori compatibili (*Ognean* şi col, 2008). Reacții de incompatibilitate sanguină, cu intensitate de la + la ++++ (tabel 1) am obținut la testele de Crossmatch major efectuate între Rotweillerul cu osteosarcom şi 10 dintre cei 12 potențiali donatori testați, incluzând şi câinele cu limfom (fig. 1 A şi B). Reacțiile de aglutinare s-au exprimat la fel de evident atât în tub, cât şi pe lamă (fig. 2 A şi B). Au fost compatibili doar 2 dintre câinii testați, ambii Ciobaneşti Germani.

Tabel 1. Evoluția intensității reacțiilor de aglutinare la testele încrucişate de compatibilitate

Testul (nr.)	DONATORI	RECEPTORI	CROSSMATCH MAJOR	CROSSMATCH MINOR
1	Rotweiller	Pacient (Rotweiller cu osteosarcom)	+++	-
2	Ciobanesc mioritic		++	-
3	Metis		++++	-
4	Labrador retriever		++	-
5	Ciobanesc German		-	-
6	Metis		+++	-
7	Ciobanesc German		+++	-
8	Ciobanesc German		-	-
9	Metis		++++	-
10	Foxterrier		+++	-
11	Metis		++++	
12	Rotweiller (1)	Ciobanesc mioritic (2)	-	-
13	Metis (3)	Labrador retriever (4)	-	-
14	Foxterrier (10)	Pacient	++++	-

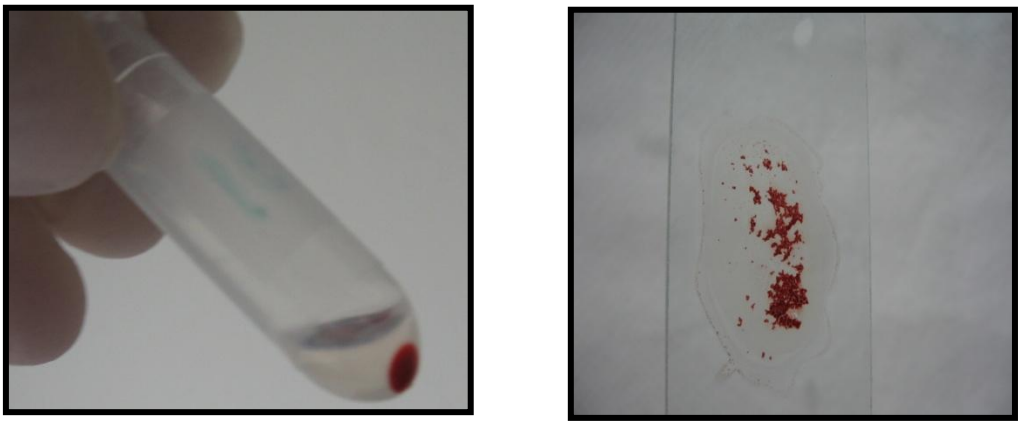
Conform altor constatării în domeniu, detectarea titrurilor crescute de aloanticorpi posttransfuzionali la câine se poate baza şi pe tehnicile de Crossmatch major pe lamă, care pot fi la fel de relevante ca şi cele în tub. Evaluările mai complexe de compatibilitate sanguină necesitând însă şi tipizarea grupelor sanguine.

Incompatibilitatea nu s-a manifestat în cazul testelor de Crossmatch minor, care au fost negative în totalitatea lor. Conform aşteptărilor, la testele de Crossmatch major şi minor efectuate între donatori am obținut reacții negative, exceptând câinele cu limfom la care reacția de aglutinare cu unul dintre donatorii sănătoşi a fost pozitivă (+++). Testele de autoaglutinare efectuate în cazul acestui pacient au fost negative, iar la verificările cu seruri de uz uman s-au obținut de asemenea reacții negative, excluzând posibilitatea ca acesta să fie DEA 7 pozitiv. În acest context amintim că, *Bowdler* şi col. (1971), consideră că există o oarecare identitate între antigenul canin Tr (DEA7) şi antigenul eritrocitar A de la om.



A *B* *(x 4)* *(x 2,5)*

Fig. 1. Testul de Crossmacth major - aspectul macroscopic (A) şi microscopic (B) al aglutinărilor de diferite intensităţi, înregistrate între parteneri incompatibili .



A *B*

Fig. 2. Testul de Crossmacth major - reacţie pozitivă de aglutinare (++++) în tub (A) şi pe lamă (B) între pacient şi un donator incompatibil.

Siguranţa hemoterapiei şi minimalizarea oricărui risc posttransfuzional necesită şi în cazul animalelor de companie verificarea compatibilităţii sanguine, prin testele de grupă sanguină şi/sau Crossmatch pentru detectarea aloanticorpilor preformaţi. Se cunosc diverse mecanisme imune (hipersensibilizare de tip 2) sau nonimune implicate în producerea reacţiilor posttransfuzionale imediate sau întârziate. Dintre evoluţiile asemănătoare cu cele prezentate de noi, amintim doar semnalarea unui caz tipic de reacţie hemolitică posttransfuzională la un câine de către *Callan şi col*. (1995). La testarea serurilor postransfuzionale (din zilele 1-16) ale acestui pacient cu 4 potenţiali donori, cu grupe diferite, s-au obţinut Crossmatch-uri majore compatibile în ziua 1 şi incompatibile în ziua 16, ceea ce nu exclude o eventuală sensibilizare antetransfuzională a pacientului. Faptul că hematiile unui pui (DEA 1.2, 4 şi 7 pozitiv) al acestui pacient n-au aglutinat la incubarea cu celule paterne de 16 zile, exclude posibilitatea ca aloanticorpi anti DEA 1.1 găsiţi să fie proprii pacientului. Astfel, se mai confirmă încă odată posibilitatea existenţei de aloanticorpi la câinii trecuţi printr-o primă transfuzie, chiar dacă au crossmatchul compatibil cu mai mulţi donatori, puii constituind o sursă sigură de sânge compatibil, deoarece se află de regulă la prima transfuzie. Frecvenţa

aloanticorpilor formaţi după transfuziile incompatibile poate fi foarte mare în unele populaţii canine (92 - 99%). Ei se întâlnesc de regulă la câinii DEA 1.1 negativi şi produc frecvent hemolize posttransfuzionale la câinii DEA 1.2 si 4 pozitivi. Pretransfuzional se impune deci, testul de Crossmatch la câinii care au beneficiat deja de o hemotransfuzie şi la cățelele care au avut pui, deoarece prima terapie cu sânge nu ar trebui să creeze probleme, aşa cum se întâmplă în cazul pisicilor, care pot prezenta titruri crescute de anticorpi naturali.

Situaţia este diferită în cazul pacientului nostru cu osteosarcom, deoarece nici el şi nici donatorii testaţi nu au mai beneficiat de hemotransfuzie şi cu toate acestea am obţinut 10 reacţii de aglutinare, unele cu intensitate mare. În acest caz se poate presupune formarea de anticorpi faţă de anumite proteine străine induse de cancer, care să dea reacţii încrucişate cu hematiile altor câini sănătoşi. Mai mult, rezultul a fost asemănător şi în cazul câinelui cu limfom, în plasma căruia au apărut anticorpi aglutinanţi pentru hematiile unui câine sănătos. Hematiile pacientului cu limfom au aglutinat cu plasma Rotweillerului cu osteosarcom, dar nu şi invers. Din rezultatele obţinute, reiese necesitatea testării Crossmatch-lui şi a grupelor sanguine la toţi pacienţii cu cancer, care urmează a fi supuşi terapiei transfuzionale cu produse sanguine.

CONCLUZII

Investigarea compatibilităţii sanguine la câini supuşi hemotransfuziei, ca procedură de terapie intensivă, bazată în principal pe testarea încrucişată de tip Crossmatch, a relevat următoarele:

1. Tehnicile de Crossmatch major pe lamă pot fi la fel de relevante ca şi cele în tub pentru detectarea titrurilor crescute de aloanticorpi posttransfuzionali la câine, recurgerea la tipizarea grupelor sanguine fiind necesare în cazul evaluărilor mai complexe de compatibilitate;
2. Reacţiile constant negative obţinute la testarea Crossmatch-ului major într-o familie canină de Ciobăneşti Germani, confirmă lipsa de aloanticorpi preformaţi în plasma acestor câini 1(-)B pozitivi, respectiv DEA1negativi, netrecuţi încă prin vreo formă de hemoterapie şi omogeni din punct de vedere antigenic, datorita apartenenţei lor la acelaş grup sanguin;
3. Utilizarea testelor de compatibilitate a făcut posibilă transfuzia de sânge integral, cu recuperarea a 20 de câini din cei 22 supuşi terapiei intensive, evoluţia fiind fatală pentru 2 dintre aceştea, aflaţi în stare foarte gravă complicată cu hemoloză după a 3-a, respectiv, a 4-a transfuzie de sânge compatibil;
4. Obţinerea de reacţii pozitive la testele de Crossmatch major confirmă încă odată posibilitatea formării de aloanticorpi plasmatici posttransfuzionali la câine, chiar dacă testele iniţiale au fost compatibile cu mai mulţi donatori, o sursă sigură de sânge compatibil rămânând puii înainte de prima transfuzie;
5. La câine prima hemotransfuzie nu ar trebui să creeze probleme de compatibilitate, deşi pot exista cazuri cu titruri crescute de anticorpi naturali, detectabili prin testul de Crossmatch major, recomandat la toţi pacienţii care au trecut deja printr-o hemotransfuzie şi la cățelele care au avut pui;
6. Reacţiile intens pozitive înregistrate la testele de Crossmatch major dintre pacientul cu osteosarcom şi 10 potenţiali donatorii, fără ca vreunul dintre aceşti parteneri să fi beneficiat de vreo hemotransfuzie, sugerează posibilitatea formării de anticorpi, asemănători cu izoaglutininele de grupă sanguină, faţă de de anumite proteine străine induse de cancer;
7. Aglutinarea hematiilor câinelui cu limfom cu plasma Rotweillerului cu osteosarcom, dar nu şi invers, relevă necesitatea testării compatibilităţii la toţi pacienţii cu cancer supuşi terapiei transfuzionale cu produse sanguine.

BIBLIOGRAFIE

1. Bowdler AJ, Bull RW,Slating R (1971) - A canine red cell antigen related to the A antigen of human red cells.*Vox Sang*, 20: 542-554;
2. Callan MB, Jones LT, Giger U (1995) - Hemolytic transfusion reaction in a dog with an alloantibody to a common antigen. *J Vet Intern Med*, 9:227-279
3. Giger, U, Knut Stieger, Hanna Palos (2005) - Comparison of various canine blood-typing methods, *AJVR*, 66 (8): 1386-1392;
4. Hohenhaus AE (2004) - Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals, *Transfusion Medicine Review*s, 18 (2): 117-126;
5.Ognean L., Masaji Washio, Ying Qiao, Ramona Puscaş (2005) - *Actualities and perspectives regarding the blood typing in dogs.* Buletin USAMV, Cluj-Napoca, Seria Medicină Veterinară, 62: 225 – 232;
6. Ognean L., Mircean M., Cristina Cernea, Mureşan C., Trîncă S. (2008) - Testing compatibility and evaluating the risk of blood transfusions in a sample of dogs that underwent intensive therapy, *Bulletin of USAMV Cluj-Napoca,* 65 (1): 133-1380.

REPRODUCTIVE CYCLE IN PRIMITIVE DOG BREEDS SALUKI

OKON MICHAELLA, PAVLI C., ROŞCA P.
FMV, Iaşi

While in other dog breeds bred and made by man, primitive dog breeds are known for their different qualities of the reproduction characteristics. The Saluki breed, today found in both primitive and man bred genetic blood lines shows a great difference in those qualities, leaving a great question mark of the self research's results – irregularity in any aspect of the breeding and gestation.

After collecting samples and information from Saluki breeders all around the world of both types of blood lines, connecting the dots between the origins of the dog, the climate and genetic information surprising results were shown, for the first time, clearly.

In this research using the information of country of origin, current living origin and reproductive cycle information, it is clear to see that the Saluki breed although sharing a common ancestor the COO line bred hounds do show an normal irregularity in their cycles, and even more surprisingly, in their ovulating timing not only within the breed but within the same individual.

In my study research I bring the new concept of breeding and manipulating of genetic information to the spot light. Unlike the belief of the medical world – irregular is regular.

Key words: saluki, irregular reproductive cycle, breeding

In the modern world where dogs are kept as companions and pets, some breeding facilities still keep specific breeds for breeding programs, aiming on preserving some genetic qualities along their breeding program (2). As most dog breeds known today out of the 331 registered dog breeds in the FCI, only few are considered to be primitive and naturally bred in the wild including the Sloughi, Azawakh, Tazi, Taigan and the Saluki. While only few of these are registered within the FCI, most are not acknowledged (3).

The Salukis are among the fastest breeds; they were used by the sheiks to hunt gazelle. The Saluki is the only dog mentioned with honor in the Koran. Originally there were two strains, one Arabian in origin, the other Persian (1). The Saluki is a primitive origin breed, bred with natural selectivity in the Arab deserts of the Fertile Crescent, today bred both by man with breeding lines named Show Bred (SB) and individuals arriving from natural habitats, Country Of Origin (COO) which are still used in work or coursing. Although these two strains of blood lines come from the same origin know to be 9000 BC, within the years of selective breeding for shows and competition besides its external changes of the shape, coat and type, a genetic change in its reproductive cycle have been noticed as well (2).

To promote the breed and preserve its original qualities and values and producing the maximum from the breeding program it is important to understand and reveal the findings in this study.

In this study, a questionnaire sent to breeders worldwide collecting information about the breeding cycle of every bitch in their breeding program, along with a combined study* in the university of Davis, California of a genetic research and distribution of old original genetic material carried along with the man selected and bred individual hounds or COO bred blood lines. 90% of the bitches in the study have been sampled for genetic material in the Davis institute study and distribution of their genetic origin allowing accurate results and conclusions. The information used from the study in the Davis University is the first findings as the study is still not yet complete.

The purpose of the study is to establish the proper steps in breeding primitive Saluki dogs to the maximum productivity and efficiency minimizing error spectrum.

MATERIAL AND METHOD

The questionnaire, collecting information about the age of the bitch, date of first cycle and pregnancy, time period between every two cycles and its regularity and within females that have been bred also the first and last day of mounts, number of mounts, period of gestation and number of puppies born. Additional information such as blood line origin and current residence has been collected to examine a connection between the conditions and climate and the reproductive cycle in the breed and individual females.

Information has been collected from 35 Saluki bitches with an age range of 8 months to 10 years and from 10 different countries worldwide. Out of these collected sample bitches, about 75% represent COO bred individuals and 25% represent SB individuals.

RESULTS AND DISCUSSION

The estrus cycle of Saluki bitches rarely follows the norm. The first estrus may occur from 8 months to 2 years of age. Intervals between estrus may vary from five months to more than a year and it may not always follow a normal precision. Once established, the estrus cycle is fairly regular, but ovulation is highly irregular and may occur from the 5^{th} to the 28^{th} day of estrus. Vaginal smears can be helpful to predict ovulation although females smeared to a specific ovulation time have agreed to naturally mate only several days after the estimated. Also, change in color, flagging, and the beginning of withering in the valve are usually reliable signs.

Inexperienced female may be very selective or refuse a natural mating even on the ovulations days and a breeding might be missed due to this refusal. Artificial insemination may be used although from the study it was found only 25% success in AI comparing to 98% of positive gestation.

Within the same female, it have been mentioned that in at least two planned pregnancies the female have shown signs and accepted a natural breeding course with great differential of ovulation timing. This bitch presented with ovulation at the first pregnancy on days twelve to fifteen and on the second pregnancy only starting at day seventeen of estrus (Table 1). Despite the great change in ovulation irregularity, the pregnancy period was found to be the same (of sixty-one days) in this case and with the same number of puppies (eight puppies in both pregnancies).

Table 1 - Sample table with 10 representing females from the total 35 collected information about from Saluki breeders and kennels worldwide. The information in the table reflects the results and the base for the conclusions.

# bitch	Age	1^{st} cycle	Period between cycles	1^{st} pregnancy	1^{st} mount + # of mounts	Durations pregnancy	# of puppies	Method	Origin	Location
1	5.6	17 m	7-9 m	3.6	10+12+16	69	8 (6+2)	AI, AI, N	COO	SK
2	4	15 m	8 m	3.4	17+18+19	59	6 (5+1)	N	FL, USA	PA,USA
3	9	7 m	7-10 m	7 m	12+14	61	13 (3+10)	N	COO	Qatar
4	6	8 m	7.5 m	8 m	8+10+11+12	62	10 (6+4)	N	COO	Israel
5	5.5	18 m	8 m	2.5	13	62	9 (8+1)	N	COO	Israel
6	2.2	16 m	10 m	16 m	7	62	7 (3+4)	N	AUS	India
7	6.11	19 m	9-10 m	5	16	62	3 (1+2)	FRZ AI	FIN	GA, USA
8	5	11 m	6-7 m	3.5	12+14	63	4 (2+2)	N	IT	IT
9	5	18 m	8-11 m	2.5	15	60	9 (3+6)	N	COO	CA, USA
10	6	17 m	8-10 m	5	15+16	63	7 (2+5)	N	COO	GA, USA

With these results a hypothesis can be made that there is a direct effect of the female's status in a pack over four individuals, reflecting its status on the reproductive regularity. Females mentioned to be lower at the hierarchy status showed more irregularities and less success in fecundation.

CONCLUSIONS

1. A direct connection was found between the cycle irregularity and the status of the bitch within a pack of individuals of the same breed. Females mentioned to be lower in the hierarchy were tending to more irregularities in the cycle itself more than alpha females. These females showed estrus signs once per year to three times per year, depending mostly on the other females in the pack.
2. No connection was found between the ovulation date, period of gestation (from 59 to 69 with an average of 64 days) and number of puppies born. Nevertheless, the study presents surprising findings, when the female is bred a single natural mounting more male puppies were born in four different females of different blood lines. The study also shows great differences in the number of puppies born to COO lined females (average of 9 puppies/litter) in comparison to the SB lined females (average of 5.6 puppies/litter).
3. Most Saluki studs function well, but it is generally advisable to hold the bitch. Because of the difficulty of determining when ovulation will occur, several breedings are recommended.
4. No connection was found between the location of the bitch and its reproductive information, but clear findings show a direct connection with the female's blood line.

BIBLIOGRAPHY

1. Ross D. Clark & Joan R. Stainer, Medical & Genetic Aspects of Purebred Dogs, Veterinary Medicine Pub Co, 1st edition (March 1983)
2. Gail Goodman, The Saluqi: Coursing Hound of the East, Midbar Inc.; 1st edition (December 1995)
3. Brian Patrick Duggan, Saluki: The Desert Hound and the English Travelers Who Brought It to the West, McFarland (March 14, 2009)

EMERGING THERAPIES IN ACUTE SPINAL CORD INJURY

REBECCA A. PACKER,
Assistant Professor, Neurology/Neurosurgery
Department of Veterinary Clinical Sciences
Department of Basic Medical Sciences
625 Harrison Street, Lynn Hall
Purdue University
West Lafayette, IN 47907-2026 USA
rpacker@purdue.edu

Therapeutic strategies for spinal cord injury focus on several components: spinal cord decompression, minimizing the secondary injury effects (i.e., restoring normal physiology and cell membrane stability), and promoting repair and regeneration. Many promising therapies have been developed and are based on sound physiologic and therapeutic mechanisms; however, acute spinal cord injury is a highly complex system of events, and as such, theoretical and in vitro results do not always translate to in vivo success. It is important to perform well-designed, prospective, placebo-controlled, blinded studies in order to generate high quality outcome data on which to formulate reliable, evidence-based treatment decisions. Retrospective and non-comparative studies are of limited value in providing reliable outcome data in spinal cord injury.

Key words: spinal cord injury, therapy

PATHOPHYSIOLOGY OF ACUTE SPINAL CORD INJURY

Neurological dysfunction associated with acute spinal cord injury is a result of primary and secondary injury effects. ***Primary injury*** includes direct tissue trauma, such as spinal cord lacerations, contusions, and diffuse axonal injury. Additional primary effects of injury on the spinal cord include vascular injury, which can lead to vasogenic edema and spinal cord ischemia. These vascular effects subsequently contribute to secondary spinal cord injury. Vascular abnormalities may be local or systemic. As a result of severe spinal cord injury, autoregulation of blood flow to the spinal cord is impaired and spinal cord perfusion is not maintained. Due to this loss of autoregulation, immediately after spinal cord injury there is an initial brief period of systemic hypertension lasting approximately 10 minutes, followed by a period of prolonged hypotension and decreased spinal cord perfusion. The period of decreased spinal cord perfusion may last hours. It is during this period that many treatments have been developed in attempt to halt the injury process.

Secondary injury results from biochemical (cytotoxic) effects, associated with massive influx of sodium and, more significantly, calcium into the neuron. After injury, calcium influx occurs through diffusion through the damaged cell membrane, voltage-gated calcium channels, and/or glutamate-activated NMDA receptors. The initial influx of sodium and calcium into the cell may result in depolarization, which results in increased glutamate (an excitatory neurotransmitter) concentrations. Glutamate subsequently activates NMDA receptors, which results in a further influx of calcium into the cell. Repeated cell depolarization results in cytotoxic edema and neuronal cell swelling. Further biochemical effects of increased calcium include activation of the arachadonic acid cascade and activation of phospholipase A_2, and activation of the xanthine oxidase cascade resulting in free radical production. Increased calcium concentrations also impair mitochondrial function, cause vasospasm of vascular smooth muscle further contributing to spinal cord ischemia, and bind phosphorous which depletes energy (ATP) reserves of the neuron and impairs normal cellular homeostasis. Recent research out of the Center for Paralysis Research at Purdue University suggests that acrolein, a by-product of lipid peroxidation, may play a significant role in mitochondrial dysfunction, disruption of the cell membrane, oxidative stress, and the impairment of neurotransmission.

HISTORIC TREATMENT APPROACHES

Historically, treatment approaches have focused on promoting spinal cord perfusion, preventing calcium influx, and/or scavenging free radicals. Though these treatments seem to have a solid physiologic rationale, as of yet none has yielded significant improvement in outcome. Discussion of these treatments in detail is beyond the scope of this talk; however, details can be found in the review by Olby, cited in the recommended reading.[1] To date these treatments have either failed to yield notable improvement in outcome, or have had undesirable adverse effects.

Calcium channel blockers. Basis for therapy: improve spinal cord perfusion and reduce calcium influx. Therapeutic outcomes: Experimentally shown to increase spinal cord blood flow, but functional outcome studies failed to show benefit.

NMDA receptor antagonists. Basis for therapy: increased concentrations of excitatory neurotransmitters (glutamate, aspartate) occur after acute spinal cord injury, due to depolarization induced release from cells, leakage from injured neurons, and reduced uptake from ischemic astrocytes. Therapeutic outcomes: Improved functional recovery in concussive and compressive rat models; consistent results across all studies. However, significant adverse effects were observed, including sedation, ataxia, motor stimulation, cardiovascular effects, and neuronal vacuolation. Thus, a drug with similar activity but fewer side effects is needed.

Vasopressors. Basis for therapy: improve spinal cord perfusion. Therapeutic outcomes: Maintaining blood pressure improves spinal cord perfusion. One study showed benefit with hypertonic saline, otherwise no beneficial effects despite many studies being performed. Systemic hypertension does not improve spinal cord perfusion, and in fact may worsen hemorrhage and edema. Therefore the recommendation is to maintain normotension, not hypertension.

Opioid agonists/antagonists. Basis for therapy: reduce endorphin-associated local ischemia. Therapeutic outcomes: Nonspecific antagonists (naloxone) showed improvement in descending motor function if given within 8 hours, but this benefit was no better than methylprednisolone sodium succinate (MPSS). The NASCIS II trial later showed no benefit over control group. Kappa agonists and antagonists showed improved functional outcome in rat studies. It is not understood if the improvement was a result of kappa manipulation, or a non-opioid action. Another study showed that a kappa agonist decreased glutamate release and improved outcome in cerebral ischemia; however, this same drug was detrimental in spinal cord ischemia. It is speculated that this detrimental effect may have been due to a decrease in systemic blood pressure.

Thyrotropin-releasing hormone (TRH). Basis for therapy: TRH can block effects of glutamate, vasoactive agents, and the autonomic effects of opioids. Therapeutic outcomes: Improved outcome in cats with spinal injury up to 1 week post-injury. Subsequent studies in both cats and rats showed beneficial effect over naloxone, MPSS, and kappa agonists/antagonists. Adverse effects preclude widespread use of TRH, and analogs are being developed in attempt to decrease adverse effects and maintain beneficial effects.

Gangliosides. Basis for therapy: may attenuate effects of glutamate, offers a neuroprotective effect, and potentiates neurotrophic factors. Therapeutic outcomes: Improved outcome in human studies of spinal cord injury up to 3 to 4 days post-injury. Subsequent experimental studies in rats failed to show benefit, and may antagonize MPSS. There was a small beneficial effect in a trial with GM-1 ganglioside in conjunction with MPSS.

Hypothermia. Basis for therapy: neuroprotective effect due to decreasing cell metabolism, decreasing glutamate concentrations, and decreasing enzyme activation. Initial goal was to reduce spinal cord temperature to 10ºC within 3 to 6 hours post-injury. Therapeutic outcomes: High mortality rate due to respiratory failure. This treatment is logistically impractical as it requires surgery/laminectomy within 6 hours of injury. Subsequent studies modified the procedure to reduce spinal cord temperature by 1 to 3ºC by decreasing rectal temperature to 31 to 32ºC. Outcome studies are being evaluated.

Free radical scavengers. Basis for therapy: targets secondary injury cascades by scavenging free radicals and preventing lipid peroxidation. *Vitamin E/Selenium.* Therapeutic outcomes: Beneficial effect if administered prior to injury. Logistically Vitamin E cannot provide a beneficial effect if administered after injury, as it takes 5 days to achieve therapeutic concentrations. *Dimethyl sulfoxide (DMSO).* Therapeutic outcomes: Variable outcomes, extreme range of results. Adverse effects noted in studies were significant, including hemolysis, decreased spinal cord blood flow, fever, and renal toxicity.

Methylprednisolone sodium succinate (MPSS). It is worth discussing the controversy surrounding the use of corticosteroids in acute spinal cord injury. Corticosteroids as a general class of drug have no proven efficacy in spinal cord injury. Furthermore, corticosteroids shift neuronal cell metabolism to anaerobic metabolism, which further promotes secondary injury cascades. Methylprednisolone sodium succinate (MPSS) is different than other corticosteroids, in that the methyl group provides free radical scavenging properties. This is a property unique to this steroid specifically, and this free radical scavenging property is not present in other steroid formulations. For this reason, MPSS has been the focus of numerous spinal cord injury studies, most notably the NASCIS II and III human trials. Results of the NASCIS II trial were as follows.[2,3] All patients received treatment within 12 hours of injury. Those patients that received MPSS had an improved sensory outcome at 6 months compared to controls, though this difference was lost at 1 year. Motor function remained better at 6 months and 1 year in the MPSS group compared to the control group. The subsequent NASCIS III trial included patients treated within 8 hours of injury. No significant differences in any group at any time point in the study. This prompted further look into the timing of treatment, and groups were divided into whether they received MPSS within 3 hours versus 8 hours of injury. The 3 hour group had significantly better motor scores at 6 weeks and 6 months, although again this difference was lost at 1 year. No difference was identified in sensory scores between MPSS and control patients, and no difference was identified in Functional Independence Measure (FIM) at 1 year.[2,3]

Though these and other studies show conflicting results, there is no evidence to show a clear benefit to MPSS in spinal cord injury to date, and even more limited information exists for veterinary patients. Due to variation in outcome measures, dosing schemes, and patient populations, comparative assessment of these studies is difficult. For this reason, a large, multi-institutional, double-blinded, placebo-controlled veterinary clinical trial is ongoing to investigate the use of MPSS in spinal cord injury, and to compare the outcome of acute spinal cord injury patients receiving either MPSS, polyethylene glycol (PEG), or placebo. Through the use of detailed treatment administration protocols, detailed criteria for neurological assessment, and videotaped neurological examinations which will be evaluated by blinded clinicians at one central location, typical study variability will be minimized.

EMERGING TREATMENTS AND PRELIMINARY CLINICAL OUTCOME DATA

As the consequences of spinal cord trauma are so severe, there is a great focus placed on developing effective treatments for this condition. Treatments are largely aimed at preventing the secondary injury cascades, though some of the treatments below (e.g., OFS, inosine) target the primary injury effects. Often these primary treatments are combined with adjunctive therapies to target both primary and secondary injury concurrently.

Polyethylene glycol (PEG) [Sigma, Hybridoma grade, MW 3,000-3,700] is a polymer surfactant that has the ability to stabilize cell membranes and prevent or minimize secondary injury cascades by stabilizing sodium and calcium influx. As this is intended to prevent secondary injury effects, it is essential to administer PEG as soon as possible after injury. Results from a clinical trial of canine acute spinal cord injury showed significant improvement in neurological score in patients receiving PEG, with no adverse effects.[4] In this study, fifteen of 24 control dogs remained

neurologically complete paraplegics (i.e., paraplegic with no deep pain perception) at the end of the study, compared to only 3 of 19 dogs treated with PEG. Olby, et al, are currently performing a double-blinded, placebo-controlled, multi-institutional study to confirm these results. Preliminary human clinical trials are currently in the planning stages.

The published[4] canine dose protocol for acute spinal cord injury is a dose of 600 mg/kg PEG [Sigma, Hybridoma grade, MW 3,000-3,700] intravenously over 15 minutes (slow administration minimizes risk of hypotension), with a second injection repeated within 4-6 hours of the initial injection. For a 5-gram vial of lyophilized powder, add 16.67 mL sterile saline to make a 25% solution (250 mg/mL). Mix for 30 minutes or until *completely* dissolved, and administer intravenously through a 5-micron filtered needle.

Methylprednisolone sodium succinate (MPSS). As described above,[2,3] the basis for the use of MPSS in spinal cord injury is due to its free radical scavenging property imparted by the methyl group. The benefit of MPSS in the treatment of spinal cord injury remains controversial and remains to be definitively determined by further clinical trials.

Oscillating Field Stimulator (OFS). The beneficial effect of voltage gradients in promoting axonal regeneration and growth is well established in the literature. This growth occurs in the direction of the cathode, which prompted Borgens, et al,[5] to develop an oscillating source of weak current that alternates every 15 minutes, such that growth would be promoted in both ascending sensory and descending motor axons. In the Borgens et al, study,[5] outcome was assessed based on electrophysiologic studies of evoked potentials, proprioceptive placing of the pelvic limbs, ambulation, and superficial and deep pain perception. Neurologic scores in individual categories of proprioception and ambulation did not achieve statistical significance, and those of superficial and deep pain perception approached significance. The total neurologic score of the OFS treated group was significantly higher than that of controls. No complications occurred as a result of treatment with OFS. Based on these results, a Phase 1 human trial in acute spinal cord injury was initiated, and preliminary results showed statistically significant improvement in neurological status compared to historic control populations.[6] Overall, the OFS has shown enough potential for improved outcome in the treatment of acute spinal cord injury to warrant FDA approval for continuation of the Phase 1 trials in human spinal cord injury.

Inosine osmotic pump. Inosine is a neurotrophic factor thought to enhance axonal regeneration and transport. In the described studies it has been delivered through an osmotic pump as a continuous infusion. In experimental spinal cord injury models, inosine, both alone and in combination with the OFS, resulted in improvement in sensory function.[7] Significant improvement in naturally-occurring spinal injury patients treated with inosine as a sole agent has not been observed thus far. Clinical trials in chronic spinal cord injury using a combination of OFS and the inosine pump are ongoing.

4-Aminopyridine (4-AP) is a potassium-channel blocker used to treat multiple sclerosis in humans. The basis for its use in spinal cord injury stems from in vitro studies in which injury-induced conduction block was reversed using 4-AP.[8,9] Injured nerve fibers commonly undergo demyelination, which exposes potassium channels resulting in potassium leakage and impaired axonal conductance. Preliminary studies confirmed an electrophysiologic benefit of 4-AP in spinal cord injury. Subsequent clinical studies in naturally-occurring canine spinal cord injury patients showed some degree of neurological benefit, which appeared dose-dependent.[9] At higher doses, however, anxiety, tremors and seizures occurred in some patients. In attempt to enhance the therapeutic window of the drug, several novel derivatives of 4-AP were developed at the Center for Paralysis Research.[10,11,12] In recent studies by Olby, et al, the n-(4-pyridyl)-t-butyl-carbamate (t-BC) derivative of 4-AP showed significant clinical potential for increased potency with no reported side effects.[13,14] An additional advantage of this drug compared to other spinal cord treatments is its application of use in patients with long-standing chronic deficits, whereas most treatments are aimed at the immediate acute-phase of spinal cord injury. In summary, the t-BC derivative of the potassium-channel blocker 4-AP has shown

promise in preliminary studies in canine spinal injury patients, and larger clinical trials are ongoing with this derivative in patients with chronic spinal cord injury.

Acrolein scavengers. Acrolein appears to play an important role in secondary spinal cord injury.[15,16] Hydralazine is an acrolein scavenger. Treatment with hydralazine appears to alleviate acrolein-mediated injury; however, the notable side effect of hypotension during in vivo studies limits its use at effective doses. Hydralazine and its derivatives are currently being investigated further.

BIBLIOGRAPHY

1. Olby N. Current concepts in the management of acute spinal cord injury. J Vet Intern Med 1999;13(5):399-407.
2. Bracken MB, Holford TR. Neurological and functional status 1 year after acute spinal cord injury: estimates of functional recovery in National Acute Spinal Cord Injury Study II from results modeled in National Acute Spinal Cord Injury Study III. J Neurosurg 2002;96(3 Suppl):259-266.
3. Coleman WP, Benzel D, Cahill DW, et al. A critical appraisal of the reporting of the National Acute Spinal Cord Injury Studies (II and III) of methylprednisolone in acute spinal cord injury. J Spinal Disord 2000;13(3):185-199.
4. Laverty PH, Leskovar A, Breur GJ, et al. A preliminary study of intravenous surfactants in paraplegic dogs: polymer therapy in canine clinical SCI. J Neurotrauma 2004;21(12):1767-1777.
5. Borgens RB, Toombs JP, Breur G, et al. An imposed oscillating electrical field improves the recovery of function in neurologically complete paraplegic dogs. J Neurotrauma 1999;16(7):639-657.
6. Shapiro S, Borgens R, Pascuzzi R, et al. Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a phase 1 trial. J Neurosurg Spine 2005;2(1):3-10.
7. Bohnert DM, Purvines S, Shapiro S, Borgens RB. Simultaneous application of two neurotrophic factors after spinal cord injury. J Neurotrauma 2007;24(5):846-863.
8. Shi R, Kelly TM, Blight AR. Conduction block in acute and chronic spinal cord injury: different dose-response characteristics for reversal by 4-aminopyridine. Exp Neurol 1997;148(2):495-501.
9. Shi R, Blight AR. Differential effects of low and high concentrations of 4-aminopyridine on axonal conduction in normal and injured spinal cord. Neuroscience 1997;77(2):553-562.
10. McBride JM, Smith DT, Byrn SR, et al. 4-Aminopyridine derivatives enhance impulse conduction in guinea-pig spinal cord following traumatic injury. Neuroscience 2007;148(1):44-52.
11. McBride JM, Smith DT, Byrn SR, et al. Dose responses of three 4-aminopyridine derivatives on axonal conduction in spinal cord trauma. Eur J Pharm Sci 2006;27(2-3):237-242.
12. Smith DT, Shi R, Borgens RB, et al. Development of novel 4-aminopyridine derivatives as potential treatments for neurological injury and disease. Eur J Med Chem 2005;40(9):908-917.
13. Olby NJ, Humphrey JW, Papich M, et al. Safety and pharmacokinetics of 4-aminopyridine derivatives in dogs. J Vet Intern Med 2008;22:722-722.
14. Olby NJ, Parke N, Spinapolis K, et al. Phase 1 clinical trial of 4-aminopyridine derivatives in dogs with chronic myelopathies. J Vet Intern Med 2008;22:722-722.
15. Hamann K, Durkes A, Ouyang H, et al. Critical role of acrolein in secondary injury following ex vivo spinal cord trauma. J Neurochem 2008;107(3):712-721.
16. Hamann K, Nehrt G, Ouyang H, et al. Hydralazine inhibits compression and acrolein-mediated injuries in ex vivo spinal cord. J Neurochem 2008;104(3):708-718.

TESTE SPECIALE UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL CLINIC AL TULBURĂRILOR NEUROLOGICE LA CÂINE

SPECIAL TEST USED IN CLINICAL DIAGNOSTIC OF NEUROLOGICAL DISEASES IN DOG

I. PAPUC, RADU LĂCĂTUŞ, R.C. PURDOIU
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj Napoca
Facultatea de Medicină Veterinară

Establishing the clinical diagnosis of a canine neurologic disorder requires the steps of the examination and their order to be well known and applied accordingly. The neurological examination must be organised in such a way to provide sufficient data on the identity of the pacient, on the onset and evolution of the disease and on the status of the pacient's nervous system, as revealed by the functional and physical exams. Complementary exams will confirm to the clinician the etiology of the lesion.

The purpose of this study was to select the most relevant tests used in the diagnosis of the neurological disorders, and to adapt them to the canine species. Based on this selection, we have conceived a medical history sheet and an exam protocol to be used in the diagnosis of major neurologic syndromes in dogs.

As working method, we have perfomed five cathegories of neurological tests: postural reactions, spinal reflexes, examination of the cranial nerves, superficial sensibility and pain perception.

The results of these tests have led us to establish the elements of the nervous system wich were examined, the normal and the abnormal responses for each test. Combining the results of all tests applied to a pacient provides the clinical neurologic diagnosis.

Key words: neurological examination, postural reaction, plexor.

Alegerea temei a fost impusă de numărul relativ restrâns de date oferite de literatura de specialitate din ţara noastră în domeniul neurologiei veterinare şi de modul în care sunt structurate, majoritatea lor fiind organizate după un model didactic în defavoarea unui model pragmatic.

Stabilirea unui diagnostic clinic de tulburare neurologică reprezintă un proces destul de anevoios datorită echivocului şi complexităţii simptomelor, mecanismelor fiziopatologice implicate şi diversităţii etiologiei (Adameşteanu, 1966; Ghergariu, 1995).

Pentru a se putea stabili un diagnostic clinic de tulburare neurologică la câine, se impune ca etapele consultaţiei să fie stabilite în prealabil şi aplicate într-o ordine logică. O consultaţie neurologică corectă presupune efectuarea următoarelor etape de examinare: *luarea datelor anamnetice*, care să pună accentul pe modul de apariţie şi de evoluţie a simptomelor, *evaluarea stării de conştienţă a animalului*, *evaluarea comportamentului*, *evaluarea atitudinilor adoptate de animal*, dacă este posibil *se examinează deplasarea* şi *mişcările anormale* şi în final *evaluarea reacţiilor posturale* (Cauzinille, 2003; Curtis, 2003).

Datele de identificare ale animalului delimitează categoriile principale ale posibilelor patologii neurologice, în sensul că un animal tânăr este susceptibil a avea o afecţiune nervoasă congenitală, inflamatorie sau infecţioasă, în vreme ce un animal mai în vârstă este mai plauzibil a avea o patologie degenerativă, tumorală sau inflamatorie (Lorenz et al., 2004). Modul de instalare a bolii şi evoluţia în timp a acesteia constituie modalităţi de orientare a diagnosticului către etiologia bolii. În *afecţiunile vasculare* semnele clinice apar brusc; în *tulburările metabolice* manifestările se înrăutăţesc progresiv; în *afecţiunile inflamatorii* semnele clinice apar pe parcursul a câteva zile sau săptămâni; iar în *afecţiunile neoplazice* sau *degenerative* evoluţia bolii este mult mai lentă, iar semnele clinice se pot intensifica uneori foarte rapid (Wheeler, 1995; Lorenz, 2004; Escriou, 2005).

Pe baza diagnosticului clinic se vor iniția şi alte examene complementare care vor orienta diagnosticul către etiologia bolii. Ca **examene complementare în neurologie** frecvent sunt utilizate următoarele: *examenul lichidului cerebro-spinal, analize sanguine* (dozări biochimice sau analize serologice), *radiografia simplă, mielografia, tomodensimetria, tomografia, electromiografia, analiza histologică, ecografia cerebrală, rezonanța magnetică nucleară* şi *scintigrafia cerebrală* (Escriou, 2005; Papuc, 2005).

METODĂ ŞI MATERIAL

Materialul biologic a fost reprezentat de câini de rasă, sex şi vârstă diferite.

Instrumentarul de lucru: ciocan plesimetric, pensă hemostatică, lanternă, tampoane de vată, spirt, soluție salină.

Metoda de lucru. S-au utilizat 4 categorii de teste: *reacții posturale* (8 teste); *reflexe medulare* (8 teste); *examinarea nervilor cranieni* (10 teste) şi *verificarea sensibilității* (2 teste).

REZULTATE ŞI DISCUȚII

Pentru fiecare test neurologic utilizat s-a evidențiat următoarele aspecte:

- elementele evoluate de test;
- răspunsul normal la test;
- răspunsul anormal la test.

REACȚII POSTURALE

Testul propriocepției

Mod de realizare: se ridică animalul astfel încât să nu facă sprijin pe sol decât cu membrul testat şi apoi este înclinat asfel încât greutatea lui corporală să oscileze în lateral.

Elemente testate: propriocepția conştientă, simțul tactil superficial, perceperea presiunii şi poziției în spațiu a corpului.

Răspuns normal: animalul îşi redresează imediat membrul în poziție fiziologică.

Răspuns anormal: animalul nu reacționează sau chiar pune greutate pe membrul poziționat anormal.

Testul roabei

Mod de realizare: se ridică moderat trenul posterior al animalului, astfel încât toată greutatea corporală să fie susținută de membrele anterioare; i se imprimă mişcări de avansare sau de lateralitate.

Elemente testate: integritatea măduvei spinării, porțiunea sa anterioară C_3–C_7

Răspuns normal: în ambele situații animalul se deplasează în direcțiile imprimate cu mişcări bine coordonate

Răspuns anormal: mişcările sunt inițiate cu întârziere şi sunt asimetrice datorită sprijinului mărit pe unul dintre membre; dismetrie.

Țopăit

Mod de realizare: se ridică animalul astfel încât să nu facă sprijin pe sol decât cu membrul testat şi apoi este înclinat asfel încât greutatea lui corporală să oscileze în lateral.

Elemente testate: căile senzitive şi motorii implicate în mişcarea membrelor, sistemul vestibular, controlul cortical şi subcortical al mişcărilor.

Răspuns normal: mişcări active de ţopăit cu membrul pe care face sprijin în direcţia în care este împins.

Răspuns anormal: animalul nu îşi coordonează mişcarea membrului sau nu poate face sprijin.

Reacţia posturală tonică

Mod de realizare: animalul este ridicat şi apoi coborât până când membrele posterioare iau contact cu solul.

Elemente testate: integritatea sistemului vestibular

Răspuns normal: anticipând contactul cu solul, animalul îşi extinde membrele; în momentul contactului membrele posterioare sunt deplasate caudal printr-o mişcare simetrică pentru a susţine corpul.

Răspuns anormal: asimetrie a mişcărilor, lipsa coordonării mersului sau dismetrie.

Hemistaţiune şi hemilocomoţie

Mod de realizare: se ridică simultan membrul anterior şi posterior de aceeaşi parte a corpului, apoi se imprimă animalului mişcări de înaintare sau de lateralitate.

Elemente testate: existenţa unor leziuni la nivelul encefalului contralateral părţii testate.

Răspuns normal: animalul îşi poate susţine greutatea şi execută mişcări de mers în direcţia imprimată.

Răspuns anormal: lipsa susţinerii greutăţii sau tulburări în coordonarea mişcărilor

Percepţie tactilă

Mod de realizare: animalul este susţinut de examinator de la nivelul toracelui şi i se acoperă ochii; se aproprie de o masă astfel încât faţa dorsală a regiunii carpiene, respectiv tarsiene să vină în contact cu marginea mesei.

Elemente testate: integritatea receptorilor tactili, a căilor senzitive de la nivelul măduvei spinării până la cortex, precum şi a celor motorii.

Răspuns normal: în momentul contactului animalul îşi ridică membrul toracic, respectiv pelvin şi îl sprijină în poziţie normală pe suprafaţa mesei.

Răspuns anormal: deficit în corectarea poziţiei membrului cu sprijin anormal

Tonus cervical

Elemente testate: integritatea sistemului senzorial şi motor al regiunii testate, precum şi a controlului cortical şi subcortical al mişcărilor

Percepţie tactilă

Elemente testate: integritatea receptorilor tactili, a căilor senzitive de la nivelul măduvei spinării până la cortex, precum şi a celor motorii.

Răspuns normal: în momentul contactului animalul îşi ridică membrul toracic, respectiv pelvin şi îl sprijină în poziţie normală pe suprafaţa mesei.

Răspuns anormal: deficit în corectarea poziţiei membrelor, cu sprijin anormal.

Percepţie vizuală

Elemente testate: integritatea percepţiei vizuale şi a nervilor optici, a cortexului şi a componentei motorii de la cortex până la măduva spinării.

REFLEXE MEDULARE

Reflexul patelar

Mod de realizare: animalul este plasat în decubit lateral; ligamentul patelar median este uşor lovit cu un ciocan plesimetric.

Elemente testate: nervul femural şi regiunea L_4-L_6 medulară.
Răspuns normal: extensia membrului ca urmare a contracţiei muşchiului cvadriceps.
*Răspuns anorma*l: lipsa, diminuarea sau exgerarea mişcării cu un ciocan plesimetric.

Reflexul tibial cranial

Mod de realizare: animalul se află în decubit lateral; examinatorul loveşte uşor muşchiul tibial cranial în regiunea proximală a tibiei
Elemente testate: ramura fibulară a nervului sciatic şi segmentele L_6-L_7 medulare
Răspuns normal: flexarea jaretului
Răspuns anormal: lipsa, diminuarea sau exagerarea mişcării

Reflexul supracarpian

Mod de realizare: animalul este aşezat în decubit lateral, se percutează tendonul extensor carpo-radial.
Elemente testate: nervul carpian şi regiunea C_7-T_1 medulară
Răspuns normal: extensia articulaţiei radio-carpo-metacarpiene.
Răspuns anormal: lipsa, diminuarea sau exagerarea mişcării.

Flexarea membrului anterior

Mod de realizare: animalul este aşezat în decubit lateral şi se stimulează membrul anterior cu un stimul neplăcut dar nu dureros
Elemente testate: regiunea C_5-T_1 medulară
Răspuns normal: flexarea întregului membru
Răspuns anormal: lipsa, diminuarea sau exagerarea retragerii membrului.

Flexarea membrului posterior

Elemente testate: regiunea L_4-S_1 medulară.

Extensie încrucişată

Elemente testate: integritatea căilor descendente ipsilaterale

Reflexul perianal

Elemente testate: regiunea S_1-$S_{2(3)}$ medulară şi nervul pudend

Reflexul interdigital (babinski)

Elemente testate: integritatea corticală, medulară lombară şi a nervilor ischiatici

EXAMINAREA NERVILOR CRANIENI

Simţul olfactiv

Mod de realizare: apropierea de nările animalului a unei bucăţi de tifon îmbibate cu alcool sau eter.
Elemente testate: nervul olfactiv(I)
Răspuns normal: perceperea mirosului declanşează retragerea capului şi lingerea botului
Răspuns anormal: lipsa reacţiilor descrise

Clipire la ameninţare

Mod de realizare: efectuarea unui gest de ameninţare înspre ochiul examinat, fără a produce curenţi de aer sau a atinge regiunea.

Elemente testate: ochiul, nervul optic (II) şi nervul facial (ramura motorie din VII)
Răspuns normal: clipire
Răspuns anormal: absența sau diminuarea clipirii

Reflexul pupilar

Mod de realizare: se realizează într-o zonă cu luminozitate redusă; un fascicul puternic de lumină este îndreptat pe rând către fiecare ochi al animalului.
Elemente testate: ochiul, nevrul optic (II) şi oculomotor (III)
Răspuns normal: apare mioză ipsi şi contralaterală ochiului stimulat
Răspuns anormal: lipsa sau diminuarea contracției pupilare

Reflexul palpebral

Mod de realizare: se atinge cu mâna regiunea pleoapelor fără a face mişcări care să atragă reflexul de clipire
Elemente testate: ramura oflatmică a nervului trigemen (V) şi nervul facial (VII), ramura motorie
Răspuns normal: animalul clipeşte
Răspuns anormal: lipsa sau diminuarea contracției pleoapelor

Reflexul cornean

Mod de realizare: atingerea corneei cu un tampon îmbibat în ser fizilogic
Elemente testate: nervul abducent (oculomotor extern, VI)
Răspuns normal: retracția globului ocular şi evidențierea pleoapei a treia
Răspuns anormal: lipsa modificărilor la nivelul globului ocular

Nistagmus fiziologic/patologic

Mod de realizare: se imprimă capului animalului mişcări de lateralitate şi se urmăresc mişcările oculare.
Elemente testate: nervul vestibulo-cohlear (VIII)
Răspuns normal: mişcare sacadată a ochilor în direcția în care se întoarce capul
Răspuns anormal: absența nistagmusului fiziologic sau prezența unui nistagmus permanent

Strabism

Elemente testate: nervii oculomotor (III) şi trochlear (IV)

Sensibilitatea feței

Elemente testate: ramura mandibulară a nervului trigemen (V)

Expresia feței

Elemente testate: nervul facial (VII)

Deglutiție

Elemente testate: nervul glosofaringian (IX), nervul vag (X) şi componenta motorie a nervilor trigemen (V) şi hipoglos (XII)

VERIFICAREA SENSIBILITĂȚII

Reflexul panicular

Mod de realizare: se stimulează pielea de fiecare parte a liniei mediale a spinării, prin ciupire cu o pensă sau înțepare uşoară cu un ac.

Elemente testate: integritatea măduvei spinării cu 1-2 vertebre cranial faţă de locul stimulat
Răspuns normal: uşoară contracţie a pielii în zona stimulată
Răspuns anormal: absenţa contracţiei

Sensibilitatea dureroasă

Mod de realizare: Animalul se aşează în decubit lateral şi se stimulează membrul posterior aşezat deasupra prin înţeparea unui deget cu ajutorul unui ac sau prin strângere cu o pensă hemostatică.

Elemente testate: evaluarea gravitaţii leziunilor medulare ce atrag paralizii şi pareze.

Răspuns normal: pe lângă retragerea membrului, animalul se întoarce, emite vocalizări încearcă să muşte.

Răspuns anormal: animalul nu răspunde decât la o presiune foarte mare asupra degetelor, sau este complet areactiv.

CONCLUZII

1. Pe baza rezultatelor obţinute în urma aplicării testelor, s-a conceput o foaie de observaţie clinică şi un chestionar pentru anamneză pe baza cărora se poate stabili diagnosticul de tulburare neurologică. Cele două instrumente se constituie într-un protocol de lucru clar structurat ce facilitează munca examinatorului, prin reducerea timpului alocat consultaţiei şi evitarea omiterii unor etape în examinare.
2. Chestionarul pentru anamneză cuprinde date de identificare ale proprietarului, date de identificare ale pacientului, date despre declanşarea şi evoluţia bolii.
3. Foaia de consultaţie neurologică este structurată după următorul model (adaptată după cauzinille, 2003):

FIŞĂ DE CONSULTAȚIE NEUROLOGICĂ LA CÂINE

DATE DE IDENTIFICARE

NUME Proprietar: . . . .

NUME Animal: . . . .

RASA: . . . .

VÂRSTA: . . . .

SEXUL: □ Mascul □ Femelă □ Castrat/Sterilizată

GREUTATEA: . . . .

ANAMNEZĂ: . . . .

. . . .

1. EXAMEN GENERAL:

STATUS MENTAL:

□ normal

□ inhibiție corticală: apatie /stupoare / lipotimie / catalepsie / comă

□ excitație corticală: halucinație / acces rabiform / retivitate / stare isteriformă

□ alte mențiuni: . . . .

POSTURĂ/ ATITUDINI

□ **normale**

□ **modificate**

- cap: . . . .
- trunchi: . . . .
- membre: . . . .
- alte mențiuni: . . . .

DEPLASARE/MIŞCĂRI:

□ normale

□ astazie

□ ataxie

□ manej

□ piruetare

□ pulsiuni

□ rostogolire

□ dromomanie

□ altele: . . . .

2. REACŢII POSTURALE:*

Stânga	Reacţii	Dreapta
	Propriocepţie mb.[1] anterioare	
	Propriocepţie mb. posterioare	
	Testul roabei	
	Ţopăit anterior	
	Ţopăit posterior	
	Reacţie posturală tonică	
	Hemistaţiune – Hemilocomoţie	
	Tonus Cervical	
	Percepţie tactilă – mb. anterioare	
	Percepţie tactilă – mb. posterioare	
	Percepţie vizuală – mb. anterioare	
	Percepţie vizuală – mb. posterioare	

3. REFLEXE MEDULARE:

Stânga	Reflex. Segmentul explorat	Dreapta
	R.[2] Patelar. L4-L6 + n. femural	
	R. tibial cranial. L6- L7 + ramura fibulară a nervului sciatic	
	R. supracarpian. C7- T1 + n. radial	
	Flexarea mb. anterioare	
	Extensie încrucişată mb. anterioare	
	Flexarea mb. posterioare	
	Extensie încrucişată mb. posterioare	
	R. perineal. S1-S2/S3 + n. pudend uneori	

4. EXAMINAREA NERVILOR CRANIENI:

Stânga	Funcţie - Nerv	Dreapta
	Simţul mirosului - I	
	Clipire la ameninţare – vedere, II, VII	
	R. pupilar ipsilateral – II, III	
	R. pupilar contralateral – M II, III, direct	
	R. palpebral – V, VII	
	Strabism - III, IV, VI	
	Reflexul corneean - VI	
	Nistagmus – VIII	
	Sensibilitatea feţei – V	
	Expresia feţei (trufă, buze, regiunea obrajilor) – VII	
	Deglutiţie – IX, X, V, XII	

5. SENSIBILITATE:

- Hiperestezie: . . . . . .
- Durere superficială: . . . . . .
- Durere profundă: . . . . . .
- Reflex panicular: . . . . . .
- A se menţiona dacă există durere cervicală (orizontal – vertical): . . . . . .

6. CONCLUZIE:

Examene paraclinice propuse:

* Notarea reacţiilor/reflexelor: Absent(ă) = 0 Diminuat(ă) = 1 Normal(ă) = 2 Exagerat(ă) = 3 sau 4

[1] mb. = membre

[2] R. = reflex

BIBLIOGRAFIE

1. Adameşteau, I., Nicolau, A., Bârză, H., 1966, *Semiologie, patologie şi clinică medicală veterinară*, vol. I, ed. Didactică şi pedagogică, Bucureşti, pag. 469-530.
2. Cauzinille, L., 2003, *Neurobiologie clinique du chien et duchat*, ed. Point Veterinaire, Maisons-Alfort, pag 22-38.
3. Curtis, W. D., 2003, *Canine and Feline Neurology*, ed. Iowa State Press, cap. 2, pag. 31-55.
4. Escriou, C., 2005,*Semiologie Neurologique,* Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
5. Ghergariu, S., 1995, *Bazele patologiei medicale a animelelor*, vol. II, ed. All, Bucureşi. pag. 113-124.
6. Lorenz, M. D., Kornegay, J. N., 2004, *Handbook of Veterinary Neurology*, ediția a IV-a, ed. Saunders, Philadelphia, cap. 1, 2, pag. 3-74.
7. Papuc, I., Lăcătuş, R., 2005, *Semiologie şi imagistică medicală veterinară. Semiologie specială.*, ed. Accent, Cluj Napoca, cap. VIII, pag. 234-268.
8. Wheeler, S. J., 1995, *Manual of Small Animal Neurology*, ediția a II-a, ed. Iowa State Press, pag. 9-36.
9. *** Fiche de consultation neurologique, 2005, Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.

ULTRASOUND DIAGNOSIS VALUE ON OVULATION, OVARIAN AND UTERUS PATHOLOGY IN SOWS

PAVLI CONSTANTIN, LIVIU RUNCEANU, TANASE OANA
FMV Iasi
pavli_constantin@yahoo.com

Real–time B-mode ultrasound for ovarian diagnosis in pigs has been used in numerous studies regarding relationship between estrus, ovulation, time of insemination, and fertility. This article describes the benefits of real-time sonography for ovarian diagnosis for fertility control in swine. The reliability of diagnosis is closely related to the experience of the investigator and the ultrasound unit used. Sonographic studies in sow herds revealed considerable differences in the variation of onset of estrus-ovulation intervals between farms. Ovarian sonography, therefore, is suggested as a useful tool to monitor the ovulation behavior on a given farm and, consequently, to establish a farmspecific insemination strategy. The majorities of the cysts regresses spontaneously and are clinically inapparent. The differential diagnosis of ovarian cysts requires repeated sonographic investigation. The main impact of ovarian diagnosis in pigs is in the detection of ovulation as a prerequisite for establishing farm-specific AI strategies and the detection of ovarian cysts as a possible cause for suboptimal fertility results.

Key words : ultrasonography sow, cysts, ovulation timing

We used the transcutaneous technique, investigation preferentially performed from the right abdominal side because on the left side the cecum hinders the finding of the inner reproductive organs. In the echographic picture the follicles of the ovaries are visible between the loops of the uterine horns. Follicles are visible only in late proestrus and estrus as black spots with a diameter between 4 and 10 mm . Differential diagnosis of follicles includes blood vessels, cysts, and early pregnancy. The diagnosis of ovulation can only be made with repeated sonographic investigation, and the time of ovulation is set halfway between the two investigation intervals in which follicles were last detected and subsequently disappeared. The accuracy of the determination of the ovulation time, therefore, strongly depends on the time interval between consecutive sonographic examinations. The duration of ovulation in spontaneously ovulating sows as studied with sonography varies between 1 and 3 h.

MATERIAL AND METHOD

For this study we used 50 show in different stages of the ovarian cycle. The animals represented the reform group in a local farm, with returnees to heat. The ultrasound scanning system was transportable, lightweight, allowing sufficient time for continuous use. The ultrasound device used was an ALOKA PROSOUND 2, probe 6-13MHz.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Structures observed, normal and pathological one:

Folicles -Time of Ovulation

Imprecise timing of insemination relative to ovulation is the main reason for subfertility in swine breeding herds.

Insemination longer than 12 to 24 h before ovulation leads to significant adverse effects on fertilization rates . Intervals between the onset of estrus and ovulation are highly variable and may last between 24 and more than 100 h in different sows.

Ovulation occurs fairly constantly at the beginning of the last third of estrus, with slight differences between herds. However, the duration of estrus shows a high variability between sows and between cycles within sows. The question of whether real-time ultrasound is a helpful tool for the prediction of ovulation time in pigs, as it is in some other domestic species, has been raised. Numerous investigations with gilts and sows could not establish a relationship between the sonographic image of follicles and the time of ovulation. At the onset of estrus, follicular diameter between sows may differ from 4 to 8 mm, whereas the intraovarian variation of follicular size is low (Figure 1-2). At the time of ovulation, follicle diameters usually range from 8 to 10 mm. There exists no relationship between the velocity of follicular growth or absolute follicular diameters and time of ovulation. In some cases preovulatory follicles lose their round shape and becoming more oval, presumably as a sign of the upcoming or ongoing collapse of the follicular wall. However, this possible change in follicular shape cannot be considered a reliable indicator for ovulation. Therefore, theroutine use of ultrasound in pig AI management for the monitoring of ovarian changes in individual sows prior to breeding is not only time-consuming but is not useful as a tool to enhance insemination efficiency.

At present, the most valuable estimation of the oncoming time of ovulation is the observation of the interval from weaning to the onset of estrus. Several studies on farms in different countries have shown that sows with short weaning-to-estrus intervals show longer estrus duration than sows with long weaning-to-estrus intervals (Weitze et al., 1994; Kemp and Soede, 1996).

More interestingly, both the range and the variation of ovulation time between sows within farms differed.

The farm-specific variation of ovulation time is a major factor for the establishment of an appropriate insemination strategy. Therefore, ultrasound diagnosis is suggested as a valuable tool to evaluate the ovulation behavior of a given sow herd. Most promising would be an approach that includes estrus detection and ovarian sonography in randomly selected sows over three or four consecutive days. Based on the evaluated data a farmspecific AI strategy can be developed.

Ovarian Cysts

Fluid-filled structures on the ovary exceeding a diameter of 11 mm generally are regarded as ovarian cysts (Schnurrbusch et al., 1981; Keenan, 1985; McEntee, 1990) and usually are easy to detect in the sonographic image (Figure's 3-4). As for differential diagnosis in the ultrasound picture, early pregnancy, delayed ovulation, paraovarian cysts, and corpora hemorrhagica have to be considered. The diagnosis of ovarian cysts, therefore, requires a careful sonographic investigation in which the location on the ovary must be verified. To distinguish ovarian cysts from delayed ovulating follicles and corpora hemorrhagica, the size (diameter) of the sonographic structure and the visualization in repeated examinations are of importance.

Follicular cysts arise from nonovulating tertiary follicles and exist as follicular thecal or follicular luteal cysts, a differentiation according to their origin is not possible using real-time ultrasound. Follicular cysts exist as single (Figure 3) or multiple (more than 2 per ovary, Figure 4) cysts with accompaning corpora lutea. Cystic follicular degeneration, however, is characterized by multiple cysts with an absence of ovulation. Previous studies on the prevalence of ovarian cysts in sows were mostly conducted on slaughterhouse.

The real-time ultrasound enabled systematic studies of the prevalence and fate of cystic structures during the estrous cycle and pregnancy. Only sows without hormonal treatment were included in the analysis.

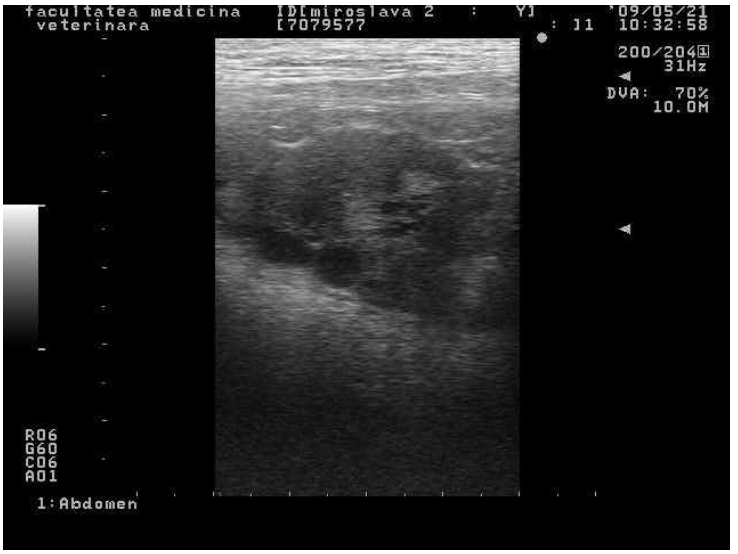


Fig. nr.1
Mature follicles, probe 7,5MHz

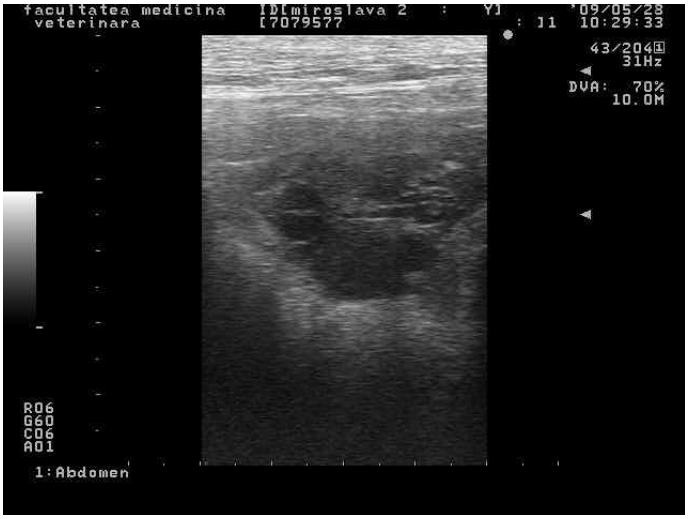


Fig. nr.2
Mature follicles, probe 6 MHz

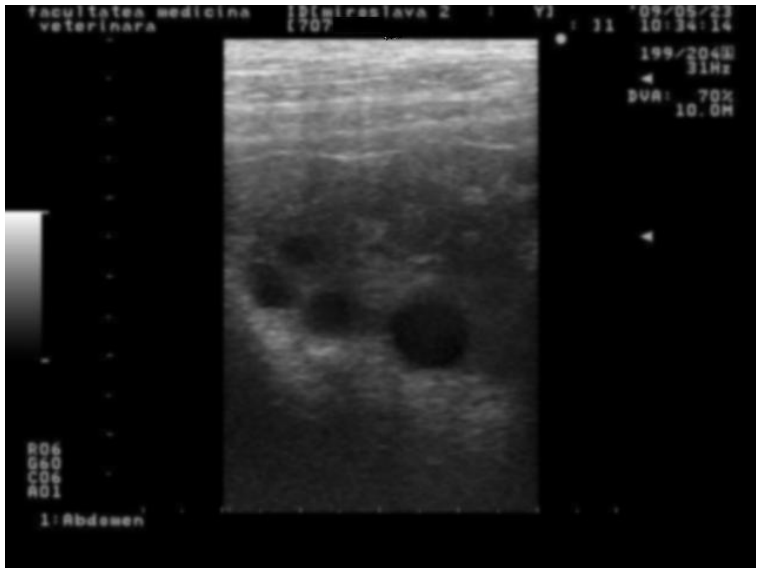


Figure nr. 3
Follicular cyst, solitary one

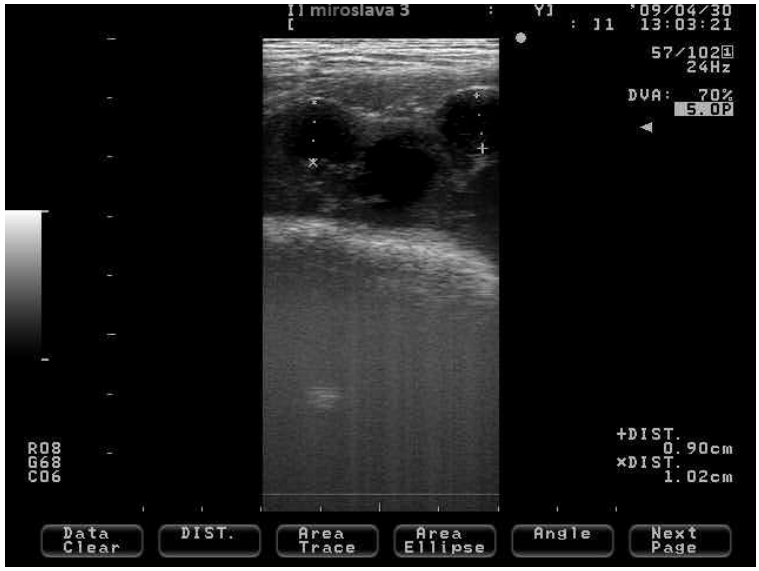


Figure nr.4
Follicular cysts

Implications

Real-time B-mode ultrasound for ovarian diagnosis in pigs is a useful tool for improving the efficiency of reproductive management on breeding farms. The main impact of ovarian diagnosis in pigs is on the detection of ovulation as a prerequisite for establishing farm-specific artificial

insemination strategies and the detection of ovarian cysts as a possible cause for suboptimal fertility results.

CONCLUSION

Real-time B-mode ultrasound for ovarian diagnosis in pigs is a useful tool for improving the efficiency of reproductive management on breeding farms.

The main impact of ovarian diagnosis in pigs is on the detection of ovulation as a prerequisite for establishing farm-specific artificial

REFERENCES

1. Almond G.W., Dial G. D., 1987 - Pregnancy diagnosis in swine: Principles, applications and accuracy of available techniques. J. Am. Vet. Med., vol. 191, pp. 858-870.
2. Ashworth J.C., 1998 - Advances in Embryo Mortality Research. Proceedings of the 15 th IPVS Congress, Birmingham, England, vol I, 231-239.
3. Dalin A. M., Nanda T., Hulten F., Einarsson S., 1995 - Ovarian activity at naturally attained oestrus in the sow: An ultrasonographic and LH study. Acta Vet. Scand., vol. 36, p. 377-382.
4. D. Waberski, A. Kunz-Schmidt, G. Borchardt Neto, L. Richter and K. F. Weitze - Real-time ultrasound diagnosis of ovulation and ovarian cystsin sows and its impact on artificial insemination efficiency. Proceedings of the American Society of Animal Science, 1999
5. Ebbert W., Bostedt H., 1993 - Cystic degeneration in porcine ovaries. Morphology of cystic ovaries, interpretation of the results. Reprod. Domest. Anim., vol. 28, p. 441-450.
6. Flowers W. L., Armstrong J. D., White S. L., Woodard T. O., Almond G. W., 1999 - Real-time ultrasonography and pregnancy diagnosis in swine. Proceedings of the American Society of Animal Science.
7. Inaba T., Nakazima K., Matsui N., Imori T., 1983 - Early pregnancy diagnosis in sows by ultrasonic linear electronic scanning. Theriogenology, vol. 20, pp. 97-101.
8. Moryoshi Masharu, Sawamura Tatsuru, Yasuda Maasaki, 1996 – Using ultrasound for clinical observation of porcine ovary through the course of the estrous cycle and tomonitor treatment of ovarian disease, Journal of reproduction and development, vol 42, no.4 1996

REAL TIME ULTRASONOGRAPHY ACCURACY IN SWINE PREGNANCY DIAGNOSIS

C. PAVLI[1], L. RUNCEANU[1], OANA TĂNASE[1], I. SĂCULŢANU[2]
[1] FMV Iaşi
[2] Grup Şcolar Agricol Miroslava, Iaşi
pavli_constantin@yahoo.com

In this paper we presented an experiment conducted to determine the effectiveness of using real-time ultrasonography for pregnancy diagnosis in swine.

The influence of stage of gestation, type of ultrasound probe, and frequency of ultrasound probe on the accuracy of pregnancy diagnosis was estimated. Specificity was low for both the 3.5-MHz (57.3%) and 6.0-MHz (58.6%) liniar probes on d 18, 19, and 20 . On d 21 and 24, it increased to 88.0% and 96.0% for the 3.5-MHz sector probe and to 96.0% and 96.0% for the 6.0-MHz liniar probe.

The probe frequency and stage of gestation interaction was significant for both accuracy and sensitivity. Both were higher on d 21 and 24 than on d 18 through 20 using the 6.0-MHz liniar probe. In contrast, with the 3.5-MHz sector probe, accuracy and sensitivity were higher on d 24 than on d 21 and better on d 21 than on d 18 through 20.

Key words: real-time sonography, ovarian diagnosis,the cysts ovarian

MATERIAL AND METHOD

Our objective was to evaluate the effectiveness of pregnancy diagnosis with real-time ultrasonography in 21 gilts and 20 shows.

Pregnancy status of all gilts was assessed on d 18, 19, 20, 21, and 24 after breeding using real-time ultrasonography with 3,5MHz sector probes (Draminski) and an 6-13MHz linear probe (Aloka prosound 2). For all pregnancy diagnoses with real-time ultrasound, the probe was placed approximately 7 cm above the last two pairs of nipples on the right side of the sow.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The frequency of the probe seemed to influence the effectiveness with which these allantoic vesicles were visualized after d 20. This is supported by the observation that accuracy and sensitivity were not different on d 21 and 24 with the 6.0-MHz probe but increased over the same time period with the 3.5-MHz probe. Probe frequency is inversely related to the distance sound waves travel from their origin (penetration depth) and positively related to the resolution or clarity of the resulting image. Typical penetration depths for 3.5- and 6.0-MHz probes are 10 to 12 and 7 to 10 cm, respectively. However, the quality of the images is superior with 6.0-MHz probes. In the present study, the combination of improved resolution and a penetration depth of 7 to 10 cm associated with the 6.0-MHz probe produced ultrasound images of the allantoic vesicles that led to highly accurate pregnancy diagnoses as early as 21 d after breeding.

It is tempting to speculate that the differences in accuracy and sensitivity between d 21 and 24 observed with the 3.5-MHz probe reflect the reduced resolution associated with this frequency. Consequently, the images produced on d 21 were not as definitive as those with the 6.0-MHz probe and, as a result, the proportion of pregnant gilts that were misdiagnosed was greater. However, by d 24, the increased size of the allantoic vesicles apparently compensated for the resolution deficiency of the 3.5-MHz probe relative to that of its 6.0-MHz counterpart such that accuracy and sensitivity were maximized.

Figure 1
Allantoic vesicles 20d

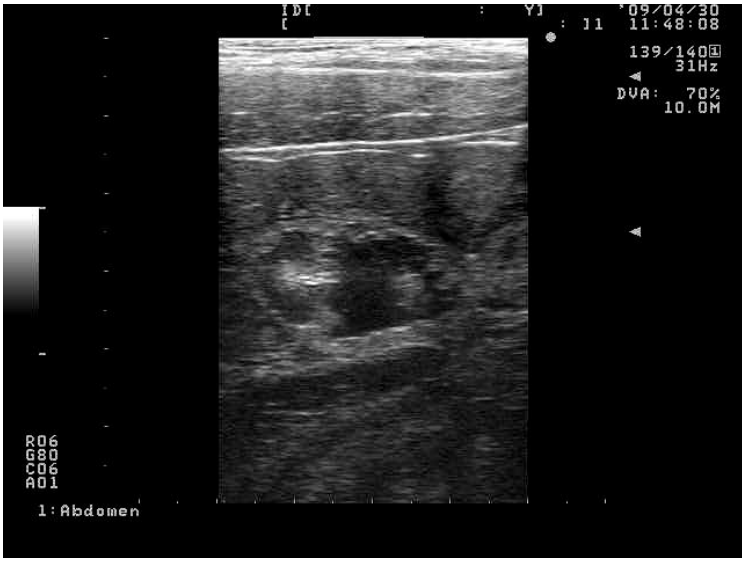


Figure 2
Allantoic vesicles, visible embryo, 27d

Figure 3
Fetus rib cage, 67d

CONCLUSION

1. Real-time (B-mode) ultrasonographic images representative of those used for diagnosis of pregnancy are shown in Figures 1 and 2. For diagnostic tests conducted from d 17 through 58 of gestation, the presence of a series of small, dark circles in the ultrasound image was interpreted as the presence of fluid in the allantois and(or) amnion of developing embryos and, thus, we determined that the female was pregnant. In contrast, an ultrasound image
2. composed mostly of gray and white masses in the vicinity of the bladder was interpreted as being representative of the absence of pregnancy.
3. For diagnosis of pregnancy between d 65 and 75 of gestation, the outline of the spinal cord and rib cage of fetuses in conjunction, at times, with observation of a fetal heartbeat were criteria used to classify sows as pregnant (figure 3).
4. Sows scanned during the same time period whose ultrasound images lacked the definitive outline of fetal skeletons were considered to be not pregnant (pseudopregnant).insemination strategies and the detection of ovarian cysts as a possibl.

REFERENCES

1. Ashworth J.C., 1998 - Advances in Embryo Mortality Research. Proceedings of the 15 th IPVS Congress, Birmingham, England, vol I, 231-239.
2. Dalin A. M., Nanda T., Hulten F., Einarsson S., 1995 - Ovarian activity at naturally attained oestrus in the sow: An ultrasonographic and LH study. Acta Vet. Scand., vol. 36, p. 377-382.
3. Ebbert W., Bostedt H., 1993 - Cystic degeneration in porcine ovaries. Morphology of cystic ovaries, interpretation of the results. Reprod. Domest. Anim., vol. 28, p. 441-450.
4. Flowers W. L., Armstrong J. D., White S. L., Woodard T. O., Almond G. W., 1999 - Real-time ultrasonography and pregnancy diagnosis in swine. Proceedings of the American Society of Animal Science.
5. Inaba T., Nakazima K., Matsui N., Imori T., 1983 - Early pregnancy diagnosis in sows by ultrasonic linear electronic scanning. Theriogenology, vol. 20, pp. 97-101.
6. Moryoshi Masharu, Sawamura Tatsuru, Yasuda Maasaki, 1996 – Using ultrasound for clinical observation of porcine ovary through the course of the estrous cycle and tomonitor treatment of ovarian disease, Journal of reproduction and development, vol 42, no.4 1996 e cause for suboptimal fertility results.

STUDIU PRIVIND COMBATEREA MONTELOR REPETATE LA VACILE DE LAPTE PRIN DIFERITE METODE [1]

CONTROL OF REPEATED BREEDING IN DAIRY COWS USING DIFERENT TREATMENTS

ANCA PLĂVĂNESCU, ELENA RUGINOSU, MARIANA SOFRONIE, L. DASCĂLU, C. POPESCU
S.C.D.C.B. Dancu
Loc. Dancu, jud. Iaşi,
scdbdancu@yahoo.com

The research was conducted on 50 BNR dairy cows, with a high milk productivity level, which had repeated-breeding (over 3 inseminations) within 2008, in the dairy farm belonging to SCDCB Dancu, Iasi.

Various hormonal therapy schemes were tested in order to reduce the incidence of this affection within the period November-December, 2008: Gn-RH (Receptal) 2,5ml, 4-6 h before insemination (E_1) and progesterone 50mg weekly in the first month after insemination (E_2).

The efficiency of the treatments was established by evaluation of the main reproductive indices: the interval between treatment and fecund artificial insemination, the Service Period, the gestation percent at different intervals after treatment and fecundity at first, second, third and over third insemination after treatment.

The study showed the following results: the interval between treatment and fecund artificial insemination had an average value of 8,61 days for group E_1 and 6,85 days for group E_2; fecundity at first insemination after treatment had an average value of 84,21% for E_1 comparing to 36,36% for E_2; the gestation percents for total inseminations were 94,74% for E_1, 54,54% for E_2 and 50% for group M, implying major differences ($P<0,001$) between experimental groups and control-group M.

Key words: repeated-breeding, hormonal therapy, fecundity

Sindromul montelor repetate reprezintă o problemă de actualitate în exploatațiile de vaci de lapte cu producție ridicată datorită ineficacității economice a acestora ce derivă din pierderile realizate prin costurile suplimentare cu furajarea, întreținerea în condiții de neproductivitate, precum şi din scăderea indicilor reproductivi şi productivi.

Există numeroase studii în literatura de specialitate care fac referire la incidența, etiologia, tabloul clinic, metodele de diagnostic şi terapie a acestor afecțiuni care determină infertilitate prin repetarea căldurilor (3,4). S-au testat diferite scheme de tratament cu produse medicamentoase (hormonale, vitaminice, antibiotice), rezultatele obținute fiind variabile de la un autor la altul (1,2,5,6).

Lucrarea de față îşi propune aplicarea a două metode de terapie hormonală în vederea îmbunătățirii fecundității la vacile cu monte repetate şi creşterea eficienței în fermele de vaci.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul a fost efectuat în cursul anului 2008, la S.C.D.C.B. Dancu – Iaşi, în cadrul fermei de vaci de lapte de rasă Bălțată cu Negru Românească, pe un lot de vaci care au prezentat monte repetate (peste 3 însămânțări artificiale).

În vederea efectuării cercetărilor s-au constituit două loturi experimentale E_1, E_2 şi un lot martor M, perioada experimentală fiind noiembrie-decembrie 2008:

1 Cercetări finanțate din PN II 51-004.

- Lotul E_1 (19 vaci) a fost tratat cu Gn-RH (Receptal 2,5 ml) administrat cu 4-6 ore înainte de IA;
- Lotul E_2 (11 vaci) a fost tratat cu Progesteron 50 mg administrat săptămânal în prima lună după IA
- Lotul M (20 vaci), a fost alcătuit din vaci cu monte repetate,netratate, din aceeaşi perioadă cu cele din loturile experimentale.

Vacile au beneficiat de aceleaşi condiţii de întreţinere, furajare, exploatare, sistem de stabulaţie legat la grajd pe timpul sezonului rece şi mixt prin rotaţie în sezonul cald. Starea de întreţinere şi sănătatea au fost bune, vacile luate în studiu având o productivitate ridicată.

Metodele de tratament aplicate au vizat dirijarea ovulaţiei prin administrarea de gonadoreline în vederea reglării funcţionalităţii axului hipotalamo-hipofizo-ovarian (lotul E_1) şi troficizarea corpului galben gestativ în prima lună post I.A. prin administrare de progesteron pentru menţinerea gestaţiei instalate (lotul E_2).

Parametrii studiaţi au fost intervalul fătare-tratament, tratament-însămânţarea fecundă, SP-ul, procentele de gestaţie realizate la diferite intervale de la tratament (30, 60, peste 60 de zile), precum şi procentele de gestaţie realizate la prima, a doua, a treia şi peste a treia însămânţare după tratament.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Vacile din loturile experimentale au avut înainte de tratament un număr mediu de însămânţări cuprins între 3,8 (E_1) şi 5,7 (E_2), iar lotul martor 4,4 (tab.1).

Tabel 1 - Numărul de însămânţări înainte de tratament la vacile luate în studiu

Specificare	vaci/lot	IA înainte de tratament n		
	n	$\overline{X}$	Min.	Max.
E1	19	3,8	3	8
E2	11	5,7	3	13
M	20	4,4	3	8

Analizând intervalul tratament - IA fecundă, s-a constatat o valoare medie de 8,61 zile cu limite de variaţie între 0 şi 86 de zile la lotul E_1 şi de 6,85 zile, valorile variind între 0 şi 37 de zile la lotul E_2.

Service period-ul a înregistrat valori medii de 263,55 zile la E_1 şi de 274,14 zile la lotul E_2 care au fost mai mici faţă de lotul martor cu 48,76 zile (E_2) şi respectiv 59,35 zile (E_1), diferenţele între loturi fiind semnificative, (tabel 2).

Tabel 2 - Rezultate privind uniii parametri de reproducţie la vacile luate în studiu

Specificare		E_1	E_2	M	diferenţe ±		
					E_1-M	E_2-M	E_1-E_2
Interval fătare-tratament (zile)	$\overline{X}$	257,5	309,6	-	-	-	-
	Min	131	93				
	Max	409	576				
Interval tratament-IA fecundă (zile)	$\overline{X}$	8,61	6,85	-	-	-	-
	Min	0	0				
	max	86	37				
SP (zile)		263,55	274,14	322,9	-59,35*	-48,76*	-10,59

* P<0,05

Comparând rezultatele obținute în acest studiu cu cele obținute de alți autori s-a constatat că în cazul tratamentului cu progesteron nu există diferențe semnificative între administrarea unei doze unice la 7-10 zile după IA şi administrarea în patru reprize în prima lună după IA(5) .

Ratele de concepție realizate la diferite intervale după tratament au prezentat valori procentuale mai mari la lotul E_1 comparativ cu lotul E_2. Până în 30 de zile de la efectuarea tratamentelor lotul E1 a înregistrat o valoare medie de 84,21%, iar lotul E2 de 54,54%, diferența (29,67%) fiind distinct semnificativă (P<0,01) (tab. 3, fig.1).

Tabel 3 - Rezultate privind procentele de gestație obținute la vaci cu monte repetate la diferite intervale de la tratament

Specificare			E_1		E_2		M		E_1-M %	E_2-M %	E_1-E_2 %
			n	%	n	%	n	%			
Gestante	Total		18	94,74	6	54,54	10	50	44,73***	4,54	40,19***
	La diferite intervale (zile)	<30	16	84,21	6	54,54	-	-	-	-	29,67**
		31-60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		>60	2	10,53	-	-	-	-	-	-	10,53*

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

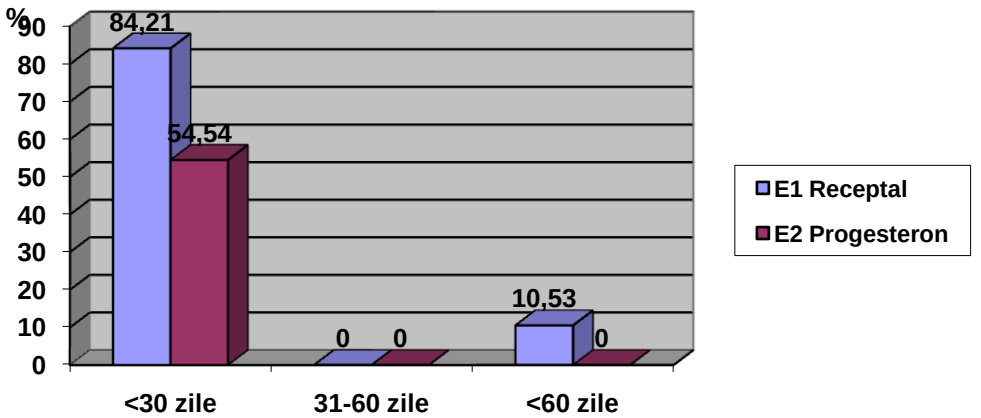


Fig.1 Procentele de gestație la diferite intervale de timp după tratament la vaci cu monte repetate

Procentele de gestație pe total însămânțări realizate de vacile luate în studiu au evidențiat valori mai mari cu 44,73% la lotul E_1 (94,74%) comparativ cu lotul martor, M (50%), diferența fiind foarte semnificativă, (P<0,001). Între loturile experimentale E_1 şi E_2 s-au constatat, de asemenea, diferențe de 40,19% foarte semnificative, în favoarea lotului E_1. Nu s-au constatat diferențe semnificative între lotul E_2 şi martor,M.

Vacile din lotul E_1 au înregistrat o fecunditate mai mare la prima IA după tratament (84,21%) comparativ cu lotul E_2 (36,36%), diferența între loturi (47,85%) fiind foarte semnificativă (P<0,001) (tab. 4).

Tabel 4 - Procentele de gestaţie vaci cu monte repetate la prima, a doua, a treia însămânţare

Specificare			E_1		E_2		M		E_1-M %	E_2-M %	E_1-E_2 %
			n	%	n	%	n	%			
Total gestante	Total		18	94,74	6	54,54	10	50	44,73***	4,54	40,19***
	din care	G1	16	84,21	4	36,36	-	-	-	-	47,85***
		G2	-	-	2	18,18	-	-	-	-	-18,18*
		G3 şi peste	2	10,53	-	-	-	-	-	-	10,53*

* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

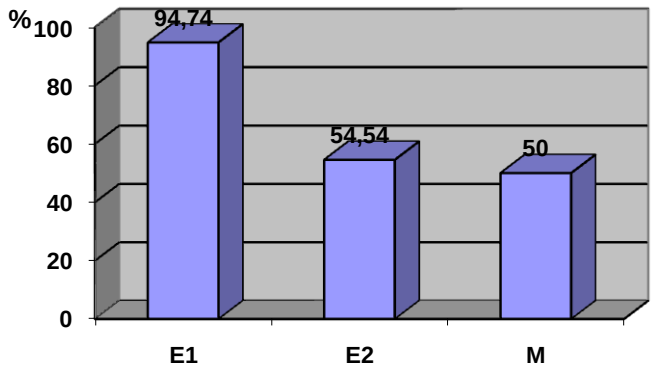


Fig. 2 Procentele de gestaţie după tratamente la vaci cu monte repetate

Rezultatele semnificative obţinute la tratamentele cu Gn-RH (Receptal), administrat cu 4-6 ore înainte de IA relevă faptul că tulburările de ovulaţie sunt factori etiologici importanţi ai repetării montelor la vaci, iar rezultatele înregistrate la tratamentele cu progesteron după însămânţare indică o implicare mai redusă a tulburărilor hormonale determinate de o insuficienţă secretorie a progesteronului şi mai mult a factorilor de natură inflamatorie care determină mortalitate embrionară timpurie.

În condiţiile existenţei unor cauze de natură infecţioasă, oculte, dificil de diagnosticat, tratamentele hormonale sunt ineficiente, astfel că terapia trebuie reorientată pentru remedierea acestora.

CONCLUZII

1. La vacile din loturile experimentale intervalul tratament-IA fecundă a înregistrat o valoare medie de 8,61 zile la lotul E_1, cu limite de variaţie între 0-86 zile şi de 6,85 zile la lotul E_2 cu variaţii între 0-37 zile;
2. Procentele de gestaţie realizate de vaci în intervalul de până la 30 de zile de la tratament au fost de 84,21% în lotul E_1 şi de 54,54% la lotul E_2, diferenţa fiind distinct semnificativă ($P<0,01$);
3. Fecunditatea la prima însămânţare după tratament a înregistrat o valoare medie de 84,21% la lotul E_1, care a fost cu 47,85% mai mare faţă de lotul E_2 (36,36%) ;
4. Procentele de gestaţie pe total însămânţări au fost de 94,74% la E_1, 54,54% la E_2 şi 50 % la lotul martor, constatându-se diferenţe foarte semnificative ($P<0,001$) între loturile experimentale E_1-E_2 şi între E_1 şi M;
5. Service period-ul a înregistrat valori medii de 263,55 zile la E_1 şi de 274,14 zile la lotul E_2 care au fost mai mici faţă de lotul martor cu 48,76 zile (E2) şi respectiv 59,35 zile (E1), diferenţele între loturi fiind semnificative.

BIBLIOGRAFIE

1. Boitor I.,1975 – Profilaxia tulburărilor de reproducţie la animalele de fermă, Edit.Ceres,Bucureşti
2. Boitor I. 1979 – Terapia endocrină în tratamentul unor tulburări de reproducţie. Rev. Creşterea animalelor, nr.1, Bucureşti
3. Bruyas Z.F., Fieni F., Tainturier D.,1993 – Le syndrome „ Repeated-breeding": analyse bibliographique, Revue de Medecine Vétérinaire
4. Mateş N şi col., 1974 – Implicaţiile β-estradiolului în sterilitatea la vaci, manifestată prin repetarea căldurilor. Lucrări Ştiinţifice, Institutul Agronomic Cluj-Napoca
5. Ruginosu Elena şi col., 2003 – Rezultate privind eficacitatea unor scheme terapeutice utilizate în combaterea montelor repetate la vaci, Cercet. agron. în Moldova, vol.1-2, Iaşi
6. Tefera M. şi col., 1991- Epidemiologie et therapeutique de l'infecundite fonctionelle de la vache laitiere, Rec. Med.Vet, mars-avril

INFLUENŢA ADMINISTRĂRII UNOR HORMONI STEROIDIENI NATURALI ŞI SINTETICI ASUPRA FUNCŢIEI GAMETOGENE LA IEPUROI

INFLUENCE OF SOME NATURAL AND SYNTHEETIC HORMONES ON GAMETOGENESIS IN MALE RABBITS

POP AL. R., I. GROZA, V. MICLĂUŞ, I. MORAR, SIMONA CIUPE, V. RUS, DARIA GROZA, M. BORZAN, I.N. GHEGHEŞ

University of Agricultural Scieces and Veterinary Medicine Cluj Napoca, Faculty of Veterinary Medicine Manastur street, 3-5 Cluj Napoca, raulalexandrupop@yahoo.com

The research was performed on 24 male sexually mature domestic rabbits. The rabbits used for this experiment were divided into three batches, eight individuals each. The rabbits from the first batch were administered 0.5 mg/kg hexestrol diacetate intramuscularly twice a week for four consecutive weeks, while the rabbits from the second batch were administered 20 mg/kg nortestosterone decanoate, twice a week for four weeks. Batch three was used for control. The testicular tissue samples obtained after orchidectomy were processed in order to obtain histological samples, colored using the Godner's Trichrome method. The examination of histological samples from batch I revealed various modifications in all seminal cell types, but the severity of lesions varies significantly, the "adluminal compartment" cells of the seminal tubes being mostly affected. In batch II the histological samples reveal a severe affectation of the "adluminal compartment" cells (spermatides and spermatozoa) while the "basal compartment" cells (A1 and B type spermatogonias) were resistant. The modifications encountered in both batches were generally the same, consisting of apoptotic cells and bodies, spermatide sincitium, cell edema and vacuolar degeneration of cells, but more frequent and severe in the batch submitted to hexestrol diacetate compared to the batch submitted to nortestosterone.

Key words: gametogenesis, apoptosis, hexestrol diacetate, nortestosterone, rabitt

La masculi semnalele hormonale şi neuro-chimice transmit informaţia la nivel hipotalamic, ante-hipofizar, celulelor interstiţiale Leydig, celulelor Sertoli şi epiteliul germinativ seminal. Teoretic, fertilitatea şi fecunditatea pot fi inhibate de către alterarea funcţiei la orice nivel al aparatului genital mascul.

Acest studiu îşi propune să evalueze în mod obiectiv efectele acţiunii unui compus sintetic denumit generic „estrogen-like" şi care din punct de vedere biochimic este un derivat al hexestrolului (diacetatul de hexestrol) comparativ cu acţiunea unui ester al hormonului steroidian androgen natural (nor-testosteron) asupra cito-arhitectonicii şi dinamicii funcţiei gametogene la iepuroi, ca specie aparţinând grupei animalelor de experienţă agreate din punct de vedere legislativ şi ştiinţific de către normativele în vigoare ale Comunităţii Europene

.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe un număr de 24 de iepuri domestici, de sex mascul, maturi din punct de vedere sexual cu vârsta cuprinsă între 10 şi 12 luni, cu masa corporală cuprinsă între 2500 şi 3000 g, de rasă comună. Iepurii utilizaţi în cadrul acestui experiment au fost împărţiţi în trei loturi a câte opt subiecţi fiecare. Iepurilor din primul lot experimental li s-a administrat pe cale intramusculară diacetat de hexestrol în doză de 0,5 mg/kgc, de 2ori pe săptămână, timp de patru săptămâni consecutive, în timp ce iepurii din lotul II au fost supuşi acţiunii nortestosteronului decanoat în doză de 20 mg/kgc, administrat bi-săptămânal, timp de patru săptămâni, iar lotul trei a fost considerat lot martor.

La finalul celor patru săptămâni, iepurii aparţinând celor trei loturi au fost supuşi operaţiei de orhidectomie bilaterală în scopul prelevării probelor de ţesut testicular în vederea efectuării de

preparate histologice, necesare investigaţiei morfologice destinate evaluării efectelor celor două produse testate în cadrul acestui studiu.

Probele astfel recoltate au fost secţionate transversal cu ajutorul microtomului, am obţinut felii cu grosimea de aproximativ 5 mm, care au fost introduse pentru fixare în soluţie Stieve timp de 24 de ore. În continuare piesele au fost spălate şi deshidratate cu alcool etilic în concentraţie crescândă (70^o, 95^o, absolut), clarificate cu alcool butilic (n-Butanol) şi incluse în parafină. Au fost practicate secţiuni cu grosimea de 5 µ, iar pentru contrastarea secţiunilor s-a folosit colorația tricrom Goldner modificată, astfel trioxihemateina Hansen este înlocuită cu un alt lac feric de hematoxilină şi anume hematoxilină Groat.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Lotul I (diacetat de hexestrol)

Modificări se întâlnesc la marea majoritate a tubilor, dar intensitatea proceselor şi tipurile celulare afectate sunt diferite de la un tub la altul. În cazul unor tubi seminiferi, modificările sunt ceva mai discrete, materializate prin degenerescenţă balonizantă a unui număr moderat de celule (spermatogonii şi spermatocite), edem intercelular mai intens pe anumite zone (fig 1), câteva celule apoptotice şi corpi apoptotici prezenţi în special în „compartimentul adluminal" al tubului seminifer(fig 2).

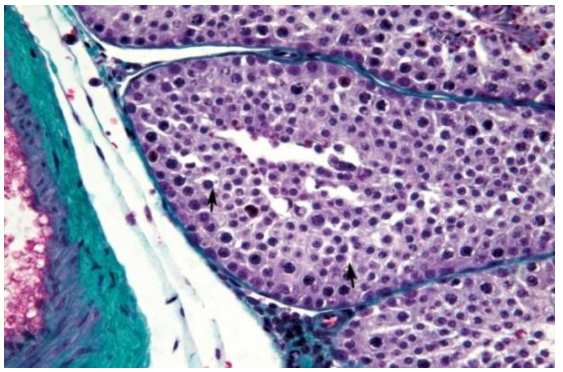


Fig.1 Edem intercelular şi degenerescenţă balonizantă a spermatogoniilor şi spermatocitelor

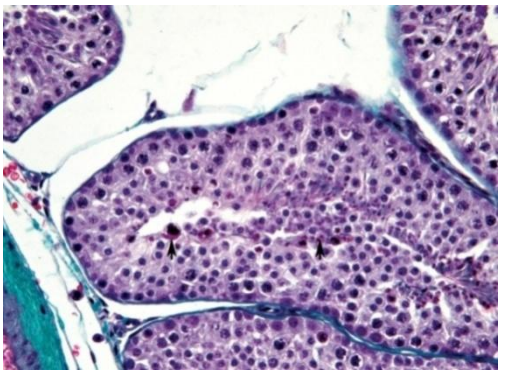


Fig.2 Celule şi corpi apoptotici în „compartimentul adluminal" al tubilor seminiferi

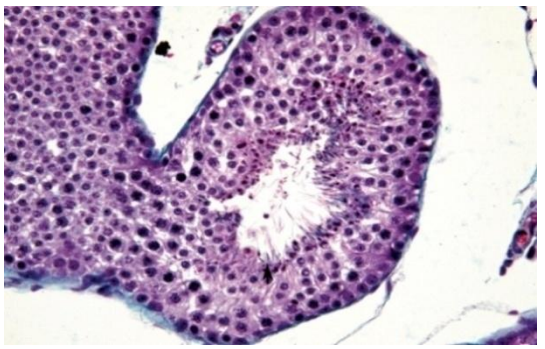


Fig.3 Edem şi degenerescenţă balonizantă a spermatozoizilor

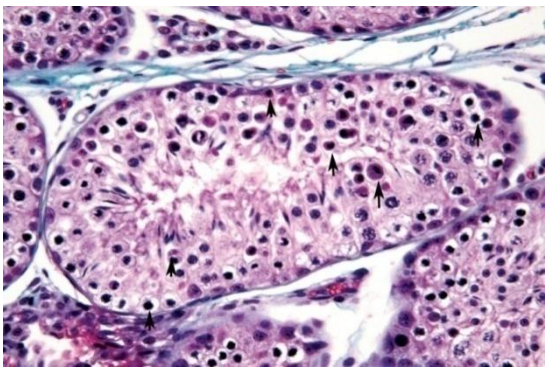


Fig.4 Fenomene de apoptoză şi degenerescenţă vacuolară, interesând toate stadiile liniei seminale

Există segmente de tubi seminiferi în care, deşi degenerescenţa balonizantă a celulelor este relativ pronunţată şi numărul corpilor apoptotici relativ mare, există încă numeroşi spermatozoizi

ataşaţi la epiteliul seminifer, dar marea majoritate a acestora prezintă capetele tumefiate precum şi afinitate tinctorială scăzută, comparativ cu spermatozoizi normali, aspect ce sugerează faptul că şi aceştia sunt cuprinşi de procese de degenerescenţă balonizantă celulară(fig. 3).

În cazul unor tubi seminiferi procesele se derulează cu o brutalitate deosebită cuprinzând marea majoritate a celulelor din toate stadiile, într-o măsură mai mică spermatogoniile, unde gradul de afectare nu depăşeste 40%(fig 4).

Un aspect particular îl reprezintă apariţia de sinciţii formate pe seama spermatidelor care, în unele cazuri păstrează într-o oarecare măsură legătura cu epiteliul seminifer care apare puternic edemaţiat în imediata lor vecinătate(fig 5), iar acolo unde leziunile sunt mai pronunţate există sinciţii de spermatide aflate în apoptoză cuprinse în masa de detritusuri celulare existentă în lumenul tubilor(Fig.6).

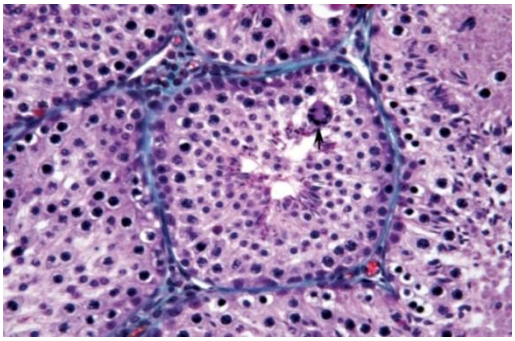


Fig. 5 Sinciţializarea spermatidelor

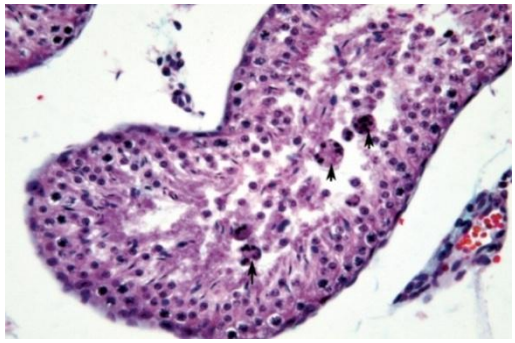


Fig. 6 Celule sinciţiale în apoptoză

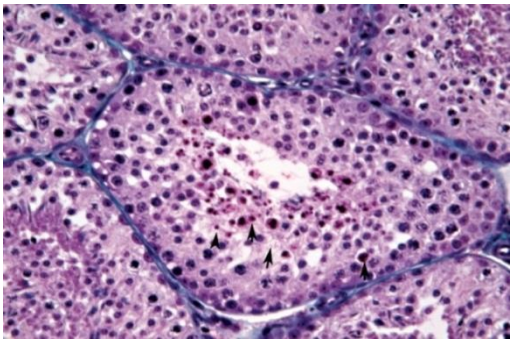


Fig.7 Spermatocite şi spermatide apoptotice, corpi apoptotici şi fenomene de degenerescenţă balonizantă

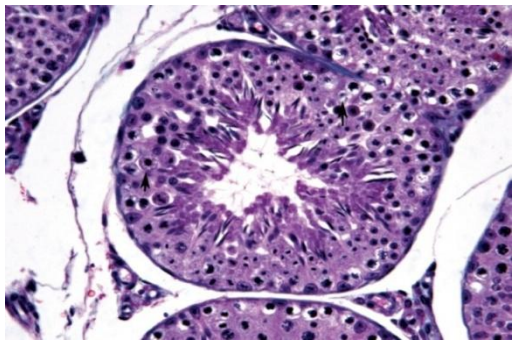


Fig.8 Degenerescenţă vacuolară de intensitate moderată,celule şi corpi apoptotici

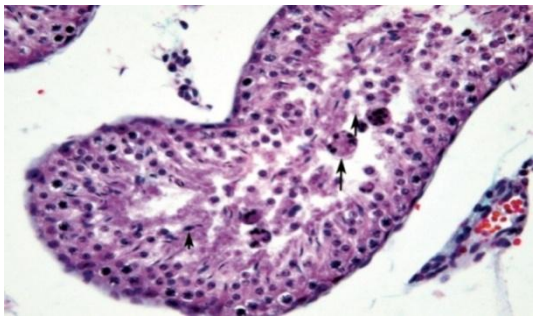


Fig.9 Edem al spermatozoizilor, detritus celular şi sinciţializarea spermatidelor

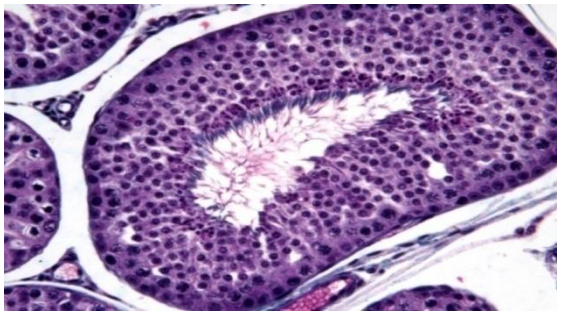


Fig.10 Aspecte fiziologice ale procesului de gametogeneză

Lotul II (expus acţiunii nortestosteronului decanoat)

Leziunile descrise în cazul lotului anterior (expus acţiunii diacetatului de hexestrol), sunt prezente în linii mari şi la lotul expus acţiunii nortestosteronului decanoat, dar nu se derulează cu aceeaşi brutalitate, nu cuprind chiar toţi tubii şi nu se ajunge la denudări complete ale epiteliului seminifer.

Degenerescenţa vacuolară este prezentă, de intensităţi variabile, de la discretă la moderată şi doar în foarte puţini tubi este masivă şi însoţită de distrucţii brutale ce cuprind toate liniile celulare cu excepţia spermatogoniilor, procese atât de avansate încât să apară zone denudate nu au fost evidenţiate la acest lot. Procese de tumefiere ale capetelor spermatozoizilor au fost evidenţiate şi aici în unii tubi.

Sunt prezente şi în acest caz sinciţii de spermatide dar în număr mai mic comparativ cu lotul anterior, ele pot păstra încă aspecte morfologice ce denotă faptul că nu sunt pentru moment, semnificativ afectate sau se găsesc în apoptoză în tubii cu leziunile cele mai avansate(fig. 9).

Lotul III (lot martor)

Prin comparaţie, în majoritatea secţiunilor examinate din preparatele histologice provenite de la subiecţii aparţinând lotului martor, epiteliul tubilor seminiferi apare cu aspect normal, fiind format din celule spermatogene în număr mare (epiteliul apare relativ îngroşat) şi acolo unde sunt surprinşi spermatozoizi în anumite secţiuni, ei se găsesc în număr mare ceea ce sugerează faptul că procesul de spermatogeneză este complet şi funcţional şi se derulează la un nivel ridicat.

În cazul lotului I, expus acţiunii diacetatului de hexestrol sunt afectate toate categoriile de celule ale liniei seminale, inclusiv spermatogoniile de tip A_1 şi spermatogoniile de tip B(denumite „spermatogonii de rezervă" sau „spermatogonii rezistente"), situate în „compartimentul bazal" al tubilor seminiferi. Gradul de afectare este diferit în „compartimentul adluminal" comparativ cu cele întâlnite în „compartimentul bazal" , astfel, în „compartimentul adluminal" afecţiunile sunt pronunţate, cu perturbarea gravă sau anularea pe anumite porţiuni a proceselor de spermato- şi spermiogeneză.Acest aspect confirmă gradul înalt de toxicitate al diacetatului de hexestrol asupra celulelor liniei seminale, precum şi capacitatea acestuia de a depăşii atât bariera hematologică testiculară(afectând celule din „compartimentul bazal"), cât şi bariera constituită din celulele Sertoli(afectând celule din „compartimentul adluminal").

În cazul lotului II, expus acţiunii nortestosteronului decanoat, preparatele histologice efectuate relevă afectarea preponderentă a celulelor din „compartimentul adluminal"(spermatide şi spermatozoizi), în schimb celulele liniei seminale din „compartimentul bazal"(spermatogoniile de tip A_1 şi B), sunt rezistente în condiţiile unei expuneri pentru o perioadă de 30 de zile, la doza de 20 mg/kgc.

Apoptoza, ca fenomen fiziologic, este considerată drept un proces necesar în vederea menţinerii homeostaziei testiculare. Ca şi în cazul celulelor diploide, celulele liniei seminale(haploide) răspund la acţiunea stimulilor externi şi interni prin activarea unor mecanisme, care în ultimă instanţă determină moartea celulară programată, pentru a prevenii transmiterea în descendenţă a informaţiei genetice alterate de acţiunea diferitelor substanţe cu efect toxic asupra celulelor liniei seminale.

CONCLUZII

1. Administrarea bi-săptămânală, pe parcursul a 30 de zile, a 0,5 mg/kgc diacetat de hexestrol determină afectarea tuturor tipurilor de celule aparţinând liniei seminale cu apariţia masivă a fenomenului apoptozei, în special la nivelul spermatocitelor pachitene şi al spermatidelor, sinciţializarea spermatidelor, fenomene de edem celular şi degenerescenţă vacuolară însoţite de depleţia masivă a celulelor din „compartimentul adluminal" al tubilor seminiferi.

2. Afectarea celulelor din „compartimentul bazal" şi din „compartimentul adluminal" al tubilor seminiferi la iepurii expuşi acţiunii diacetatului de hexestrol confirmă capacitatea acestei substanţe de a depăşii atât bariera hematologică testiculară cât şi cea alcătuită din celulele Sertoli, în aceste condiţii prelungirea expunerii subiecţilor la acţiunea acestui compus steroidian sintetic va determina depopularea completă a liniei seminale din tubii seminiferi ceea ce va conduce la instalarea sterilităţii la aceşti masculi. .
3. Creşterea concentraşiei plasmatice şi implicit a celei testiculare de testosteron reduce frecvenţa apariţiei apoptozei la nivelul celulelor liniei seminale prin blocarea modificării sistemului Fas-Fasl, responsabil de iniţierea fenomenelor apoptotice.
4. Afectarea celulelor din „compartimentul adluminal" al tubilor seminiferi la iepurii expuşi acţiunii nortestosteronului decanoat confirmă capacitatea acestei substanţe de a depăşii atât bariera hematologică testiculară cât şi cea alcătuită din celulele Sertoli.
5. Toxicitatea nortestoseronului asupra celulelor din „compartimentul bazal" al tubilor seminiferi este neglijabilă în condiţiile propuse de acest model experimental, ceea ce confirmă faptul că încetarea expunerii subiecţilor lotului II la acţiunea acestui hormon va determina reluarea funcţiei spermatogenetice.
6. Prin comparaţie toxicitatea diacetatului de hexestrol asupra celulelor liniei seminale este net superioară celei manifestate în cazul expunerii la acţiunea nortestosteronului decanoat, în aceste condiţii se impune acordarea unei atenţii sporite depistării reziduurilor alimentare ale diacetatului de hexestrol în vederea prevenirii expunerii consumatorilor umani(în special a femeilor însărcinate precum şi a băieţilor de vârstă prepuberală) la acţiunea acestui compus.

BIBLIOGRAFIE

1. Akingbemi B.T., Hardy M.P., *Ann. Med.* 33, 391-403., (2001)
2. Alessio D'Alessio, Anna Riccioli, Paola Lauretti, Fabrizio Padula, Barbara Muciaccia, Paola De Cesaris, Antonio Filippini, Shigekazu Nagata, Elio Ziparo, - *Testicular FasL is expressed by sperm cells,*(2001)
3. Amiya P. Sinha Hikim., Ronald S. Swerdloff., - *Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis.*, Reviews of Reproduction c4, 38–47(1999)
4. Burcin. M.. Kohne A.C., Runge D. et al. - *Factors influencing nuclear receptors in transcriptional repression. Semin. Cancer Biol.,* 5, 337-46 (review). (1994)
5. Distelhorst, C.W., -*Cell Death Differ.,*9, 6-19 (2002)
6. Groza, I., Muntean M., Morar R., Papuc I., Bogdan L., Oană L., Morar I., Simona Ciupe, Paşca I., Pop Al. R., Cenariu M., Peştean C. - *Andrologie veterinară,* Ed Gryphon, Braşov(2004)
7. Hartmann S., Lacorn M., Steinhart H., - *Natural occurrence of steroid hormones in food.* Food Chem. 62(1):7–20, (1998)
8. Heitzman R.J., -*The absortion, distribution and excretion of anabolic agents.* J. Anim. Sci., 57(1):223-238(1983)
9. Milgrom, E., - *Steroid hormones*, in Hormones: from molecules to Disease (eds baulieu, E.-E. and Kelly, P.A.) Chapman & Hall, London, pp. 387-442 (review). (1990)
10. Sever L.E., Hessol N.A., -*Toxic effects of occupational and environmental chemicals on the testes. Endocrine and Toxicology* (J.A. Thomas, K. S. Korach, J.A. McLachlan), Raven Press New York., pp 211-248.(1985)

MORFOPATOLOGIA SPERMEI ÎN CONDIŢII DE STRES

MORPHOPATHOLOGY OF SPERM IN STRESS CONDITIONS

N. ROŞCA., GH. BORONCIUC., I. BALAN., P. PAVALIUC., IULIA CAZACOV, ION MEREUŢĂ..

Institutul de Fiziologie şi Sanocreatologie Chişinău, str. Academiei 1,
E-mail:vciochina@asm.md

The electric current (with the tension of only 25V.), penetrates the barrier of testicles of the bulls. This phenomenon proves the necessity of protecting the sperm and the all body from the influence of the electric field.

Key words: stres, sperm, bull

Natura şi particularităţile fiziologice ale animalelor ce s-au format pe parcursul a multor secole nu sunt în stare să se schimbe cu viteza cu care se schimbă condiţiile mediului extern şi tehnologia întreţinerii lor. De aceea apare necorespunderea între statutul biologic al organismului, capacităţile fiziologice ale lor şi mediul extern sau, cum e primit a numi – starea de stres[5]. Totodată, conform acestor date [7].organismul animalelor păstrează independenţa relativă de la valorile schimbătoare ale factorilor extremali ai mediului extern. Aceasta se realizează datorită prezenţei mecanismelor păstrării constanţei relative a mediului intern [homeostazia] prin trecerea de la răspunsul ne specific general [reacţia de stres] la fenomenele din mediul extern, la reacţii adecvate specifice [adaptarea].

Întreţinerea animalelor în condiţii de stresare permanentă duce la aceea, că stresul devine bază patologică a dezvoltării dereglărilor funcţionale. Aşa, a fost stabilită influenţa stării stresorice a animalelor asupra productivităţii cărnii la transportarea şi întreţinerea pentru abataj la combinatele de carne.

Expresivitatea stării stresorice la animale depinde nu numai de specia animalului şi caracterul factorului stresogen, ci şi de natura lor [7]. În cercetarea lor autorii au stabilit, că animalele de rase de o productivitate înaltă, cu energia de creştere mare, sunt mai sensibile către stres. Deosebit de sensibile la stres sunt animalele nou-născute şi tinere.

În legătură cu aceea că stresul extremal provoacă schimbări esenţiale a parametrilor fiziologici ai animalelor şi, mai ales, a celor stresreactive, problema lui a devenit una din cele mai actuale în biologia contemporană.

Reeşind din cele menţionate scopul cercetărilor, rezultatele cărora sunt prezentate în lucrarea dată a fost studierea influenţei stresării nociceptive a factorilor asupra stării morfologice a gameţilor lor.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările experimentale au fost îndeplinite în laboratorul Sanocreatologia Sistemului Reproductiv şi Criobiologie „V. Nauc" şi laboratorul Sanodiagnosticare şi Sanopronosticare, ale Institutului de Fiziologie şi Sanocreatologie al Academiei de Ştiinţe a Moldovei.

Pentru stresarea nociceptvă a taurilor în calitate de excitant stresogen a fost folosit curentul electric alternativ cu o tensiune de 30V, care a fost coordonată cu datele literaturii. Acţiunea factorului stresogen continua până la apariţia agresivităţii la animale. După stresarea animalelor timp de 60 zile sperma se cerceta la microscop cu scopul evidenţierii formelor patologice.

Determinarea concentraţiei dialdehidei malonice a fost determinată după metoda lui Vladimirov şi Arceacov modificată de colaboratorii laboratorului Sanocreatologia Sistemului Reproductiv şi Criobiologie „V. Nauc" [6]. Pentru determinarea hormonilor steroizi a fost folosită metoda contemporană radiologică.

Prelucrarea statistică a materialului cifrologic s-a efectuat cu folosirea criteriilor parametrice după Student.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datorită cercetărilor fundamentale [1,2,3,4,5,7], consacrate studierii legităţilor apariţiei, stabilizării, dezvoltării şi preântâmpinării reacţiilor stresorice e clar că stresarea organismului negativ se reflectă asupra capacităţii de reproducere. Conform celor spuse o importanţă deosebită capătă cercetarea stării morfologice a spermatozoizilor deoarece ea determină păstrarea în celulele sexuale a compuşilor vitali şi activităţii lor funcţionale.

Analiza şi generalizarea rezultatelor fundamentale în general permit, în calitate de ipoteză de lucru de a formula conceptul conform căruia factorii stresogeni pot servi drept cauza apariţiei gametopatiilor.

Despre starea organismului reproducătorilor se poate de judecat după conţinutul cortizolului în plasma sanguină. Cercetările efectuate demonstrează că cantitatea cortizolului în plasma sanguină a taurilor stresaţi era de 3,5 ori mai mare, decât la acei martori.

În afară de aceasta, despre starea organismului animalelor se poate judeca şi după conţinutul a unuia din produsele finale ale peroxidării lipidelor – dialdehida malonică (DAM). Datele obţinute demonstrează că, cantitatea DAM în plasma sanguină după stresarea nociceptivă a animalelor creşte de la 0,35±0,009 până la 0,56± 0,006.

Datele experienţelor realizate mărturisesc despre aceea că animalele într-adevăr erau supuse acţiunii factorilor stresogeni.

În experienţele ulterioare la tauri să colecta sperma cu scopul studierii spermatozoizilor patologici în perioada prestresorică. Rezultatele sunt prezentate în tabelul №1.

Tabel. 1

Cantitatea gameţilor patologici în sperma de taur în perioada de până la stresare (n 1407)

Zilele colectării spermei	Gameţi normali, %	Gameţi anomali, %
Experienţa I		
Prima zi	90,3 ± 1,74	9,7 ± 1,74
A treia zi	83,6 ± 2,58	16,4 ± 2,58
A şaptea zi	88,5 ± 2,21	11,5 ± 2,25
A zecea zi	83,3 ± 2,58	16,8 ± 2,58
Valoarea medie	86,6 ± 1,12	13,4 ± 1,12
Experienţa II		
A treia zi	87,9 ± 1,95	12,1 ± 1,95
A şaptea zi	88,7 ± 2,17	11,3 ± 2,17
Valoarea medie	88,2 ± 1,44	11,8 ± 1,44
Valoarea medie în experienţele I şi II	87,3 ± 0,89	12,7 ± 0,89

Datele tabelului №1 demonstrează că, în sperma nativă a animalelor testate se conţine în mediu 12,7 ±0,89% de spermatozoizi patologici.

Aşadar, spermatogeneza, chear şi în condiţii relativ confortogene de întreţinere a animalelor este însoţită de gametopatologii.

Convigându - ne în aceea, că stresarea nociceptivă dezvoltă la tauri starea de stres, de la ei să prelungea colectarea spermei şi cercetarea conţinutului formelor patologice de spermatozoizi în ea. Rezultatele obţinute sunt prezentate în tabelul №2.

Din datele tabelului reesă că, în perioada poststresorică (a şaptea zi) cantitatea de celule anormale atinge 16,7 ±2,14%. Această majorare a indicelui testat este statistic neveridic, în comparaţie cu perioada prestresorică, însă deja la a zecea zi atingea 30,7±2,75. Cea mai mare

cantitate de spermatozoizi atipici a fost observată la ziua 56, când cantitatea lor era egală cu86,7±2,01%.

Schimbări analogice au fost stabilite şi în experienţa 2.

Tabel 2

Dinamica schimbărilor cantităţii gameţilor patologici din sperma nativă de taur după stresare nociceptivă (n1= 3835; n2=3467).

Zilele colectării spermei	Experienţa I Celule normale %	Celule anormale %	Experienţa II Celule normale %	Celule anormale %
10 - 17	Perioada până la stresare (martor).			
06.97	86,8±1,12	13,2±1,12	88,2±1,44	11,8±1,44
	Perioada după stresare			
A şaptea zi	83,3±2,14	16,7±2,14	79,6±3,07	20,4±3,07*
A zecea zi	69,3±2,79*	30,7±2,79*	66,8±3,32*	33,2±3,32*
Ziua 14	52,1±2,80*	47,9±2,80*	55,2±2,85*	44,8±2,85*
Ziua 21	46,9±2,97*	53,1±2,97*	57,7±3,41*	42,3±3,41*
Ziua 28	45,7±3,34*	54,3±3,34*	62,8±3,30*	37,2±3,30*
Ziua 31	44,1±3,73*	55,9±3,73*	36,4±3,29 *	63,6±3,29*
Ziua 35	55,6±2,80*	44,4±2,80*	55,5±3,24*	44,5±3,24*
Ziua 42	48,9±3,28*	51,1±3,28*	36,3±3,01*	63,7±3,01*
Ziua 49	31,1±3,05*	68,5±3,05*	32,6±2,78*	67,4±2,78*
Ziua 56	13,3±2,01*	86,7±2,01*	55,6±2,95*	44,4±2,95*
Ziua 70	62,2±3,01*	37,8±3,01*	55,3±3,39*	44,7±3,39*
Ziua 84	48,7±3,62*	51,3±3,62*	57,5±3,40*	42,5±3,40*
Ziua 98	22,1±2,42*	77,9±2,42*	59,9±3,49*	40,1±3,49*
Ziua 140	16,4±2,46	83,6±2,46*	64,5±3,41*	35,5±3,41*
Ziua 151	47,5±3,25*	52,5±3,25*	0,5±2,90*	29,5±2,90*

*Diferenţa statistic semnificativă

Aceste modificări morfologice mărturisesc despre diminuarea activităţii funcţionale a spermei de taur ce se concordează cu rezultatele cercetărilor precedent efectuate în laborator [Nauc 1991].

CONCLUZII

1. În condiţiile relativ confortogene de întreţinere a animalelor, cantitatea de spermatozoizi anomali la tauri constituie 12,7±0,89.

2. La taurii supuşi stresării nociceptive sporirea maximală a numărului formelor patologice de spermatozoizi se evidenţiază la a 56 zi de la stoparea stresării.

3. Curentul electric (cu tensiunea de doar 25v.), pătrunde bariera testiculară la tauri. Acest fenomen demonstrează necesitatea protejării spermei şi organismului integru de influenţa câmpului electric.

BIBLIOGRAFIA

1. Aitken R. J., Baker M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and Development,** 2003, 16(5), P. 581–588.
2. Maiorino M., Ursini F. Oxidative Stress, Spermatogenesis and Fertility.// Biol. Chem., 2002, Vol. 383, P. 591 – 597.
3. Pasqualotto, F.F., Sharma, R.K,, Potts, J.M., Nelson, D.R., Thomas, A.J., Agarwal, A. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. Urology, 2000, 55, P.881 – 885.
4. Pasqualotto, F.F., Sharma, R.K., Kobayashi, H., Nelson, D.R., Thomas Jr, A.J., Agarwal, A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. J. Androl., 2001. 22, P. 316 – 322.
5. Коган Б. М. Стресс и адаптация. М. : Знание. , 1980, 61 с.
6. Наук В. А. Структурно-биохимические и функциональные особенности гамет с - х животных при криоконсервации. Известия АН МССР. Сер. Биол. и хим. наук.1987. №5. с. – 49-54.
7. Фурдуй Ф.И. Проблемы стресса и преждевременной биологической деградации человека. Санокреатология. Их настоящее и будущее.//Современные проблемы физиологии и санокреатологии. Кишинев, 2005, С. 16-36.

FRECVENTA SI SISTEMATICA AFECTIUNILOR CRISTALINULUI LA CARNIVORE

THE FREQUENCY AND SYSTEMATICS OF THE CRYSTALLINE LENS AFFECTIONS AT CARNIVORES

B. ST. RUGINA [1], L. C. BURTAN [2], DIANA IAMANDI [1]
[1]Centrovet Bucuresti
[2]Facultatea de Medicina Veterinara Iasi

This paper presents the results of the researches that have been made for 10 years and they regard the prevalence of the crystalline lens affections and their systematics at carnivores.

The affections of the crystalline lens stand for 10□13% of the total ophthalmologic diseases and they were represented by the crystalline lens dislocation (22□94%) and cataract (77□ 06%). There are several types of cataract that have been systematized depending on age, as follows: juvenile (9,52%), the adult's (41,67%) and senile (48□81%). We also have another type of classification depending on the way of production: hereditary, senile, traumatic, toxic and diabetic.

Key words: crystalline lens, dislocation, cataract, visual acuity.

Cristalinul este o lentila avasculara, structurata, transparenta si refractiva (2,4,5,7,14,16). Localizat inapoia pupilei, desparte camera posterioara a ochiului de camera interioara a acestuia, unde se afla corpul vitros, actionand ca o lentila biologica cu rol in formarea unei bune imagini pe retina (1,3,6,8,10,13,15).

Pentru indeplinirea acestui rol, cristalinul trebuie sa-si mentina transparenta, sa-si pastreze pozitia si sa ramana plastic pentru a se putea acomoda (3,7,9). In viata unui animal apar tulburari de origini diferite care duc la pierderea transparentei (cataracta) sau pozitiei (dislocare) acestei lentile, influentand acuitatea vizuala.

In lucrare sunt prezentate rezultatele cercetarilor efectuate privind tulburarea pozitiei si transparentei cristalinului la carnivore domestice.

MATERIAL SI METODE

Cercetarile au fost efectuate pe cazuistica oferita de Clinica veterinara Centrovet Bucuresti in perioada 1998-2008. Studiul statistic s-a bazat pe analiza Fiselor de inregistrare, care a permis raportarea frecventei afectiunilor cristalinului la cazuistica oftalmologica si stabilirea structurii acesteia. Pentru stabilirea entitatilor oftalmologice localizate la cristalin, s-au folosit metodele generale si speciale de semiologie oculara, completate de investigatiile biochimice sanguine. Mentionam faptul ca discutia cu proprietarul privind aparitia si evolutia in timp a afectiunilor cristalinului a oferit date utile diagnosticului si aprecierii evolutiei ulterioare.

REZULTATE SI DISCUTII

Prin rolul sau de focalizare a imaginii pe retina, cristalinul are importanta deosebita in acuitatea vizuala. Topografia sa il protejeaza partial de injuriile externe, incat prezenta afectiunilor localizate la acest nivel nu este alarmanta, dar efectele compromit viitorul comportamental.

Tabel nr. 1- Structura afectiunilor oftalmologice la carnivore in Clinica veterinara Centrovet Bucuresti

Afectiuni ale:	Nr.	%
Pleoapelor	143	13,29%
Conjunctivei	469	43,59%
Corneei	175	16,26%
Cristalinului	109	10,13%
Tractusului uveal	37	3,44%
Topografiei globului ocular	90	8,37%
Tensiunii oculare	39	3,62%
Cailor lacrimale	14	1,30%
Total	1076	100

Analiza datelor prezentate in tabelul nr. 1 evidentiaza aceasta afirmatie privind ponderea afectiunilor cristalinului in cadrul afectiunilor oftalmologice. Astfel, din cele 1076 carnivore cu afectiuni oftalmologice, 109 cazuri au prezentat afectarea cristalinului, respectiv 10,13%, care s-a soldat cu influentarea acuitatii vizuale in diferite grade. Desi procentul de 10,13 pare mic, in comparatie cu afectarea altor structuri (conjunctiva, cornee, pleoape,) dar, avand in vedere rolul cristalinului si posibilitatile terapeutice, putem considera afectiunea de o gravitate deosebita. De asemenea, sub aspect evolutiv, afectiunile cristalinului se dezvolta in timp, insidios, incat nefiind o urgenta vizibila, proprietarul nu prezinta animalul la consult de specialitate, atitudine care ne indreptateste sa consideram prevalenta ca o frecventa relativa.

Desi literatura de specialitate (2,4,5,11,12) semnaleaza prezenta la nivelul cristalinului a o serie de afectiuni (afachia, lenticonus, coloboma, luxatie, cataracta), cazuistica oftalmologica prezentata la clinica a permis diagnosticarea a doua entitati oftalmologice: dislocatia cristalinului si opacifierea lui, asa cum rezulta din tabelul nr. 2.

Tabel nr. 2 - Structura afectiunilor cristalinului in Clinica veterinara Centrovet Bucuresti

Afectiunea	Total		Din care			
			Unilateral		Bilateral	
	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Dislocatia cristalinului	25	22,94	19	76	6	24
Cataracta	84	77,06	74	88,10	10	11,90
Total	109	100				

Datele inscrise in tabel evidentiaza ca 22,94% din cele 109 cazuri au prezentat dislocatie (subluxatie sau luxatie) de cristalin consecutiv afectarii zonulei ciliare. In luxatie cristalinul a fost evidentiat in camera anterioara, traversand pupila, sau cazut spre corpul vitros, in cele mai frecvente cazuri, asa cum prezinta si Gelatt in 2007.

Din cele 25 de cazuri de dislocatie de cristalin, 24% au prezentat afectiunea bilateral, demonstrand existenta unui proces litic la nivelul zonulei ciliare. La aceste cazuri dislocatia a evoluat paralel cu uveita, glaucomul sau cataracta, asa cum a evidentiat si Barnett si col. in 2002.

Dislocatia unilaterala de cristalin la 76% din cazuri poate fi considerata de natura traumatica datorita modificarilor structurale la nivel bulbar si conjunctival. Indiferent de localizare, cristalinul luxat determina afectarea acuitatii vizuale, tulburari care il obliga pe proprietar sa prezinte animalul la consult de specialitate.

Opacifierea cristalinului (cataracta) a fost diagnosticata la 77,06% din cazurile cu afectiuni ale cristalinului. Din acestea 88,10% au evoluat unilateral si 11,90% au fost diagnosticate bilateral.

Coreland modul de aparitie cu varsta, conditiile de intretinere, prezenta unor tulburari metabolice, tratamentele efectuate, datele oferite de proprietar si Fisele de evidenta am efectuat structura cataractelor, datele fiind centralizate in tabelul 3.

Tabel nr. 3 - Structura cataractelor la carnivore

Forma de cataracta	Cazuri	
	Nr.	%
Ereditara	8	9,52
Senila	41	48,81
Traumatica	12	14,29
Toxica	9	10,71
Diabetica	14	16,67
Total	84	100

Analiza datelor inscrise in tabelul nr. 3 confirma existenta mai multor tipuri de cataracta, asa cum au mentionat si alti autori (1,5,6,8,11,13,15). Procentul cel mai mare (48,81%) il detine cataracta senila ca o tulburare a procesului de imbatranire. La caini a fost diagnosticata in jurul varstei de 7 ani la rasele de talie mare si peste 10 ani la cele apartinand raselor mici. La pisica opacifierea cristalinului s-a exprimat clinic mult mai tarziu, in general dupa varsta de 11 ani.

Cataracta diabetica, ocupand locul doi ca prevalenta (16,67%) a fost diagnosticata in corelare cu nivelul crescut al glicemiei, afectand in special caninele intretinute in apartament si care beneficiau de o alimentatie excesiv glucidica.

Apropiata ca procent (14,29) se situeaza cataracta traumatica consecutiv traumelor de la nivelul globului ocular sau cavitatii orbitare. Observatiile noastre confirma datele prezentate de Gelatt in 2007 in sensul ca traumele penetrante sau nepenetrante ale globului ocular pot genera, in timp, opacifierea cristalinului. De altfel, aceasta forma de cataracta a fost diagnosticata mai frecvent la pisica, specie la care traumatizarea globului ocular cu ghearele este mai frecventa.

Cataracta congenitala a fost prezenta la 9,52% din cazuri, fiind diagnosticata la cateva luni de la nastere (cataracta juvenila), sau la cativa ani, de obicei la mijlocul duratei medii de viata a cainelui sau pisicii in raport cu rasa.

Tinand cont de varsta la care debuteaza primele semne de opacifiere am stabilit o ierarhizare a cataractelor sub aspectul frecventei, datele fiind prezentate in tabelul nr. 4.

Analiza procentelor din tabel evidentiaza frecventa crescuta a cataractei senile (48,81%), urmata, cu mica diferenta, de cataracta adultului determinata de diferiti factori cataractogeni, procente ce demonstreaza ca opacifierea cristalinului este apanajul varstei inaintate. Cataracta juvenila (9,52%), care apare la varsta tanara este de natura ereditara, pe care literatura de specialitate o coreleaza cu anumite rase (Gelatt, 2007).

Tabel 4

Sistematica opacifierii cristalinului in raport cu varsta la carnivore

Cataracta	Cazuri	
	Nr.	%
Juvenila	8	9,52
Adultului	35	41,67
Senila	41	48,81

CONCLUZII

1. Afectiunile cristalinului reprezinta 10,13% din totalul afectiunilor oftalmologice.

2. Sub aspect structural, afectiunile cristalinului au fost reprezentate de: dislocatia cristalinului (22,94%) si cataracta (77,06%).

3. Luxatia cristalinului apare unilateral (76%) si bilateral (24%), deplasarea lui putand fi anteroirian prin orificiul pupilar, sau cade spre corpul vitros.

4. In raport cu varsta animalului cataracta poate fi: juvenila (9,52%), a adultului (41,67%) si senila (48,81%).

5. Corelata cu factorii cataractogeni, opacifierea cristalinului poate fi: congenitala (9,52%), senila (48,81%), traumatica (14,29%), toxica (10,71%) si diabetica (16,67%).

BIBLIOGRAFIE

1. APPLE, D.J., SOLOMON, K. D., TETZ, M. R., et. al. (1992) – Posterior capsule opacification. Survey Ophthalmology, pp. 73-116
2. BARNETT, K. C., HEINRICH, C., SANSOM, J., (2002) – Canine Ophthalmology, An. Health Trust, pp. 110-120
3. BARNETT, K.C., CRISPIN, S.M., Canine Ophthalmology, Elsevier Limited, 2002, pp. 109-125
4. BARNETT, KEITH, Diagnostic Atlas of Veterinary Ophthalmology, Elsevier Limited, 2007, pp. 97-127
5. BURTAN, I., (2000), - Chirurgie regionala veterinara, Ed. I. I. de la Brad, Iasi
6. CURTIS, R. et. al. (1983) – Clinical and pathological observations concerning the aetiology of primary lens luxation in the dog, Vet. Rec., pp. 238-246
7. GELATT, H. N. (2000) – Cataract formation and surgery in dogs: our progress and future, Anim. Eye Rescue, pp. 11-20
8. GELATT, N., KIRK, GELATT, P., JANICE, Small Animal Ophthalmic Surgery, Elsevier Limited, 2003, pp. 286-334
9. GELATT, N., KIRK, Veterinary Ophthalmology, vol. 1,2, Blackwell Publishing, 2007, pp. 859-1086, 1130-1149
10. IONASCU IULIANA (2004) – Aspectele clinice, modificari morfopatologice si tratamentul in patologia cristalinului la caine si pisica. Teza de doctorat, USAMV Bucuresti
11. MAGGS, J., DAVIS, MILLER, E., PAUL, OFRI, RON, Slatter's Fundamentals of Veterinay Ophthalmology, Elsevier Inc., 2008, pp. 258-276
12. MOLDOVAN M., BOLTE, S. (1984) – Oftalmologie veterinara, Ed. Ceres, Bucuresti.
13. PEIFFER, ROBERT, PETERSEN-JONES, SIMON, Small Animal Ophthalmology, Elsevier Limited, 2009, pp. 116-248
14. SLATTER, DOUGLAS, Textbook of Small Animal Surgery, Elsevier Science, 2003, pp. 1402-1429
15. STADES, C., FRANS, WYMAN, MILTON, BOEVE, H., MICHAEL, NEUMANN, WILLY, SPIESS, BERNHARD, Ophthalmology for the Veterinary Practitioner, Schlutersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, 2007, pp. 189-208
16. TURNER, M., SALLY, Small Animal Ophthalmology, Elsevier Limited, 2008, pp. 241-256

DIRIJAREA PERIOADEI PUERPERALE LA VACILE DE LAPTE PRIN DIFERITE TRATAMENTE IN PERIOADA ANTEPARTUM SI POSTPARTUM [1]

CONTROL OF PUERPERIUM IN DAIRY COWS BY DIFFERENT ANTEPARTUM AND POSTPARTUM TREATMENTS

ELENA RUGINOSU, MARIANA SOFRONIE, ANCA PLĂVĂNESCU, ŞT. CREANGĂ, M. PÎNTEA, L. DASCĂLU, C. POPESCU
S.C.D.C.B. Dancu
Loc. Dancu, jud. Iaşi,
scdbdancu@yahoo.com

The research has been conducted on BNR cows in the dairy farm of the Station of Research and Development in Dairy Breeding Dancu, Iaşi, during 2007-2008.

The effects of the different schemes of treatment to stimulate the reproductive activity of dairy cows have been estimated taking by forming nine experimental groups considering the active substance, the dosis and the administration period of some medication products (E_1- SeleVit, 1 month a.p.+ $PGF2_\alpha$ -1 month p.p; E_2-SeleVit,2 months a.p.;E_3 -SeleVit 2 months a.p.+ SeleVit 1month a.p; E_4- SeleVit 1 month a.p. + $PGF2_\alpha$ 14 -28 days p.p; E_5- Premix , 1 month a.p. şi 1 month p.p. + Polidin 4 ml on the first day, at 24 hours and at 14 days p.p.; E_6- $PGF2_\alpha$, Proliz- on the calving day; E_7- $PGF2_\alpha$- Proliz 14 -28 zile p.p.; E_8- Gn-RH, Receptal -30 days p.p.; E_9- Gn-RH, Receptal 10-12 days p.p). The control group (M) was formed with cows that calved in the same period of time and didn't have any medication administered within the analyzed periods.

The effects of the medication schemes applied were the following:

a good postpartum uterus involution for experimental groups : 60% of the cows (E_1,E_2,E_7 and E_9), 70% of the cows (E_5, E_6) and 80% of the cows (E_3 , E_4), values that were with 10%, 20% and 30% respectively, higher than those estimated for the group M (50%);

4 - 8 days shorter average interval for postpartum estrus manifestation for the cows from E_3, E_4, E_5, E_6 and E_7 comparing to group M;

shorter average calving-first artificial insemination intervals for the experimental groups (P≤0,05), situated within 69 days (E_4), 79 days (E_1, E_6), 87 days (E_9) and 89 (E_7), comparing to group M (105 days);

lower average calving-fecund artificial insemination intervals, with significant statistical differences (P≤ 0,05) between experimental groups E_9 (116 days), E_3 (127 days) and significantly distinct (P≤ 0 ,01) between E_4 (104 days), E_6, E_8 (107 days) and control group M (142 days);

average values higher for the fecundity at the first two artificial inseminations, with significant statistical differences between experimental groups E_6, with 30,8 % (70 %, P≤ 0,001), E_1, E_4, E_3, E_7, with 16,3 -18,0 % (55,5 %, 57,2 %, P≤ 0,01) and E5, with 8,5 % (47,7 %, P≤ 0,05) and check-group M (39,2 %).

Key words: puerperium, dairy cow, treatment, uterus involution, fecundity

Este recunoscut de majoritatea specialiştilor că, perioada puerperală este o etapă critică a ciclogramei reproductive a vacilor de lapte, deoarece în acest interval îşi au originea marea majoritate a tulburărilor de reproducţie, care ulterior determină infertilitate temporară sau definitivă.

1 Cercetări finanţate din grant PN II 51-004.

Luând în considerare relaţia directă între unitatea utero-ovariană, utilizarea terapiei de stimulare hormonală a activităţii ovariene şi involuţiei uterine postpartum a deschis noi perspective de control şi dirijare a proceselor caracteristice perioadei puerperale, cu implicaţii importante asupra fecundităţii ulterioare a vacilor de lapte.

Literatura de specialitate prezintă numeroase studii privind terapia hormonală ca metodă de optimizare a perioadei puerperale, dar rezultatele sunt variabile în funcţie de diverşi factori, cum ar fi : tipul produselor utilizate, intervalul de administrare postpartum a tratamentelor, nivelul de furajare şi întreţinere a femelelor de reproducţie (1,2,3,4,5,6).

Scopul lucrării de faţă a fost de testare a mai multor metode de control şi dirijare a proceselor fiziologice din perioada puerperală, cu efecte stimulatoare asupra involuţiei uterine şi activităţii ovariene în vederea reducerii incidenţei afecţiunilor puerperale şi creşterii fecundităţii la vacile de lapte în special a celor înalt productive.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate în perioada 2007-2008 în ferma de creştere şi exploatare a vacilor de lapte, rasa Bălţată cu Negru Românească din S.C.D.C.B Dancu, Iasi.

Sistemul de întreţinere a animalelor a fost de stabulaţie permanentă, legat în adăposturi, cu excepţia sezonului cald, când s-a practicat un sistem liber în tabăra de vară.

Investigaţiile au fost efectuate comparativ pe nouă loturi experimentale, vaci care au beneficiat de diferite tratamente în perioada antepartum şi postpartum şi un lot martor, alcătuit din vaci care au fătat în aceeaşi perioadă, dar care nu au beneficiat de tratamente hormonale de stimulare a funcţiei de reproducţie.

Efectele tratamentelor aplicate au vizat următoarele aspecte: involuţia uterină, manifestarea estrului postpartum, incidenţa afecţiunilor genitale inflamatorii puerperale, precum şi indicii de fecunditate ulteriori.

S-au analizat valorile medii ale intervalelor fătare - prima IA, fătare–IA fecundă, precum şi procentele de gestaţie pe total IA şi după primele IA.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Vacile din loturile experimentale au fost tratate în perioada antepartum şi / sau în perioada postpartum după diferite scheme, în care s-au utilizat produse hormonale ($PGF2_{\alpha}$, şi Gn- RH), imunomodulatori (Polidin) şi complexe vitamino-minerale.

Studiile au fost efectuate pe loturile experimentale organizate după schema prezentată în tabelul 1.

Tratamentele aplicate vacilor din loturile experimentale în perioadele antepartum şi / sau postpartum au evidenţiat reduceri variabile ale incidenţei tulburărilor genitale inflamatorii, comparativ cu lotul martor.

Astfel, vacile care au fost tratate cu SeleVit, două doze la interval de 1 lună în perioada antepartum (lotul E_3) au înregistrat o reducere totală a retenţiei anexelor fetale şi a infecţiilor genitale.

La vacile care au fost tratate cu o singură doză de SeleVit, (E_1, E_2) nu s-au înregistrat retenţii ale anexelor fetale, iar infecţiile genitale s-au redus cu 4,10 % (11,1%), comparativ cu lotul martor (15, 21%). Vacile care au primit suplimente vitamino-minerale în ultima lună de gestaţie şi prima lună de lactaţie, asociate cu tratamente cu Polidin în prima zi, la 24 ore şi 14 zile postpartum (lot E_5) au înregistrat valori medii ale incidenţei retenţiei anexelor fetale şi respectiv infecţii uterine de 6,60 %, care au fost mai mici cu 6,64 % şi respectiv 8,61 %, comparativ cu lotul martor, la care valorile medii au fost de 13,04 % şi respectiv 15,21 %.

Tabelul 1 Organizarea loturilor experimentale

Loturi	Tratamente		Nr. vaci / lot
	Antepartum (a.p.)	Postpartum (p.p.)	
E1	SeleVit – o administrare la 1 lună a.p.	$PGF_{2\alpha}$ - la 30 zile	9
E2	-	$PGF_{2\alpha}$ - ziua fatarii	10
E3	-	$PGF_{2\alpha}$ - 14 -28 zile	14
E4	-	Gn- RH - Receptal 30 zile	10
E5	-	Gn- RH - Receptal 10-12 zile	9
E6	SeleVit - o administrare la 2 luni a.p.	-	9
E7	SeleVit - o administrare la 2 luni a.p.	SeleVit - 1 luna	7
E8	SeleVit - o administrare la 1 lună a.p..	$PGF_{2\alpha}$ - 14 -28 zile	18
E9	Premix PVM timp de 1 lună a.p.	Premix PVC - timp de 1 lună postpartum + Polidin- ziua fătării, la 24 ore şi 14 zile + $PGF_{2\alpha}$ (Proliz,2ml, i.m.) la 14 şi 28 zile postpartum	15
M	-	-	46

Loturile experimentale E_6, E_7, E_8, E_9, alcătuite din vaci care au beneficiat de tratamente numai în perioada postpartum cu $PGF2_{\alpha}$ (Proliz) sau Gn-RH (Receptal) în diferite perioade au înregistrat o incidență a retenției anexelor fetale şi respectiv a infecțiilor genitale cu valori medii situate între 10,00-14,30 % (tab. 2, fig. 1).

Tabelul 2 Incidența retențiilor anexelor fetale şi infecțiilor genitale la vacile din loturile experimentale şi martor

Loturi exp.	Tratamente		Nr. anim. / lot	Vaci cu retenția anexelor fetale		Vaci cu infecții genitale	
	Antepartum a.p.	Postpartum p.p.		n	%	n	%
E1	SeleVit- 1luna a.p.	$PGF_{2\alpha}$-1 luna p.p	9	-	-	1	11,11
E2	SeleVit 2 luni	-	9	-	-	1	11,11
E3	SeleVit 2 luni	SeleVit - 1 luna p.p.	7	-	-	-	-
E4	SeleVit cu 1luna	$PGF_{2\alpha}$- 14 -28 zile p.p	18	1	5,55	1	5,55
E5	PREMIX 1 luna	PREMIX 1luna postpartum + Polidin 4 ml în prima zi, la 24 ore şi 14 zile postpartum	15	1	6,66	1	6,66
E6	-	$PGF_{2\alpha}$ Proliz- ziua fătării	10	1	10,00	1	10,00
E7	-	$PGF_{2\alpha}$ - Proliz 14 -28 zile p.p.	21	3	14,30	3	14,30
E8	-	Gn-RH, Receptal 30 zile p.p.	10	1	10,00	1	10,00
E9	-	Gn-RH, Receptal 10-12 zile p.	9	1	11,11	1	11,11
M	-	-	46	6	13,04	7	15,22

Urmărind desfăşurarea clinică a involuţiei uterine postpartum la vacile cu diferite tratamente antepartum şi postpartum s-a constatat o evoluţie bună a proceselor, evidenţiate în valori procentuale mai mari cu 10 % la vacile din loturile E_1, E_2, E_7 şi E_9 (60 %), cu 20 % la vacile din loturile E_5, E_6 (70 %) şi cu 30 % la vacile din loturile E_3, E_4 (80 %), comparativ cu lotul martor, la care valoarea a fost de 50 % evoluţie normală, restul de 50 % subinvoluţie uterină (tab. 3, fig. 2).

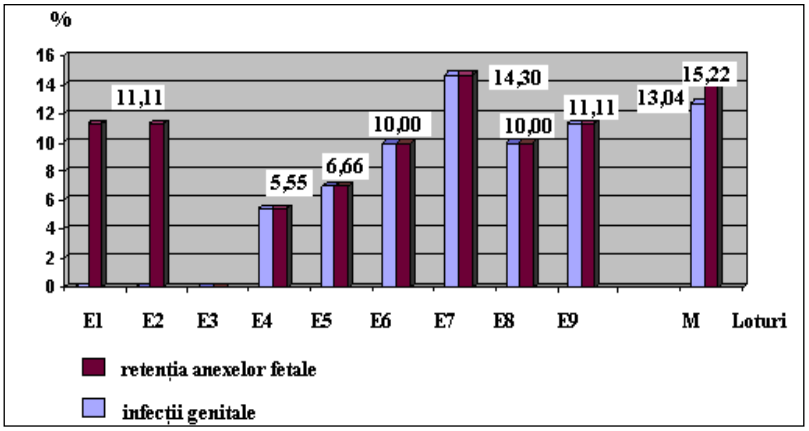


Fig. 1. Dinamica incidenţei retenţiilor anexelor fetale şi infecţiilor genitale la vacile din loturile experimentale şi martor

Tabelul 3 - Dinamica involuţiei uterine postpartum la vacile cu diferite tratamente în perioada antepartum şi postpartum

	Loturi experimentale									Lot
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	M
Involuţie uterină normală	60	60	80	80	70	70	60	50	60	50
Subinvoluţie uterină	40	40	20	20	30	30	40	50	40	50

În ceea ce priveşte manifestarea estrului postpartum s-au constatat intervale de apariţie mai mici cu 4 - 8 zile la vacile din loturile E_3, E_4, E_5, E_6 şi E_7, comparativ cu vacile din lotul martor. La restul loturilor experimentale nu s-au înregistrat diferenţe, intervalele medii de apariţie a estrului postpartum fiind între 39-50 zile, (tab. 4).

Intervalele medii fătare–prima IA postpartum au înregistrat la vacile din loturile experimentale valori medii cuprinse între 69 zile (E_4) şi 107 zile (E_8), care au fost mai mici, comparativ cu vacile din lotul martor (105 zile). În cadrul loturilor experimentale s-au evidenţiat rezultatele înregistrate de E_4 (69 zile), E_1, E_6 (79 zile), E_9 (87 zile) şi E_7 (89 zile), la care s-au constatat diferenţe semnificative statistic, comparativ cu lotul martor ($P \leq 0,05$).

Analiza intervalelor fătare-IA fecundă (SP) a evidenţiat la vacile din loturile experimentale valori medii cuprinse între 104 zile (E_4) şi 196 zile (E_1). Au fost constatate diferenţe distinct semnificative statistic la loturile E_4 (104 zile, $P \leq 0,01$), E_6, E_8 (107 zile, $P \leq 0,01$) şi semnificative la loturile E_9 (116 zile, $P \leq 0,05$), E_3 (127 zile, $P \leq 0,05$), comparativ cu lotul martor, (tab.4, fig. 3).

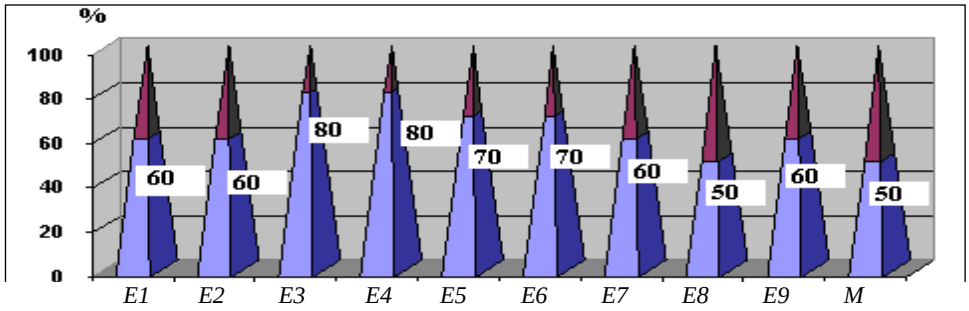


Fig. 2 Dinamica involuţiei uterine postpartum la vacile cu diferite tratamente în perioada antepartum şi postpartum

E_1- SeleVit 1 lună a.p. + PGF $_{2\alpha}$-1 luna p.p
E_2- SeleVit 2 luni a.p.
E_3- SeleVit 2 luni a.p. + SeleVit 1 luna a.p
E_4- SeleVit 1 lună a.p. + PGF $_{2\alpha}$ 14 -28 zile p.p
E5- Premix , 1 lună a.p. şi 1 lună p.p. + Polidin 4 ml în prima zi, la 24 ore şi 14 zile p.p.
E_6- PGF $_{2\alpha,}$ Proliz- ziua fatarii
E_7- PGF $_{2\alpha}$ - Proliz 14 -28 zile p.p.
E_8- Gn-RH, Receptal -30 zile p.p.
E_9- Gn-RH, Receptal 10-12 zile p.
M- lot martor- fără tratamente

Analiza intervalelor fătare-IA fecundă (SP) a evidenţiat la vacile din loturile experimentale valori medii cuprinse între 104 zile (E_4) şi 196 zile (E_1). Au fost constatate diferenţe distinct semnificative statistic la loturile E_4 (104 zile, P≤ 0,01), E_6, E_8 (107 zile, P≤ 0,01) şi semnificative la loturile E_9 (116 zile, P≤ 0,05), E_3 (127 zile, P≤ 0,05), comparativ cu lotul martor, (fig. 3).

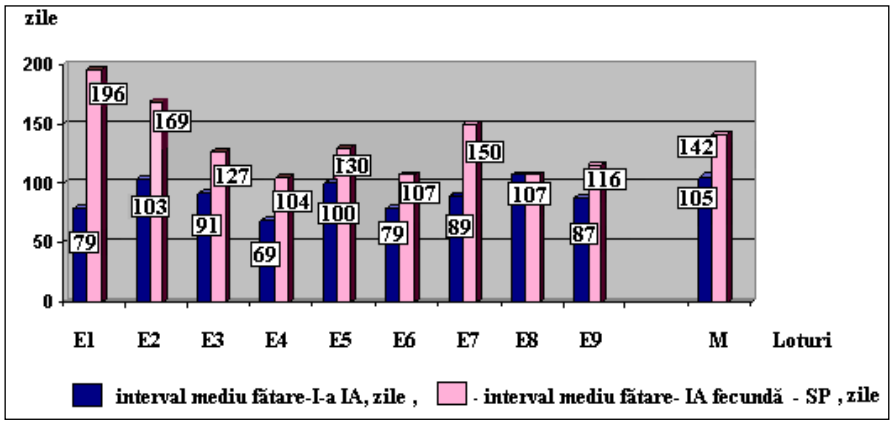


Fig. 3 Intervalele medii fătare – I-a IA şi fătare- IA fecundă la vacile cu diferite tratamente în perioada antepartum şi postpartum

Fecunditatea la primele două IA a înregistrat la vacile din loturile experimentale valori medii variabile, cuprinse între 33,3 % (E_2) şi 70 % (E_6) şi la vacile din lotul martor M 39,2 %.

În cadrul loturilor experimentale s-au evidenţiat unele loturi, cu diferenţe semnificative statistic, comparativ cu lotul martor. Astfel, au înregistrat creşteri ale fecundităţii loturile E_6 cu 30,8 % (70 %, P≤ 0,001), E_1, E_4, E_3, E_7 cu 16,3 -18,0 % (55,5 %, 57,2 %, P≤ 0,01) şi E_5 cu 8,5 % (47,7 %, P≤ 0,05), comparativ cu lotul martor (tab.4, fig. 4).

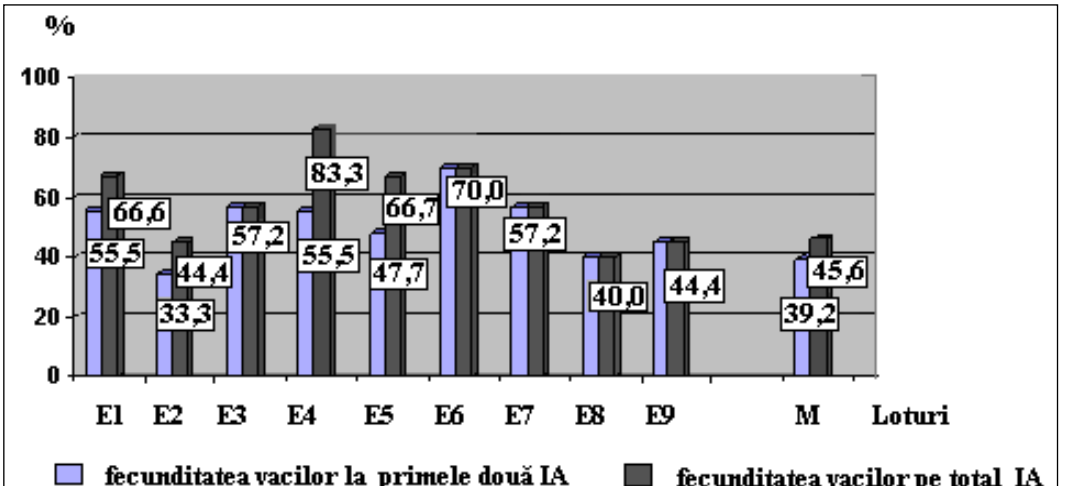


Fig. 4 Fecunditatea vacilor la primele două IA şi pe total IA la vacile cu diferite tratamente, comparativ cu lotul martor

CONCLUZII

1. Vacile care au fost tratate cu SeleVit, două doze la interval de 1 lună în perioada antepartum (lotul E_3) au înregistrat o reducere totală a retenţiei anexelor fetale şi a infecţiilor genitale,

2. La vacile care au beneficiat de o singură doză de SeleVit, (E_1, E_2) nu s-au înregistrat retenţii ale anexelor fetale, iar infecţiile genitale s-au redus cu 4,10 % (11,1%), comparativ cu lotul martor (15, 21%),

3. Vacile care au primit suplimente vitamino-minerale în ultima lună de gestaţie şi prima lună de lactaţie, asociate cu tratamente cu Polidin în prima zi, la 24 ore şi 14 zile postpartum (lot E_5) au înregistrat valori medii ale incidenţei retenţiei anexelor fetale şi respectiv infecţii uterine de 6,60 %, care au fost mai mici cu 6,64 % şi respectiv 8,61 %, comparativ cu lotul martor,

4. La vacile din loturile experimentale s-a constatat o involuţie uterină postpartum bună, în 60 % din cazuri (E_1 ,E_2,E_7 şi E_9), 70 % din cazuri (E_5,E_6) şi 80 % din cazuri (E_3,E_4), valori care au fost cu 10 %, 20 % şi respectiv 30 % mai mari, comparativ cu lotul martor, (50 %);

5. Intervalele medii de manifestare a estrului postpartum au fost cu 4 - 8 zile mai scurte la vacile din loturile experimentale E_3, E_4, E_5, E_6 şi E_7, comparativ cu cele ale vacilor din lotul martor;

6. Intervalele fătare–prima IA postpartum au înregistrat valori medii mai mici la vacile din loturile experimentale (P≤ 0,05), situate între 69 zile (E_4), 79 zile (E_1,E_6), 87 zile (E_9) şi 89 zile (E_7), comparativ cu vacile din lotul martor (105 zile);

7. Intervalele fătare–IA fecundă au avut valori medii mai mici, cu diferenţe semnificative statistic (P≤ 0,05), între loturile experimentale E_9 (116 zile), E_3 (127 zile) şi diferenţe distinct semnificative (P≤ 0,01) între E_4 (104 zile), E_6, E_8 (107 zile) şi lotul martor M (142 zile);

8. Fecunditatea la primele două IA a înregistrat valori medii mai mari, cu diferenţe semnificative statistic între unele loturi experimentale E_6, cu 30,8 % (70 %, P≤ 0,001), E_1, E_4, E_3, E_7, cu 16,3 -18,0 % (55,5 %, 57,2 %, P≤ 0,01) şi E_5, cu 8,5 % (47,7 %, P≤ 0,05) şi lotul martor M (39,2 %).

BIBLIOGRAFIE

1. CRUZ, L.C., do VALLE , 1997- Effect of prostaglandine $F_{2\alpha}$ and gonadotropin releasing hormone induced luteinizing hormone realeases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. Animal Reprod. Sci., 49, 135-142,
2. ESPANA, F. 1992- Gn-Rh and $PGF_{2\alpha}$ hormone treatment during the puerperium in dairy cattle. Archivas de zootechnia, Ref. in- Animal Breeding Abstract,no.11,vol.60,
3. JAGOS,J. 1992- The effect of a single administration of a syntetic Gn-RH analogue to cows 10-16 days postpartum on reproductive indice. Veterinarstvi Slovak Republic, Ref. in: Animal Breeding Abstract, no. 3,vol. 65,
4. LEE, J.M., KIMM, H.S., 1994- Effect of gonadotropin-releasing hormon treatment on ovarian function in Holstein cows- Journal ofAgriculture Science Livestock, ref. in- Animal Breeding Abstract,no.10,
5. MYNEUDDIN,N., 1993- Effect of $PGF_{2\alpha}$ on the uterine involution and subsequent postpartum reproductive performance in dairy cows,- ref.in: Animal Breeding Abstract,no.8,
6. RUGINOSU ELENA, SOFRONIE MARIANA, CONSTANTINESCU, M.D., 1998- Metode terapeutice aplicate în perioada puerperală în scopul creşterii fertilităţii la vaci- Rev.-Cercetări Agronomice în Moldova-, vol.1, Iaşi,
7. STEFFAN, J., CHAFFAUX,ST., BOST,F., 1990- Rôle des prostaglandines au cours du postpartum chez la vache- Perspective thérapeutique,- Réc. Méd. Vét. 166,

OPTIONS FOR PERIOPERATIVE PAIN MANAGEMENT IN SMALL ANIMALS

Larisa SCHUSZLER, C. IGNA
Faculty of Veterinary Medicine Timişoara,
Calea Aradului, no. 191, code 300645, Timişoara,
larisaschuszler@yahoo.com

The clinical use of analgesics has increased substantially in veterinary practice and the benefits of good perioperative analgesia are obvious. In present there are two new modern concepts for pain control and management: pre-emptive analgesia and multimodal analgesia. For dogs and cats pain relief has traditionally relied on three main groups of drugs: opioids, the nonsteroidal anti-inflammatory analgesics and the local anaesthetics. As part of the effort to develop mechanisms-based approaches to pain therapy, interest has focused on the use of **N***-methyl-d-aspartate blocking medications, alpha-2 adrenoceptor agonists, tricyclic antidepressant and anti-epileptic drugs.*

Key words: perioperative, analgesia, dog, cat

The clinical use of analgesics has increased substantially in veterinary practice and a recent survey revealed no differences in the use of postoperative analgesics between dogs and cats (16). In the 1970s veterinarians had a much more limited suite of analgesics to use and may have ignored or underestimated pain and its importance (34). A part of veterinarians are inherently conservative and they truly believe that no pain medication is necessary. The problem arises from lack of communication with our patients and lack of objective measure of a complete pain perception. Dogs and cats may express similar clinical sign of acute pain but it is more difficult to evaluate the degree of pain in cats.

The benefits of good perioperative analgesia are obvious, in man it has been quite well demonstrated that good perioperative pain relief leads to better outcome after surgery. Based on the "pain equivalence" concept if the procedure would cause pain in humans, it must be assumed that the animal would also experience pain and appropriate analgesia should be administered even when signs of pain cannot be readily detected in the animal (7).

Because pain intensity varies with the surgical procedure and pain control should be appropriate to the degree of surgical trauma and tissue damage produced, it must be performed a permanent effort to implement appropriate pain control strategies and reconsider current practices in the use of analgesics.

Pain control concepts

Pain control and management is guided by two modern concepts: "vaccination against pain" or pre-emptive analgesia by which patients are given medication in anticipation of pain, and "multimodal martini" concept or multimodal analgesia which means the combined use of analgesic drugs that act on different regions of the pain pathway (32).

The goal of pre-emptive analgesia is to prevent the initiation of wind-up so that central sensitization does not occur, and may be important in the prevention of chronic pain development (19). The pre-emptive literature contains much conflicting evidence and considerable debate regarding the value of preoperative medication for pain control (13, 14, 11). Drugs that have been used as analgesics in these studies include the usual analgesic agents such as opioids, nonsteroidal anti-inflammatory analgesics (NSAIAs), alpha-2 adrenoceptor agonists, and in addition ketamine and dextromethorphan (11).

The rationale behind multimodal analgesia is to improve the level of pain control by the use of drugs that target more than one level of the central nervous system sites mediating nociception and pain. Clinical studies in humans have supported the validity of improved analgesia using combinations

of drugs (18) and there are evidences of an increasing usage of multimodal analgesia in clinical veterinary practice (24, 38). Combinations of analgesics which act via different mechanisms produce a synergistic or at least additive effect, and have the advantage of enhanced analgesia without additional toxicity when the drugs are metabolized and excreted by separate routes (11).

Analgesic medication

In veterinary medicine, pain relief has traditionally relied on three main groups of drugs: opioids, the NSAIAs and the local anaesthetics. Recent advances in the study of pain physiology have led to a greater understanding of the complex mechanism of the pain pathway. Along that pathway exists the possibility to act through targeted antagonism of involved neurotransmitters using new molecules like **N**-methyl-d-aspartate **(**NMDA) blocking medications and alpha-2 adrenoceptor agonists.

Advances are being made not only in the range of analgesic drugs available, for example the cyclooxygenase COX-2 selective NSAIAs, but also in the way some of these drugs are administered such as continuous rate infusion (morphine, ketamine, lidocaine), transdermal patch technology (fentanyl) and oral administration of drugs previously reserved for systemic use (buprenorphine in cats). More traditional techniques, including perineural infiltration and extradural analgesia have also found favor again in recent years (38).

Local anaesthetics. Local and regional analgesia is defined as the use of drugs to prevent or control pain in specific areas of the body. Besides pain, the response to surgery is a combination of a local inflammatory reaction and a general endocrine metabolic response of which the latter seems to be suppressed by local anaesthetics (31). Local anaesthesia fits the category of pre-emptive analgesia perfectly because it is usually administered prior to surgery (11). These drugs can be injected into wound margins, into joints, or into bone fracture sites, around nerves, as epidural injections to anaesthetize whole regions of the body, or instilled into a body cavity, such as the chest or abdomen (8).

Lidocaine and bupivacaine are generally the local anaesthetics used in small animal practice. Lidocaine is commonly administered as constant rate infusions (CRI) for management of arrhythmias but at a similar dose rate (50-80 µg/kg/min) it can also provide dose related systemic analgesia (11). Cautions must be taken when local anaesthetics are used in cats due to a belief of increased toxicity in this species, mean convulsive dose of lidocaine is 11.7 ±4.6 mg/kg IV and that of bupivacaine is 3.8±1 mg/kg IV (4). A range of drugs can be used in combination with the common local anaesthetics attempt improvements in local and regional pain control, to enhance analgesia and prolong the duration action of local anaesthetics. These include amitriptyline, morphine, ketamine and phenol (32).

The use of microspheres to encapsulate local anaesthetics or liposomal formulations of local anaesthetics, holds great promise for the management of acute and chronic pain (5, 10).

Opioids are still the most widely accepted analgesic drugs. Opioids agonists may be used safely in cats ½ to ¼, of the dog dose, although this species is prone to central excitements following high doses (15).

The new formulations of analgesic drugs reported in the literature are aimed either at providing sustained release of drugs, or at simplifying their application. Fentanyl patches are increasingly used in clinical veterinary practice for cats and dogs, although individual variation in reaching therapeutic drug concentrations has been reported (25). In human medicine several delivery formulations of buprenorphine have been investigated, patch systems it is a new modern alternative which offers new options for small animals too (3). Morphine in a sustained-release gel matrix provides a considerable prolongation of bioavailability when is injected subcutaneously in dogs (36).

Several studies have reported at least an additive and more often a synergistic effect between a variety of opioids (morphine, fentanyl and meperidine) with a variety of alpha-2 adrenoceptor

agonists (xylazine, medetomidine) in both parenteral and spinal routes of administration (26, 30). The NMDA receptor antagonist ketamine was shown to potentiate the effect of morphine when were administered spinally (17).

Opioids are commonly provided in the perioperative period because they do not have the potential to induce renal dysfunction as the NSAIAs can and they provide sedation in the preoperative period. For post-operative analgesia can bee used higher doses of buprenorphine that are recommended in most texts, 0.03 mg/kg to 0.04 mg/kg SC, to all post-operative patients. CRI of morphine are commonly recommended for post-operative analgesia and fentanyl after a loading bolus dose (0.002 mg/kg IV) can be administrated by CRI too (0.001-0.006 mg/kg/hr in dogs and 0.001-0.004 mg/kg/hr in cats) (4, 11).

NSAIAs are analgesic largely by virtue of inhibition of COX, which is responsible for production of some inflammatory mediators including the prostaglandins. The analgesic effects of NSAIAs in the periphery are well known, but there is also evidence suggesting that they exert central analgesic effects (23).

There is particular concern about NSAIAs toxicity and their side effects in cats (21). In fact, cats have an increased susceptibility to the toxic effects of NSAIAs because of a low capacity for hepatic glucuronidation, due to reduced hepatic UDP-glucuroninosyltransferase isoforms, which is the main pathway for NSAIAs metabolism in the liver (6), leading to a longer half-life in this species than in the dog (28, 37**).** It appears that two of the few NSAIAs that cats tolerate fairly well are meloxicam and ketoprofen. However, these drugs are among the best analgesics for preventing and treating postoperative pain (35).

Administration of NSAIAs is the one of the most common predisposing factor causing gastroduodenal ulceration in dogs and cats, especially when labeled doses and intervals have not been respected (20). The incidence of acute renal failure associated with NSAIAs use is uncommon in cats (27). If given pre- or intra-operatively close monitoring during the anaesthetic period is required to ensure that blood pressure and tissue perfusion are maintained within the normal range and that adequate fluids are provided to support renal perfusion (11).

The veterinary aproved NSAIAs for use in dog and cat include carprofen, deracoxib, etodolac, firocoxib, flunixin meglumine, ketoprofen, meloxicam, tepoxalin, tolfenamic acid, vedaprofen. Carprofen is approved for use in cats at 4 mg/kg in many countries for daily SC or IV administration. It is an effective analgesic for soft tissue and orthopedic procedures in cats and it is extensively used for perioperative analgesia (22, 33). The injectable form of Metacam (meloxicam) is approved for cats as a one-time, SC injection for postsurgical pain. If given more than one time or if other NSAIAs are given, kidney and liver toxicity may occur. For dogs has been available for postoperative and chronic use but may be also suitable for preoperative use. Postoperative ketoprofen (2 mg/kg) provide in cats a better analgesia when it was compared with opioids. Flunixin has developed a reputation for adverse effects in dogs when it is given preoperatively, renal failure develops after a single dose suggesting that flunixin may be the most toxic COX inhibitor in dogs. Tolerance and excretion of flunixine is better in cats than in dogs and clinical trials have demonstrated its efficacy as an analgesic without side effects (4).

NMDA blocking medications include ketamine, dextromethorphan, memantine, and amantadine. As part of the effort to develop mechanisms-based approaches to pain therapy, renewed interest has focused on the use of ketamine for treatment of acute and chronic pain. Ketamine binds noncompetitively to the phencyclidine binding site of NMDA receptors which plays an important role in the the development and maintenance of what can be called pathologic pain after tissue injury (29). For intra- and postoperative analgesia it is given initially a loading dose of 0.2-4 mg/kg IV followed by CRI 0.2-4 mg/kg/hr depending on severity of pain (7).

Another reason for the renewed interest in ketamine is the availability of S(+) ketamine which manifests greater affinity for NMDA receptors than does R(-) ketamine. This difference results in a clinical analgesic potency of S(+) ketamine approximately two times greater than that of racemic and

four times greater than that of R(-) ketamine, whereas S(+) ketamine has a shorter duration of action (2).

Amantadine was originally developed as an antiviral compound, and has also been used to treat drug reactions that affect coordination (extrapyramidal reactions) and Parkinson's disease in humans. It appears to effectively block pain in dogs. There is positive information on its use in cats (7).

Alpha-2 adrenoceptor agonists. It is well known that this group of drugs provides analgesia, particularly visceral. The analgesic effect is at least in part via stimulation of alpha-2 receptors in the dorsal horn of the spinal cord which are normally influence by descending adrenergic inhibition. Use of alpha-2 agents as part of premedication may contribute to pre-emptive analgesia but undoubtedly the most efficient way of using the analgesic effect of these drugs is via the epidural route.

Low doses of medetomidine at 1-2 µg/kg can provide analgesia with reduced but not absent cardiovascular side effects. It may also be given as a CRI at low doses 1.5 µg/kg/hr (11). Xylazine (0.1-1 mg/kg IV, IM or SC) has been used in the dog and cat to provide analgesia for acute pain for 0.5 to 2.0 hours

Alpha-2 agents and ketamine are routinely used for their sedative and anaesthetic effects and may be providing more pre-emptive analgesia that we realise.

The classes of drugs that are potentially useful as analgesics include: drugs traditionally used in the treatment of depression or mental illness - amitriptyline, a tricyclic antidepressant and sodium channel blocker, fenfluramine, which blocks the reuptake of serotonin, dopamine D2 receptor blockers used to treat acute schizophrenia, which have shown analgesic effects in sheep and rats - and anti-epileptic drugs gabapentin and pregabalin which exhibit antihyperalgesic activity by their interaction with calcium channels (9, 12, 39). Results from clinical trials have shown that pre-emptive gabapentin provides postoperative analgesia (1). It is accepted that neuropathic pain can develop acutely after different surgical procedures and gabapentin is a useful adjuncte analgesic, sugested ranges in cats is 2.5-5 mg/dkg q12h, and in dogs 5-25 mg/kg q8h (7).

CONCLUSIONS

1. In small animals are multiple choices of analgesic, ways and techniques in which to use them, some “old” like local anesthetic techniques and also some “new” like CRI or patch system.
2. Prevention of pain using pre-emptive drugs provides more effective pain control than alleviation of pain after it has been initiated.
3. The use of a combination of drugs is more effective in controlling pain than the use of a single drug administered alone.

BIBLIOGRAPHY

1. Al-Mujadi H., A-Refai A. R., Katzarov M. G., Dehrab N. A., Batra Y. K., Al-Qattan A. R., 2006, Can. J. Anesth, 53:268-273.
2. Arendt-Nielsen L., Nielsen J., Petersen-Felix S., Schnider T. W., Zbinden A. M., 1996, Br. J. Anaesth., 77:625-631.
3. Bohme K., 2002, Clin. Rheumatol, 21:s13–s16.
4. Carroll G. L., 1999, Veterinary Clinics of North America, 29(3):701-716.
5. Cereda C. M., Brunetto G. B., de Araujo D. R., de Paula E., 2006, Can. J. Anesth., 53:1092-1097.
6. Court M., Greenblatt D., 2000, Pharmacogenetics, 10:355–369.
7. Dyson Doris, Mathews K. A, 2007, Veterinary Emergency and Critical Care Medicine, Mathews K. A. ed., Lifelearn Pub., Guelph, Ontario, 81-96.
8. Ejlersen E., Andersen H. B., Eliasen K., Mogensen T., 1992, Anesth. Analg., 74:495-498.
9. Field M. J., McCleary S., Hughes J., Singh L., 1999, Pain, 80:391-398.
10. Fletcher D., Le Corre P., Guilbaud G., Le Verge R., 1997, Anesth. Analg., 84:90-94.
11. Forysth Sandra, 2007, Proc. WSAVA Congress, Sydney, http://www.wsava.org/
12. Gerner P., Mujtaba M., Khan M., Sudoh Y., Vlassakov K., Anthony D. C., Wang G. K., 2002, Anaesthesiology, 96:1435-1442.

13. Giamberdino M. A., Affaitati G., Lerza R., Vecchiet L., 2000, Brain Research 878:148-54.
14. Gonzalez M. I., Filed M. J., Bramwell S., McCleary S., Singh L., 2000, Pain 88:79-88.
15. Hellyer P. W., Wagner Ann E., 2001, Veterinary Emergency Medicine Secrets, II-nd edition, Wingfield W. E. ed., Hanley & Belfus Inc., Philadelphia, 99-106.
16. Hewson C. J., Dohoo I. A., Lemke K. A., 2006, The Canadian Veterinary Journal, 47:352–359.
17. Joo G., Horvath G., Klimscha W., Kekesi G., Dobos I., Szikszay M., Benedek G., 2000, Anesthesiology, 93(1):231-241.
18. Kehlet H., Werner M., Perkins F., 1999, Drugs 58(5):793-797.
19. Lascelles B. D. X., 2000, Animal Pain. A Practice-Oriented Approach to an Effective Pain Control in Animals, Hellebrekers L. J. ed., Van Der Wees, Utrecht, 85–116.
20. Lascelles B. D. X., Blikslager A. T., Fox S .M., Reece D., 2005, Journal of the American Veterinary Medical Association, 227:1112–1117.
21. Lascelles B. D. X., Capner C. A., Waterman-Pearson A. E., 1999, The Veterinary Record, 145:601–604.
22. Lascelles B. D. X., Court M. H., Hardie E. H., Robertson S. A., 2007, Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 34:228–250.
23. Lizarraga I., Chambers J. P., 2006, Research in Veterinary Science, 80:194-200.
24. Mathews K. A., 2001, Proc AVERT/ANZCCART Conference, Melbourne.
25. Mathews K. A., 2001, Proc AVERT/ANZCCART Conference, Melbourne.
26. Meert T. F., De Kock M., 1994, Anesthesiology, 81(3):677-688.
27. Pages J. P., 2005, Pratique medicale & chirurgicale de l'animal de compagnie, 40:177–181.
28. Parton K., Balmer T. V., Boyle J., Whittem T., Machon R., 2000., Journal Veterinary of Pharmacology and Therapeutics, 23:73–79.
29. Petrenko A. B., Yamakura T., Baba H., Shimoji K., 2003, Anesth. Analg., 97:1108-1116.
30. Przesmycki K., Dzieciuch J. A., Czuczwar S. J., Kleinrok Z., 1997, Eur. J. Pharmacol., 337(1):11-17.
31. Rosenberg J., Kehlet H., 2001, Ugeskrift Laeger, 163:908–912.
32. Schofield J. C., Williams Virginia M., 2002, www.biosecurity.govt.nz/files/regs/animal-welfare/pubs/naeac/analgesic-practice.pdf
33. Slingsby L. S., Waterman-Pearson A. E., 2000, Journal of Small Animal Practice, 41:447–450.
34. Stafford K. J., Mellor D. J., 2007, The Veterinary Journal, 174:225-226.
35. Steagall P. V. M., Mountinho F. Q., Mantovani F. B., Passarelli D., Thomassian A., 2009, Research in Veterinary Science, 86:115–120.
36. Tasker R. A., Ross S. J., Dohoo S. E., Elson C. M., 1997, J. Vet. Pharmacol. Ther., 20(5):362-367.
37. Taylor P. M., Delatour P., Landoni F. M., Deal C., Pickett C., Shojaee Aliabadi F., Foot R., Lees P., 1996, Research in Veterinary Science, 60:144–151.
38. Vinuela-Fernandez I., Jones Emma, Welsh Elizabeth M., Fleetwood-Walker Susan M., 2007, The Veterinary Journal, 174:227-239.
39. Wang Y. X., Bowersox S. S., Pettus M., Gao D., 1999, J. Pharm. Exp. Therap., 291:1008-1016.

TESTAREA EFICIENTEI DIALIZEI PERITONEALE IN INSUFICIENTA RENALA UTILIZAND O SOLUTIE PREPARATA DIN LICHID RINGER SI GLUCOZA LA ANIMALELE DE COMPANIE

TESTING OF EFFICIENCY OF PERITONEAL DIALYSIS IN RENAL FAILURE IN COMPANION ANIMALS USING A COMBINATION OF RINGER SOLUTION AND GLUCOSE

I. SCURTU, G. GIURGIU, M. MIRCEAN, LAURA LIVITCHI, MIHAELA NICULAE, A. MACRI
USAMV Cluj-Napoca, FMV Cluj-Napoca,
icscurtu@yahoo.com

Peritoneal dialysis is a method of replacing the renal function in case of renal failure. The results obtained using Ringer + glucose 20% solution were extremely promising, being able to obtain a decrease in the urea and creatinine value after each round of dialysis. Unfortunately, the lack of special catheters made the recovery of dialysis fluid defective with the data published in literature.

In conclusion we recommend the use of peritoneal dialysis in all the kidney disorders witch have as result temporary loss of renal filtration function, being a relatively free of complications and low cost technique.

Key words: peritoneal dialysis, cat, dog, kidney failure

In medicina veterinara, de cele mai multe ori terapia suferintei renale este deficitara, substituirea functiei de excretie renala realizandu-se doar intr-o mica masura. Dializa peritoneala, si mai ales hemodializa, sunt principalele metode de epurare a produsilor toxici rezultati in urma metabolismului Datorita faptului ca hemodializa necesita o aparatura extrem de costisitoare si un personal calificat, utilizarea ei este limitata pentru clinici si spitale veterinare. In schimb dializa peritoneala este cea mai accesibila metoda de suplinire temporara a functiei renale.

Dializa peritoneala implica un schimb de electroliti si fluid la nivelul membranei peritoneale avand la baza principiul osmozei. In esenta, are loc introducerea unui lichid hiperton, caldut la nivelul cavitatii peritoneale urmata de recuperarea acestuia. In functie de gravitatea afectiunii se pot face mai multe cicluri de aceasta factura zilnic, timp de mai multe zile, pana la recuperarea functiei de excretie renala.

MATERIAL SI METODA

Scop – testarea eficientei dializei peritoneale, utilizand o solutie de dializa preparata extemporaneu, formata din 4 parti solutie Ringer si o parte glucoza 20 %.

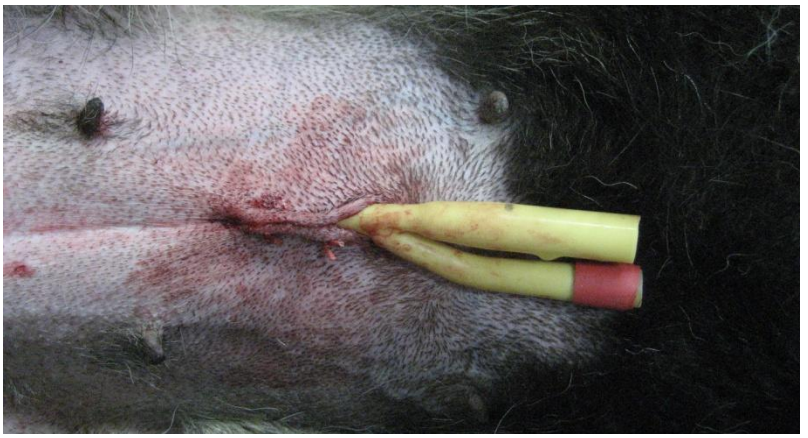


Fig 1. Cateter Foley introdus intraperitoneal (original)

Cercetarea s-a desfasurat in cadrul disciplinei de Patologie si Clinica Medicala din cadrul FMV Cluj-Napoca in perioda 2006-2008 pe un numar de 6 cazuri (5 pisici si un caine) care au fost diagnosticati cu insuficienta renala acuta sau cronica acutizata. Diagnosticul clinic a fost fie intoxicatia cu etilenglicol, fie pielonefrita. La acesti pacienti, dupa confirmarea paraclinica a insuficientei renale, a avut loc montarea intraperitoneala a unui cater Foley pluriperforat, nedispunand de catetere speciale pentru efectuarea dializei peritoneale.

Tehnica dializei peritoneale a constat in administrarea intraperitoneala a solutiei formata din 4 parti Ringer si o parte glucoza 20 % in doza de 40-50 ml/kc urmata de extractia lichidului dupa aproximativ 30-40 minute. Repetarea dializei peritoneale s-a realizat dupa 2 ore.

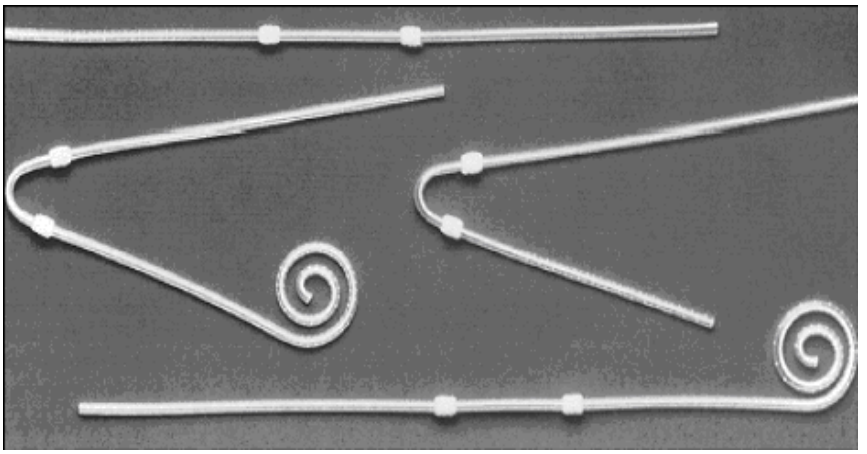


Fig. 2. Catetere intraperitoneale pentru dializa peritoneala (Labato)

REZULTATE SI DISCUTII

In tabelele1, 2,3,4,5 si 6 sunt prezentate valorile determinarilor biochimice, inainte de dializa peritoneala cat si dupa 2 cicluri de dializa peritoneala:

Tab 1. Determinarile biochimice la cazul 1

Cazul 1. Pisica 13 ani, rasa europeana, diagnostic - intoxicatie cu etilenglicol				
	Uree (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)
T_0	413	4.11	5.3	113
T_1	363	4.01		
T_2	331	3.90		

T_0 – valorile determinarilor biochimice inainte de dializa peritoneala;

T_1 – valorile determinarilor biochimice dupa prima dializa peritoneala;

T_2 – valorile determinarilor biochimice dupa a-II-a dializa peritoneala.

Tab 2. Determinarile biochimice la cazul 2

Cazul 2. Pisica 10 ani, rasa europeana, diagnostic - intoxicatie cu etilenglicol				
	Uree (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)
T_0	617	8.77	6.7	128
T_1	540	8.60		
T_2	503	8.20		

Tab 3. Determinarile biochimice la cazul 3

Cazul 3. Pisica 8 ani, rasa europeana, diagnostic - pielonefrita				
	Uree (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)
T_0	390	3.3	4	117
T_1	320	3.02		
T_2	290	2.81		

Tab 4. Determinarile biochimice la cazul 4

Cazul 4. Motan 10 ani, rasa birmaneza, diagnostic - intoxicatie cu etilenglicol				
	Uree (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)
T_0	961	9.35	4.77	120
T_1	873	9.12		
T_2	798	8.90		

Tab 5. Determinarile biochimice la cazul 5

Cazul 5. Motan 11 ani, rasa europeana, diagnostic - intoxicatie cu etilenglicol				
	Uree (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)
T_0	410	4.8	5.1	132
T_1	372	4.61		
T_2	339	4.40		

Tab 6. Determinarile biochimice la cazul 6

Cazul 6. Ciobanesc german, 12 ani, diagnostic - intoxicatie cu etilenglicol				
	Uree (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)
T_0	364	2.93	5.12	140
T_1	341	2.79		
T_2	313	2.60		

Dializa peritoneala a inlocuit functia renala in toate cazurile luate in discutie. Dintre markerii suferintei renale determinati, dinamica scaderii valorii uremiei a fost net superioara fata de dinamica scaderii creatininemiei. Din pacate, in situatia de fata am, efectuat doar 2 cicluri de dializa peritoneala intrucat scopul a fost testarea eficientei solutiei Ringer-glucoza, plus si faptul ca toti pacientii au avut parte de un diagnostic incurabil. Totusi, aceste rezultate sunt extrem de incurajatoare recomandand dializa peritoneala ca si metoda de terapie in insuficienta urinara. Rezultate similare au fost obtinute si de Beckel care a aplicat metoda in cazul pacientilor cu insuficienta renala acuta consecutiv leptospirozei. De asemenea Crisp, intr-un studiu pe un numar de 25 caini si 2 pisici, reuseste prin dializa peritoneala scaderea valorii uremiei la un numar de 19 caini si a creatininemiei la 20 de caini.

Dintre complicatiile dializei peritoneale, Dorval mentioneaza sincopa cardio-respiratorie si hiperglicemia care a necesitat administrarea de insulina. Langstom subliniaza ca si complicatii mai frecvente tulburarile de coagulare a sangelui si tendinta la hemoragii. Ross mentioneaza ca si complicatie intr-o proportie de 83% edemele subcutanate si hipoalbuminemia. Complicatiile septice sunt amintite intr-un procent relativ mic daca se respecata conditii minime de antisepsie cat si protectia cu antibiotice a pacientilor.

In situatia de fata, o problema a rezidat din greutatea recuperarii lichidului de dializa, mai ales dupa primul ciclul. Literatura de specialitate precizeaza necesitatea recuperarii unui procent de cel putin 90 %. In cazul nostru, dupa primul ciclu de dializa peritoneala, cantitatea recuperata a fost in jur de 60 %, procent care a crescut la urmatorul ciclul pana la 80 %. Totusi aceste procente sunt destul de mici fata de datele furnizate de alti autori, situatie care am explicat-o prin lipsa unor catetere adecvate acestei manopere.

CONCLUZII

1. Dializa peritoneala este o metoda ieftina, relativ sigura, de inlocuire temporara a functiei de excretie renala. Nu necesita aparatura costisitoare si nici un personal riguros calificat, putandu-se aplica in orice cabinet cu o dotare minima.
2. Recomandam utilizarea dializei peritoneale la toti pacientii cu insuficienta urinara acuta sau cronica acutizata, dar nu ca si terapie unica, ci asociata, cu atingerea celorlalte obiective din terapia insuficientei urinare acute.

BIBLIOGRAFIE

1. Beckel NF, O'Toole TE, Rozanski EA, Labato MA, 2005, Peritoneal dialysis in the management of acute renal failure in 5 dogs with leptospirosis. *J Vet Emerg Crritic Care*; **15**(3):201-5;
2. Crisp MS, Chew DJ, DiBartola SP, Birchard SJ., 1989, Peritoneal dialysis in dogs and cats:27 cases (1976-1987). *J Am Vet Med Assoc;* **195**(9):1262-6;
3. Dorval Patricia, Boysen SR, 2009, Management of acute renal failure in cats using peritoneal dialysis: a retrospective study of six cases (2003-2007). *J of Fel Med and Surgery;* **11:** 107-115;
4. Labato Mary Anna, 2000, Peritoneal dialysis in emergency and critical care medicine, *Clinical Tehniques in Small Animal Practice*; **15**: 126-135;
5. Langstom CE, 2002, Acute renal failure caused by lily ingestion in six cats. *J Am Vet Med Assoc*; **220**(1): 49-52,36;
6. Ross LA, Labato MA, Peritoneal dilaysis. In: DiBartolaSP, ed. Fluid, Electrolyte and Acid-Base Disorders. Philadelphia: Saunders 2006: 635-49.

EVALUAREA CORELATIVĂ A CONCENTRAŢIEI IMUNOGLOBULINELOR ŞI COMPLEXELOR IMUNE CIRCULANTE SERICE LA SUINE INFESTATE EXPERIMENTAL CU *ASCARIS SUUM*

EVALUATION OF CONCENTRATION OF IMMUNOGLOBULIN AND CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN PIGS EXPERIMENTALY INFESTED WITH *ASCARIS SUUM*

A. R.SZAKACS [1] , BIANCA SZAKACS [1] , N. TISE [2] , V. COZMA [1]
1. USAMV,Cluj – Napoca,andreiradu2004@yahoo.com
2. Penitenciarul Oradea, Ferma de porci

The study was carried out on 15 pigs, grouped in three groups (n=5). The aim of the study was to monitor some nonspecific immune parameters: circulating immune complex (CIC), immunoglobulins in pigs serum. Blood samples were colected and submitted to the following tests: precipitation tests (serb and Haskova modifies methode) to evaluate gammaglobulins and CIC levels. The precipitation tests revealed that CIC and total immunoglobulins levels has no variable values depending on infestation stage with A. suum. By benchmarking the results obtained in both used tests shows that they have a role in diagnosis, even if some values indicate that immune changes occur not due to the destructive action of A. suum, but the infections brought by the parasite which intensifies non-specific reaction in the immune system.

Key words: pigs, circulating immune complex, gammaglobulins, *Ascaris suum*, experimental infestation

Suinele reprezintă una dintre speciile de interes economic deosebit. Asigurarea producţiei de carne la nivel scontat, depind în cea mai mare măsură de asigurarea unei stări corespunzătoare de sănătate, prin respectarea tehnologiei de creştere (alimentaţie corespunzătoare, condiţiile de microclimat) dar şi a tehnologiilor sanitar –veterinare. Prin stabilirea profilului imunologic se poate aprecia starea de sănătate sau de boală a acestei specii. Stabilirea nivelului imunoglobulinelor totale dar şi evaluarea activităţii mediate celular ocupă un loc deosebit. Existenţa complexele imune circulante (CIC) a fost dovedită atât la om cât şi la animale, însă nu se cunoaşte cu certitudine rolul acestora în patologia suinelor în special în infestaţia cu *Ascaris suum* (Jungersen, 2003). Lucrarea de faţă urmăreşte estimarea corelativă a nivelului CIC şi imunoglobulinelor totale serice (ig totale) la suinele infestate experimental cu ouă de *A. suum.*

MATERIALE ŞI METODE

Studiul a fost realizat pe un număr de 15 suine (3 loturi, n=5), de rasă mixtă cu vârste asemănătoare(6-8 luni). Loturile 2 şi 3 au fost infestate cu 1000 ouă fiecare individ iar lotul 1 a fost martor. Animalele din lotul 3 a fost deparazitate (Stankiewich şi col., 1992) cu mebendazol concomitent cu infestarea artificială. Ouăle au fost recoltate din uterul femelelor de *A. Suum,* obţinute în urma abatorizării animalelor, apoi au fost cultivate în apa simplă la temperatura de de 25^0C (după Jungersen, 1998). Testele au fost efectuate pe probe de sânge recoltate pe heparină (5o UI heparină /1ml) prin puncţia venei jugulare cu scopul obţinerii de ser. Recoltările s-au efectuat timp de 56 zile, o dată pe săptămână pentru a se urmări în dinamică modificările răspunsului imun în concordanţă cu diferite stadii evolutive ale ascariozei.

Gammaglobulinele totale s-au determinat utilizând metoda cu reactiv Serb. Pentru estimarea concentraţiei complexelor imune circulante (CIC) s-a folosit atât varianta cu ser integral cât şi varianta

TFS, utilizând varianta precipitării cu PEG 4,2% Pentru estimarea lor s-a utilizat metoda Haskova modificată (Haskova, 1979). Datele obtinute au fost prelucrate statistic folosind sistemul One Way ANOVA din cadrul progamului GraphPad InStat 3.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile medii ale indicatoriulor statistici obţinuti pentru imunoglobulinelor totale sunt prezentate in tabelul numărul 1.

Tabelul nr.1 Indicatorii statistici calculaţi pentru imunoglobulinele totale serice (UDO)(medii)

Recoltarea	Lot 1	Lot 2	Lot 3
I	0,041	0,252	0,017
II	0,093	0,175	0,061
III	0,032	0,168	0,019
IV	0,025	0,169	0,250
V	0,187	0,176	0,108
VI	0,12	0,065	0,307
VII	0,176	0,053	0,29
VIII	0,098	0,054	0,234
Media	0,096	0,176	0,160
Dev std.	0,062	0,064	0,122
Var	0,003	0,004	0,014

Se observă că valorile medii ale lotului martor sunt mult mai scăzute decât lotul 2 unde valorile au fost crescute la primele 5 recoltări după care au scăzut. La lotul 3 s-au înregistrat valori mai scăzute iniţial dar care au crescut semnificativ la ultimele recoltări. Valorile exprimate în UDO ale indicatorilor statistici calculaţi pentru imunoglobulinele totale concordă cu cele din literatura de specialitate (Baker şi col., 1994) în cazul lotului 2 infestat şi netratat, răspunsul imun mediat de anticorpi fiind mai amplu în primele faze ale migrarii larvare după care scade. Situaţia este insă diferită la lotul 3 unde valorile sunt crescute ($p<0,01$) probabil datorată unor deficienţe de tehnologie sau factori stresanţi care au putut interveni.

Nivelele serice ale complexelor imnue circulante şi valorile prelucrate statistic sunt redate în tabelele 2,3 şi 4 pe fiecare lot experimental în parte.

Tabelul nr. 2 Valorile medii obţinute la testul de precipitare cu PEG 4,2% la lotul 1 martor

Recoltarea	Tampon	PEG	DIFERENŢA
I	0,069	0,081	-0,012
II	0,058	0,063	-0,005
III	0,045	0,067	-0,022
IV	0,049	0,082	-0,033
V	0,088	0,092	-0,004
VI	0,023	0,047	-0,024
VII	0,034	0,035	-0,001
VIII	0,043	0,015	0,028
Media	0,0511	0,0603	-0,0091
Dev std.	0,0204	0,0263	0,0187
var	0,0004	0,0007	0,0004

Tabel 3 Varile medii obţinute la testul de precipitare cu PEG 4,2% la lotul 2 infestat netratat

Recoltarea	Tampon	PEG	DIFERENŢA
I	0,061	0,148	-0,087
II	0,098	0,263	-0,165
III	0.061	0,061	-0,035
IV	0,082	0,098	-0,016
V	0,082	0,167	-0,085
VI	0,032	0,047	-0,015
VII	0,052	0,035	0,017
VIII	0,133	0,015	0,118
Media	0,077	0,104	0,104
Dev std.	0,033	0,083	0,0930
var	0,0011	0,0070	0,0087

Tabel 4 Valorile medii obţinute la testul de precipitare cu PEG 4,2% la lotul 3 tratat cu mebendazol

Recoltarea	Tampon	PEG	DIFERENŢA
I	0,048	0,068	0,02
II	0,058	0,091	0,033
III	0,087	0,075	-0,012
IV	0,040	0,057	0,017
V	0,050	0,062	0,012
VI	0,023	0,147	-0,024
VII	0,034	0,135	-0,001
VIII	0,043	0,115	0,12
Media	0,047	0,093	0,04
Dev std.	0,0190	0,0346	0,0478
var	0,0004	0,0012	0,0023

Urmărind valorile UDO obţinute se observă că, valorile lotului 1 au fost negative cu o sigură excepţie (recoltarea VIII), lotul 2 a prezentat doar 2 valori pozitive iar la lotul 3 s-au înregistrat cele mai multe valori pozitive contrat aştepărilor. Prin calculul valorilor obţinute în urma precipitării cu PEG 4,2% s-a observat o creştere uşoară a acestora de la o săptămână la alta însă şi uşoare scăderi care ar putet fi datorate imunităţii pre-hepatice ale cărui aspecte nu sunt pe deplin lămurite(Jungeresen, 2003). În experimentul efectuat se constată că nivelul CIC totale este semnificativ scăzut la lotul 3 la ultimele recoltări ceea ce denotă o bună epurarea a acestora din circulaţie graţie existenţei unor mari cantităţi de Ig M circulant (Aydar şi col., 2005) şi a faptului că acest lot a fost supus deparazitării. În felul acesta testul de precipitare cu polietilenglicol se dovedeşte util pentru diagnostic.

CONCLUZII

1. Urmărind valorile obţinute putem concluziona că există un paralelism între evoluţiile imunoglobulinelor totale şi ale CIC şi a complexelor imune circulante la suinele parazitate cu *A. suum*.
2. În urma evaluării parametrilor imuni umorali nespecifici din serul sangvin a reieşit faptul că, concentraţia gamablobulinică prin aplicarea testului cu sulfat de zinc a evidenţiat valori diferite pe parcursul celor 8 recoltări însă nesemnificative statistic(p>o,5). Tehnica de preicipitare cu PEG 4,2% demonstrează deasemenea variaţi nesemnificative statistic.
3. Prin evaluarea comparativă a rezultatelor obţinute la ambele teste utilizate s-a arătat că au rol în diagnostic chiar daca unele valori denotă că modificările imune survenite nu se datorează acţiunii distructive ale lui *A. suum* ci microflorei de portaj care determină o intesificare nespecifică a reacţiei sistemului imun în contact cu diferite microorganisme din mediu.

BIBLIOGRAFIE

1. Aydar Y, Sukumar S, Szakal A., Jonh G. (2005) - Tew the influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the Ig M response, Ig class switching and production of high affinity Ig G. The journal of immunology, 174, 5358-5356.
2. Baker D.G., Bryant J.D., Urban J.F. (1994) – Swine immunity to selected parasites. Veterinary Immunnology and Immunopathology 43, 127-133.
3. Jungersen G. (1998) - Experimental Ascaris suum infection. Manipulated infections immune response to larvar migration in pigs. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, pp.1-27. PhD Thesis; 1998.
4. Haskova V., Kaslik J., Riha I., Matl I., Rovensky J.(1979) – Modified method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation. Z.Immuno Forsh, 154:399-404.
5.Stankiewicz M., Jonas W.,Froe D.L.(1992) – Patent infection of A.suum in pigs: effect of previous exposure to multiple, high doses of eggs and various treatment regimes. International Journal for Parasitology 22, 597-601.

DATE MORFOCLINICE INTR-UN EPISOD DE TOXEMIE DE GESTATIE LA OI

MORPHOLOGICAL ASPECT IN AN OUTBREAK OF GESTATION TOXIEMIA IN SHEEP

TRAMBITAS B.[1] IONITA, L.[2] PUIA, M.[3]
[1] DIrecţia Sanitară Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor Sibiu
[2] Facultatea de Medicină Veterinară Bucureşti
[3] Agenţia Naţională Sanitară Veterinara şi pentru Siguranţa Alimentelor

Pregnancy toxemia is a real sheep ketosis of primary malnutrition, although its trigger is encouraged by different states of physical and psychological stress, in the last period of gestation, in the case of twin gestation or gestation with multiple fetuses.

We followed the morfoclinical development in an episode of a flock of 400 sheep from a farmer in Marginimea, Sibiu. It is related the anamnesis of the previous years during January-February resulted in major losses in the sheep that lambed twins. Were recorded economic losses, about 60 being the mother of sheep, of which 14 died and at the other have been registered abortions, non-viable twin lambs and those who survived were flaw.

Clinical signs were represented by consecutive abortion events and sequential aspects, very different from one animal to another, expressed by signs of cortical inhibition developed with eclampsia and sterno-abdominal decubitus.

At the necropsy of twin fetuses from uterus we found hepatomegaly and lesions of hepatosis. At dead sheep was found a degenerated and friable liver, the other lesions congestive-hemorrhagic were non-characteristic.

Key words: ketosis, gestation toxemia, twin lambs, malnutrition

In condiţiile ţării noastre, toxemia de gestaţie a oilor poate fi considerată o veritabilă cetoză de subnutriţie primară, cu toate că declanşarea ei este favorizată de diferite stări de stres fizic şi psihic, în ultima perioadă a gestaţiei, în cazul gestaţiei gemelare sau a gestaţiei cu fetuşi multipli.

Toxemia de gestaţie a oilor diferă în multe privinţe esenţiale de cetoza de la bovine, ambele fiind definite ca dismetabolii glucidice.

În etiologia bolii sunt incrimainaţi mai mulţi factori (1, 5, 7, 14):

-predispozanţi. Predispoziţia ovinelor pentru cetoza de subnutriţie în general, ceea ce face uşor reproductibilă această dismetabolie, prin simpla restricţie de hrană.

O altă predispoziţie este cea legată de starea de gestaţie, boala având incidenţă maximă şi semne dramatice în starile de gestaţie avansată, şi mai ales în cazul unor sarcini gemelare;

- nutriţionali. Subnutriţia globală în condiţiile sezonului rece, atunci când şi hrana este mai deficitară şi când pot exista şi goluri de furajare din cauza intemperiilor. Starea de subnutriţie globală implică, fără întârziere o indigestie biochimică simplă a prestomacelor care, prin scăderea activităţii microorganismelor perturbă digestia ruminală normală: aceasta conduce la hipoglicemie, creşterea azotemiei şi a acizilor graşi liberi, consecutiv mobilizării adrenalinice a lipidelor,
- deficitul de fibră brută. Starea de acidoză latentă poate fi determinată şi de consumul de fibroase tăiate prea scurt şi de eventualul exces de carbohidraţi uşor digestibili. Alţi factori alimentari sunt: excesul de proteină uşor digestibilă şi excesul de azot neproteic care întreţin o stare de alcaloză subclinică, exprimată prin disfuncţie ruminală, administrarea de furaje cetogene, precum şi diverse carenţe mineralo-vitaminice, în biotină, ciancobalamină etc.;
- factori favorizanţi. Aceşti factori sunt: schimbarea bruscă a alimentaţiei, inapetenţa (mai ales la oile gestante grase), etc.;

- factori de stres. Stresul termic este unul din cei mai importanţi factori, care se adaugă celor menţionaţi anterior, cu atât mai mult cu cât stadiul final al gestaţiei coincide cu sezonul extrem de rece. Alţi factori stresanţi sunt: stresul nutriţional, transporturile ovinelor gestante în stadiul final, şi limitarea mişcării.

Fig. 1 - Sezonul rece este un important factor de risc în apariţia toxemiei de gestaţie

- factori legaţi de individ. Sunt descrise cauze hepatice (diverse disfuncţii), pe un fond al parazitismului existent, ale modificării tablei dentare etc.

La ovine, spre deosebire de bovine există unele particularităţi în privinţa metabolismului glucidic. La ovine, precursorii glucidici sunt identici cu cei de la bovine. Energia digestibilă este acoperită prin procesul de neoglucogeneză hepatică, pornind de la acizii graşi volatili (AGV). Dintre aceştia, acetatul se utilizează în ţesuturile extrahepatice, propionatul este oxidat în glucoză de către ficat iar butiratul se absoarbe sub formă de acid-beta-hidroxibutiric (3, 4, 12, 13).

Acid-beta-hidroxibutiric, ca şi ceilalţi corpi cetonici (acidul acetilacetic şi acetona) se absorb prin epiteliul ruminal, putând fi utilizaţi de ţesuturile extrahepatice.

La ovine, după consumul hranei bazată pe fibroase, acizii liberi plasmatici scad şi cresc după consumul de concentrate. În cazul înfometării, acizii graşi liberi plasmatici cresc foarte mult, ei rezultând din mobilizarea trigliceridelor de depozit în cursul înfometării.

La oile înfometate negestante modificările metabolice sunt similare celor din diabet, dar nu atât de pronunţate. Oile gestante au capacitatea de a se adapta subnutriţiei severe, în doar două situaţi: cândseveritatea subnutriţiei se realizează în timp îndelungat şi atunci când nu există necesităţi sporite brusc de consum suplimentar al resurselor energetice ale organismului.

În timpul gestaţiei „drenarea" unei cantităţi importante de glucoză spre fetus este un proces preferenţial, care nu ţine cont de disponibilitatea maternă. În cazul gestaţiilor gemelare, necesarul de glucoză se dublează, putându-se copnstata corelaţia foarte semnificativă între glicemie, acizii graşi liberi plasmatici şi cetonemie, în raport cu greutatea mieilor la fătare

În cazul gestaţiei la oaie şi glicogenul hepatic al acesteia este scăzut cu toate că el nu constituie un precursor major al glucozei cu toate că nivelul glicogenului hepatic al fetusului este crescut chiar în condiţiile deprivării nutriţionale materne (9).

La nivel renal se înregistrează reducerea fluxului plasmatic şi a ratei de filtrare glomerulară.

Stimularea adrenocorticală în cazul toxemie de gestaţie se exprimă prin cortezolemie crescută când se stimulează neoglucogeneza pornind de la aminoacizi şi scade utilizarea tisulară a glucozei.

MATERIAL SI METODE

Ne-am efectuat cercetările intr-o turmă cu 400 de oi a unui crescător din Mărginimea Sibiului, în perioada decembrie-februarie 2009.

Pentru efectuarea investigaţiilor morfoclinice am recurs la examinarea clinic a efectivului, ţinând cont de datele anamnetice, cu referire la ultimii ani când crescătorul a înregistrat pierderi mari în perioada fătărilor, prin avorturi, cu precădere la oile cu gestaţie gemelară şi mortalitate la miei şi oi.

Am efectuat o anchetă epidemiologică completă în care am luat considerare relatarea episoadelor de avort din anii trecuţi, am analizat raţia furajeră, condiţiile de întreţinere (frigul şi curenţii de aer) şi am efectuat examen clinic individual la mai multe oi şi la mieii acestora.

Am recoltat probe de furaje, apă, avortoni şi cadavre ale oilor moarte, sânge de la oile gestante şi cele fătate, urină pentru evidenţierea corpilor străini, pe care le-am trimis la laborator pentru investigaţii şi determinări.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Apariţia unor cazuri cu simptomatologie nervoasă la oile gestante iarna, mai ales în focar şi a apariţiei avorturilor spontane în condiţiile administrării furajului însilozat poate conduce la prezumpţia unei listerioze, la suspectarea cenurozei sau a unei meningoencefalite sau la toxemia de gestaţie (cetoză). De aceea se impune coroborarea datelor anamnetice cu semnele clinice recoltate individual cu datele examenului necropsic şi cu determinări de laborator.

Identificarea unor cazuri certe de toxemie de gestaţie a necesitat investigarea unui număr mai mare de indivizi, cel puţin în direcţia cetonuriei, ceea ce a permite realizarea unui diagnostic de grup, care justifică şi adoptarea unor măsuri globale.

Examenul clinic al efectivului a permis identificarea oilor gestante carenţate (cu lâna căzută) cu apatie şi cu sindromul de refuz al hranei: oile respective adoptau decubitul sterno-abdominal sau se izolau în mici grupuri „cap la cap”, vezi fig 1 şi 2., cu semne de eclampsie, scrâşniri din dinţi (bruxism), finalul bolii fiind caracterizat printr-o stare comatoasă, în care marile funcţii sunt profund afectate, exprimate inclusiv prin prezenţa unor semne respiratorii agonice.

Fig. 2 - Oaie cetozică care adoptă decubitul sternoabdominal

Fig. 3 - Oi carenţate, cu inapetenţă şi apatie, aflate în gestaţie avansată

Alte elemente clinice le-am observant la oile fătate care nu prezentau probleme de sănătate dar la care mieii fătaţi erau destul de slab dezvoltaţi (fig. 3)

Fig. 4 - Oi mame şi miei slab dezvoltaţi

Oile cu miei gemeni au fost izolaţi în boxe separate (fig. 4) iar crescătorul le acorda o atenţie deosebită pentru a-i recupera şi recondiţiona întrucât starea lor era precară.

Fig. 5 - Miei gemeni proveniţi dintr-o oaie cetozică

Pe teren am efectuat teste rapide urinare, folosind stripuri pentru determinarea a 10 parametrii, prezenţa corpilor cetonici în urină fiind elementul caracteristic pentru oile gestante cu manifestări digestive şi nervoase.

Avortoni şi cadavrele au fost examinate şi trimise la laborator, acestea oferind date importante.

Din punct de vedere lezional, ficatul a fost găsit ca fiind organul cel mai afectat. El prezintă leziuni de degenerescență grasă, este mărit în volum, palid, friabil, cu zone de steatoză.

În cele mai multe cazuri leziunile renale nu sunt caracteristice, observându-se zona cortexului ca fiind palidă, cu leziuni de degenerescență glomerulară.

CONCLUZII

1. In condițiile țării noastre, toxemia de gestație a oilor poate fi considerată o veritabilă cetoză de subnutriție primară.

2. In ultima perioadă a gestației, declanşarea bolii este favorizată de diferite stări de stres fizic şi psihic particulare gestației gemelare sau a gestației cu fetuşi multipli.

3. În efectivul investigat, în cursul episodului de evoluție a bolii au fost afectate circa 60 de oi mame, din care 14 au murit, iar la celelalte s-au înregistrat avorturi, fătări de miei gemeni neviabili, iar cei care au supraviețuit au rămas tarați.

4. Tabloul clinic s-a caracterizat prin semnele cetoacidozei, cu inapetență, semne nervoase şi stări comatoase.

5. Examinând probele de urină cu teste rapide de diagnostic, am constatat prezența corpilor cetonici.

6. Prezența leziunilor degenerative în ficat au relevat evoluția morfoclinică a cazuisticii din episodul relaltat, alături de avorturi, mortalități la oi şi miei.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Adameşteanu, I., Adameşteanu, C., Bârză, H., Paraipan, V., Blidaru, T. (1980). Diagnostic morfoclinic veterinar pe specii şi sindroame, Editura Ceres, Bucureşti.
2. Baba, Al.I. (1996). Diagnostic necropsic veterinar. Editura ALL, Bucureşti,
3. Constantin, N. (1995). Fiziologie veterinară comparată, vol.I, Editura Coral Sanivet, Bucureşti,
4. Curcă, D. (2004). Fiziopatologie generală. Editura Printech, Bucureşti.
5. Ghergariu, S. (1994). Patologia nutrițională şi metabolică a animalelor, vol II Bucureşti.
6. Ghergariu, S., Pop, A., Kodar, L. (1998). Ghid de laborator clinic veterinar, Editura ALL, Bucureşti.
7. Ioniță L. (2008). Patologie şi Clinică Medicală Veterinară. Vol II Editura Sitech.
8. López Mendez, S. Alonso Díez, A.J. Prieto Montañés, F. González Montaña, J.R. (2001). Toxemia de la gestación ovina: tratamiento con glucosa por vía oral. Datos preliminares. XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Sevilla, 20-22 de Septiembre.
9. Pârvu, Gh. (1992). Supravegherea nutrițional-metabolică a animalelor, Editura Ceres, Bucureşti.
10. Popa, V.V., Vlăgioiu, C. (1996). Metodologia examinării medicale la animale. Editura Ceres, Bucureşti.
11. Radostits, O.M., Blood, D.C., Gay, C.C. (1994). Veterinary Medicine. ed. 8th Ed. Baillere Tindal Philadelphia.
12. Schlumbohm, C, Harmeyer, J. (2003). Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. Journal of Dairy Science 6, 1.
13. Schlumbohm, C., Harmeyer, J. (2004). Hyperketonemia Impairs Glucose Metabolism in Pregnant and Nonpregnant Ewes. Journal of Dairy Science. 2, 1.
14. Van Saun, R.J. (2000) Pregnancy toxemia in a flock of sheep. JAVMA 217, 10, 1536-1539.
15. XXXXX (2005). Textbook of Veterinary Internal Medicine, 6th Edition, Ettinger, Feldman.

CLINICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON *THEILERIA ANNULATA* IN EGYPTIAN BUFFALOES (BUBALUS BUBALIS) WITH PARTICULAR ORIENTATION TO OXIDATIVE STRESS AND KETOSIS RELATIONSHIP

WAEL M. EL-DEEB, EMAD E. YOUNIS,
Department of internal medicine and infectious disease
Faculty of veterinary medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt.
drwaeleldeeb@yahoo.com

This study was carried out on 68 theileria annulata naturally infected buffaloes in addition to 25 parsitologically free buffaloes distributed in small herds at Dakahlia and Gharbya governorates, Egypt to demonstrate the clinical picture associated with theileriosis in this buffaloes with particular emphasis to the oxidative stress and ketosis relationship. Clinical signs recorded in infected buffaloes were in the form of fever, enlargement of one or more lymph node, ocular discharge, corneal opacity, skin lesions, decreased milk yield, pale mucous membrane and anorexia. Blood and serum analysis revealed significant decrease in RBCS and or HB concentration in infected animals compared to control ones. Moreover, a significant increase (p≤ 0.05) in the levels of Malondialdehyde (MDA), beta hydroxy butric acid (BHBA) and non esterified free fatty acid (NEFA) with a significant decrease (p≤ 0.05) in the levels of reduced glutathione (R.GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAC), nitric oxide (NO), glucose and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in infected animals compared to control ones. It can be concluded that theileria annulata play an imperative task in the occurrence of anemia, oxidative stress and ketosis in Egyptian Water Buffaloes.

Key words: Theileria, oxidative stress, antioxidants, buffaloes, ketosis

Theileria annulata, a protozoan parasite of cattle and domestic buffaloes, is transmitted by ticks of the genus *Hyalomma*, and causes a disease named Mediterranean or tropical theileriosis. It represents a major threat to Egyptian water buffaloes, where it causes significant economic losses as well as reduced production. There are some evidences that oxidative stress and lipid peroxidation incorporate in the pathogenesis of anemia in theileriosis. Lipid peroxidation is a general mechanism where by free radicals induces tissue damages, and implicated under several diverse pathological conditions **(Halliwell and Gutteridge, 1999; Knight, 1995).** Malondialdehyde (MDA), an end product of polyunsaturated fatty acid oxygenation, is a reliable and commonly used biomarker for assessing lipid peroxidation **(Moore and Roberts, 1998).** Recently there has been growing interest in the use of MDA as a marker of lipid peroxidation in various kinds of diseases **(Sheu et al., 2003).**

Grewal et al., (2005) showed an increased in oxidative stress and lipid peroxidation in erythrocytes of cattle infected with *T. annulata*. They concluded that this might be the cause of increased erythrocyte fragility and membrane lysis. Recently, it has been documented that the levels of methemoglobin, used as an index of erythrocytes oxidation, markedly increase at the onset of anemia in experimental *Theileria sergenti* infection **(Shiono et al., 2003a)** and an inverse relationship has been observed between methemoglobin levels and PCV **(Shiono et al., 2001).** In addition, increased oxidation of proteins in the membrane of erythrocytes at the advanced stage of anemia in *T. sergenti*-infected cattle has been reported **(Yagi et al., 2002). Shiono et al., (2003b)** indicated that the levels of antioxidants in RBC decreased during the progression of anemia in cattle infected with T. sergenti. They suggested that oxidative damage of RBC has a close relationship with the onset of anemia in bovine theileriosis. These results strongly support the hypothesis that oxidative changes in erythrocytes are closely related to the pathogenesis of anemia in theileriosis.

Diagnosis of *Theileria annulata* infection in buffaloes on the basis of clinical signs is difficult due to the wide variety in the clinical picture of the disease that may be mistaken with other diseases. Stained thin Blood film and lymph node smears are accepted as a method of laboratory diagnosis in cattle and buffaloes **(Ramazan and Ugur, 2006)** However, expertise in piroplasm

microscopy is required in subclinical or chronic infection because parasitaemias are often extremely low and may otherwise be missed **(Aktas et al. 2006)**.

The prevalence of *theileria annulata* infection in Egyptian buffaloes is high and there was a different clinical picture that may be mistaken with other diseases. So, this study is aimed to throw the light on the clinical picture with special reference to oxidative stress and ketotic state of such infection.

MATERIAL AND METHODS

Animals

This study was carried out in Dakahlia and Gharbya governorates, Egypt on 68 water buffaloes located in small groups and in contact with cattle. In addition, 25 parasitologically free ones located in the same area and under the same level of nutrition and hygiene were used as a control group. Infected buffaloes were selected on the basis of clinical examination and positive blood and or lymph node smears.

Clinical examination:

Clinical examination was performed on all animals. The signs of *Theileria annulata* infection were observed and recorded. Thin blood smears were prepared from the ear veins of all animals. Lymph node aspirates were collected from suspected cases suffered from enlarged superficial lymph nodes.

Sampling protocol:

All animals under study were subjected to ear vein puncture and lymph node aspiration. Blood samples were collected from all infected buffaloes and parasitologically free control one through jugular vein puncture, in tubes contaminated ethylenediamine-tetraacetic acid dipotassium salt (EDTA-K2) for routine blood tests and into heparinized glass-stoppered tubes for other analysis (Schalm et al., 1986).

MDA estimation

MDA levels were estimated using commercially available test kits according to the methods described by **Satoh, (1978) and Okawa et al., (1979).**

BHBA and NEFA,

BHBA and NEFA were carried out using commercially available test kits according to the methods described by **Tietz, (1999).**

Superoxide dismutase (SOD)

The activity of SOD was carried out using commercially available test kits according to the method described by **Nishikimi et al., (1972).**

Reduced glutathione (R.GSH)

The activity of R.GSH was carried out using commercially available test kits according to the method described by **Beutler et al., (1963).**

Glucose-6-phosphate dehydrogenase

The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was determined spectrophotometrically according to the method described by **Beutler et al., (1984).**

Glucose levels

The glucose levels were estimated using commercially available test kits according to the method described by **Young, (2001).**

Catalase (CAT)

The activity of CAT was carried out using commercially available test kits according to the method described by **Aebi, (1984).**

Nitric oxide (NO)

The activity of NO was carried out using commercially available test kits according to the method described by **Montgomery and Dymock (1961)**

Total antioxidant capacity (TAC)

The activity of TAC was carried out using commercially available test kits according to the method described by **Koracevic et al., (2001)**

Statistical analysis:

The obtained data was analyzed using student t-test according to the method described by **Snedecor and Cochran (1989).**

RESULTS AND DISCUSSION

The obtained data showed that the clinical signs of theileriosis in Egyptian water buffaloes were fever, superficial lymph node enlargement (figure 3), lacrimation, respiratory manifestations, anorexia, skin lesion (figure 4), diarrhea, corneal opacity (figure 1&2), nasal discharge, pale mucous membrane, and decreased milk production (Table 1). These clinical signs are in concern with those obtained by **Al-Gaabary (1991) and Osman and AL-Gaabary (2007).**

Figure (1): Corneal opacity 1

Figure (2): Corneal opacity 2

Figure (3): Enlarged lymph node

Figure (4): Skin lesion

Hematological examination (Table 2) revealed significant decrease ***(p≤ 0.05)*** in the Hb content, PCV%, RBCs and WBCs counts in the diseased buffaloes compared to the control ones. Neutropenia, eosinopenia, lymphopenia, monocytopenia with a significant increase ***(p≤ 0.05)*** in the numbers of thrompocytes were recorded. These results are in agreement with those obtained by **Osman and AL-Gaabary (2007)**.

Table (1) Percentage of different clinical signs in Theileria annulata infected buffaloes

The clinical picture	Number of affected animals/total diseased number	%
Fever	68/68	100%
Enlarged lymph node	68/68	100%
Lacrimation	18/68	26.47%
Respiratory manifestation	18/68	26.47%
Anorexia	68/68	100%
Skin lesion	2/68	0.3%
Diarrhea	5/68	0.7%
Corneal opacity	25/68	36.7%
Nasal discharge	6/68	0.8%
Pale mucous membrane	68/68	100%
Decreased milk	18/68	26.47%

Table (2) Blood picture in Theileria annulata free and infected buffaloes:

Variable	Parasitologically healthy buffalloes (No = 25)	Infected buffaloes (No = 68)
Hb gm/dl	12.36 ± 0.29	5.2 ± 0.18*
RBCs (10^6/µl)	9.48 ± 0.13	5.82 ± 0.21*
PCV%	38.49 ± 0.042	27.11 ± 0.169*
TLC(10^3/ul-1)	8.65 ± 0.34	5.46 ± 0.33*
Neutrophils (10^3/µl-1)	2.8 ± 0.018	2.2 ± 0.047*
Basophiles ($10^3/\mu l^{-1}$)	0.0128 ± 0.0001	0.0128 ± 0.0001
Eosinophils ($10^3/\mu l^{-1}$)	0.98 ± 0.10	0.145 ± 0.0003*
Lymphocytes ($10^3/\mu l^{-1}$)	3.78 ± 0.025	2.72 ± 0.028*
Monocytes ($10^3/\mu l^{-1}$)	0.39 ± 0.001	0.35 ± 0.002*
Thrombocytes ($10^3/\mu l^{-1}$)	277.25 ± 2.4	177.8 ± 3.2*

*****Means are significantly different at the level (p≤ 0.05).

According to **Stockham et al., (2001) and Omer et al., (2002)** the decrease in RBC could be due to increased levels of activated complement products. Additionally, since oxidised erythrocytes may be destroyed easily by erythropagocytosis, oxygen radicals may also be involved in the pathogenesis of the resultant anemia **(Clark et al., 1986, Mbassa et al., 1994, and Yagi et al., 2002).**

Moreover erythrophagocytosis due to an immune-mediated mechanism might be responsible for the erythrocyte destruction **(Uilenberg 1981).** Removal of piroplasm infected erythrocytes by macrophages in the organs of the reticulo-endothelial system has been suggested as a cause of anemia **(Campbell and Spooner, 1999, and Singh et al., 2001).** In addition, pro-inflammatory cytokines, particularly TNF-a, have been implicated in mediating anemia associated with tropical theileriosis **(Forsyth et al., 1999, and Graham et al., 2001).**

Some researchers demonstrated that leucocyte counts in cattle increased immediately following theileria infection and then significantly decreased within several days **(Can et al., 1980, Mehta et al., 1988 and Sandhu et al., 1998).** *T. annulata* induced leucopoenia in cattle which mainly mediated by TNF-a **(Forsyth et al., 1999).** This decrease is related to the destruction of lymphocytes in lymphoid organs and infiltration of these cells into various organs **(Sandhu et al., 1998 and Omer et al., 2002).**

In this study, significant decrease ***(p≤ 0.05)*** was recorded in neutrophil, eosinophil, and lymphocyte counts in *T. annulata* infected buffaloes compared to those in the control ones. Similar findings were reported by **Omer et al., (2002)** in cattle and **Osman and AL-Gaabary (2007)** in

buffaloes. However, non significant difference in absolute basophil and monocyte counts between healthy and infected cattle was recorded by **Omer et al., (2002)**, significant decrease in monocyte counts was recorded in our study. This variation could be attributed to differences in the stage and severity of the disease.

Significant increase ***(p≤ 0.05)*** in the levels of MDA in theileria annulata infected water buffaloes compared with healthy buffaloes. In contrast, there were a significant reduction ***(p≤ 0.05)*** in the levels of NO, R.GSH, SOD, CAT, and TAC in *Theileria annulata* infected buffaloes compared with healthy buffaloes (Table 3). According to authors knowledge there is no available data concerning these levels in Egyptian water buffaloes. But some of these levels were estimated in cattle by **Rezaei and Dalir-Naghadeh, (2006).**

Table (3) Levels of oxidants and antioxidants in Theileria annulata free and infected buffaloes::

Variable	Parasitologically healthy buffalloes (No = 25)	Infected buffaloes (No = 68)
MDA (*nmmol/g Hb*)	24.68 ± 0.19	104.45 ± 2.16*
NO *(mmol/ml)*	25.8 ± 0.24	18.78 ± 0.21*
R.GSH *(mmol/L)*	7.23 ± 0.21	2.85 ± 0.23*
SOD *(u/g Hb)*	9.24 ± 0.1	6.37 ± 0.07*
CAT *(u/ml)*	2.69 ± 0.02	0.96 ± 0.03*
TAC *(mmol/L)*	1.46 ± 0.011	0.62 ± 0.03*

*Means are significantly different at the level (p≤ 0.05).

Increased MDA concentration with decreased levels of NO, R.GSH, SOD, CAT, and TAC in affected buffaloes may be an indication of elevated oxidative stress in theileriosis. Oxidative stress results when the production of the free radicals and reactive metabolites of oxygen exceeds their safe disposal by antioxidant mechanisms. Free oxygen radicals cause lipid peroxidation and gave MDA as the end product. Determination of MDA is the mirror for the degree of lipid peroxidation and level of free oxygen radicals indirectly (Esterbauer, 1996; Yagi, 1998; Owen, 1996). The erythrocytes membrane is rich in polyunsaturated fatty acids, a primary target for reactions involving free radicals, and is very susceptible to lipid peroxidation (May et al., 1998; Devasena et al., 2001).

Similar finding had been reported in theileriosis caused by T. sergenti. Shiono et al. (2003a) reported that the levels of MDA began to increase remarkably in proportion to the decrease of packed cell volume and increase of parasitemia in T. sergenti infected cattle during the onset of anemia. During the serious stage of anemia, this oxidative index reached to its maximumvalue. They concluded that oxidative damage to the RBCs might play an important role in the pathogenesis of anemia in bovine theileriosis. Moreover similar picture was previously reported in cattle by Rezaei and Dalir-Naghadeh, (2006). Based on our results, same pathogenic mechanism may also be involved in case of tropical theileriosis in Egyptian buffaloes.

The significant decrease in the activity of G6PD in affected buffaloes suffering from severe anemia is an indicator of a metabolic disturbance in the erythrocytes. This enzyme has a key role in the pentose phosphate pathway, which has critical significance in the survival of erythrocytes (Beutler, 1984). G6PD enzyme is the principal source of NADPH, which helps in maintaining glutathione in the reduced state, thus protecting erythrocytes from oxidative stress. G6PD serves as an antioxidant enzyme, and decreased activity of G6PD has been associated with increased hemolysis in buffaloes affected with theileriosis (Singari et al., 1991) and increased oxidative stress in endothelial cells (Leopold et al., 2003).

Our results revealed significant decrease (p≤ 0.05) in G6PD activities. This result differs from that reported by Grewal et al., (2005) who reported a significant increase in the activity of this enzyme in cattle naturally infected with T. annulata. He referred this increase to a safeguard mechanism to protect the erythrocytes from oxidative stress in response to increased lipid peroxidation in erythrocytes. The variation of the G6PD activities might be related to the severity of

the anemia. Decreased G6PD activity can be followed by reduced activities of SOD and GSH, because of dependence of the activities of these enzymes to NADPH + H levels in the cell.

In concurrence with Agar and Board (1983) we also found a direct relationship between erythrocyte G6PD activity and the activities of R.GSH and SOD in infected buffaloes Also to be considered was the significant decrease in the levels of R.GSH in affected buffaloes, which is in agreement with the findings of Ozan and coworkers (1999) in cattle naturally infected with T. annulata. On the other hand, Grewal et al. (2005) Grewal et al., (2005) reported a significant rise in the activity GSH-Px in infected cattle. GSH-Px activity is a major mechanism for intracellular decomposition of lipid peroxides (Christophersen, 1966; Flohe, 1971). Hafeman et al., (1974) also proposed that GSH-Px played a crucial role in preventing membranes from peroxide damage induced by lipid peroxides. Reduced glutathione is required for the disposal of H_2O_2 from erythrocytes by a reaction catalyzed by GSH-Px. This reaction is important because accumulation of H_2O_2 might decrease the lifespan of erythrocytes by increasing the rate of oxidation of hemoglobin to methemoglobin (Winterbourn, 1985).

According to the results of this study, catalase levels were significantly decreased ($p \leq 0.05$) in affected buffaloes. It has been reported that catalase is of equal importance to GSH-Px in the defense of human erythrocytes against H_2O_2 generating reactions (Harvey, 1989).

Evaluation of SOD levels in affected buffaloes showed a significant ($p \leq 0.05$) reduction compared to control ones. Reduced SOD levels were accompanied by decreased G6PD activity in infected erythrocytes. It appears that, during theileriosis, SOD similar to GSH, plays an important role in protection of erythrocytes against oxidative stress. Similar findings were reported in other parasitic infections. It has been reported that Plasmodium infected erythrocytes show decreased capacity of their antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (Friedman, 1979; Wozencraft, 1986; Erel et al., 1997), catalase, glutathione peroxidase (Greve et al., 1999), G6PD (Roth et al., 1988), methemoglobin reductase (Stocker et al., 1985) and antioxidant substances such as Vitamin E (Griffiths et al., 2001). Moreover there was a significant reduction in the levels of TAC in infected buffaloes. This reduction may be attributed to the reduction in antioxidant enzymes as they consumed by excessive free radicals in the infected animals.

The results revealed a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the levels of glucose in Theileria annulata infected water buffaloes in comparison with clinically healthy buffaloes. Moreover, a significant increase ($p \leq 0.05$) in the levels of NEFA and BHBA in Theileria annulata infected buffaloes in comparison with healthy buffaloes indicating the ketotic state of these cases. According to our knowledge there is no available data concerning the correlation between Theileria annulata and ketosis (Table 4). These results may be attributed to the abnormalities in metabolism and anorexic state of affected buffaloes or may be due to abnormalities in the liver functions.

Table (4) Levels of glucose, BHBA, NEFA and G6PD in Theileria annulata free and infected buffaloes:

Variable	Control (No = 25)	Infected buffaloes (No = 68)
Glucose *(mg/dl)*	63.0 ± 0.6	37.2 ± 2.1*
BHBA (*mmol L-I*)	1.08 ± 0.03	1.9 ± 0.01*
NEFA (*mmol L-I*)	363.6 ± 5.5	536 ± 10.8*
G6PD (u/g Hb)	22.45 ± 0.15	17.28 ± 0.29*

***Means are significantly different at the level ($p \leq 0.05$).**

It could be concluded that Theileria annulata play an imperative task as an anemic, oxidative and ketotic stressor on the Egyptian Buffaloes.

BIBLIOGRAPHY

1. **Aebi, H. (1984):** Methods Enzymol, 105, 121-126.
2. **Agar, N.S., Board, P.G., 1983.** Red Blood Cells of Domestic mammals, first ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 227–270.
3. **Al-Gaabary M.H. (1991)**: studies in theileriosis in cattle and buffaloes. M.V.Sc. Thesis. Department of animal medicine. Faculty of veterinary medicine. Zagazig university.
4. **Asri Rezaei, S. and Dalir-Naghadeh B. (2006):** Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in cattle naturally infected with *Theileria annulata* Veterinary Parasitology 142, 179–186.
5. **Beutler E., Duron, O. And Kelly MB. (1963):** J. Lab. Clin. Med., 61, 882.
6. **Beutler, E., 1984.** Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase (6-PGD), Red cell metabolism. A Manual of Biochemical Methods, third ed. Grune and Startton, Orlando, pp. 68–71.
7. **Campbell, J.D.M., Spooner, R.L. (1999):** Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of immune responses to *Theileria annulata*. Parasitol. Today,; 15: 10-16.
8. **Can, R. (1980): *Theileria annulata* (Dschunkowsky et Luhs, 1904)**Õdan ileri gelen Theileriozis .zerinde klinik patolojik • alõßmalar ve tedavi denemeleri, T.BÜTAK VII. Bilim Kongresi, Üstanbul,**.**
9. **Christophersen, B.O., 1966**. Oxidation of reduced glutathione by sub cellular fractions of rat liver. Biochem. J. 100, 95–101.
10. **Clark, I.A., Hunt, N.H., Cowden, W.B. (1986):** Oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of parasitic disease. Adv. Parasitol.; 25: 1-44.
11. **Devasena, T., lalith, S., Padma, K., 2001.** Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. Clin. Chim. Acta 308, 155–161.
12. **Esterbauer, H., 1996**. Estimation of peroxidative damage. A critical review. Pathol. Biol. (Paris) 44, 25–28.
13. **Flohe, L., 1971.** Glutathione peroxidase: enzymology and biological aspects. Klinische Wocllenschrift 49, 669–683.
14. **Forsyth, L.M.G., Minns, F.C., Kirvar, E., Adamson, R.E., Hall, F.R., McOrist, S., Brown, C.G.D., Preston, P.M**. **(1999**): Tissue damagein cattle infected with *Theileria annulata* accompanied by metastasis of cytokine-producing, schizont-infected mononuclear phagocytes. J. Comp. Pathol.,; 120: 39-57.
15. **Friedman, M.I., 1979.** Oxygen damage mediates variant red cell resistance to malaria. Nature 280, 245–247.
16. **Graham, S.P., Brown, D.J., Vatansever, Z., Waddington, D., Taylor, L.H., Nichani, A.K., Campbell, J.D.M., Adamson, R.E., Glass, E.J., Spooner, R.L**. **(2001)**: Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause in vivo, Vaccine.**;** 19: 2932-2944.
17. **Grewal, A., Ahuja, C.S., Singha, S.P.S., Chaudhary, K.C., 2005**. Status of lipid peroxidation, some antioxidant enzymes and erythrocyte fragility of crossbred cattle naturally infected with Theileria annulata. Vet. Res. Commun. 29, 387–394.
18. **Griffiths, M.J., Ndungu, F., Baird, K.L., Muller, D.P., Marsh, K., Newton, C.R.J.C., 2001.** Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe Plasmodium falciparum malaria. Br. J. Haematol. 113, 486–491.
19. **Hafeman, D.G., Sunde, R.A., Hoekstra, W.G., 1974**. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in rat. J. Nutr. 104, 580–587.
20. **Haider, M.J., 1992.** Hematological study of water buffalo (Bubalus bubalis) during theileriosis (T. annulata). Ann. NYAcad. Sci. 653, 191–193.
21. **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999**. Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford University Press, New York, pp. 936.
22. **Knight, J.A., 1995.** Diseases related to oxygen-derived free radicals. Ann. Clin. Lab. 25, 111–121.
23. **Koracevic D., Koracevic G. et al., (2001):** J. Clin. Pathol. 54, 356-361.
24. **Leopold, l.A., Zhang,Y.Y., Scribner, A.W., Stanton, R.C., Loscalzo, I., 2003.** Glucose-6-phosphatedehydrogenase over expression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23, 411–417.
25. **May, J.M., Qu, Z.C., Mendiratta, S., 1998**. Protection and recycling of alfa-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. Arch. Biochem. Biophys. 349, 281–289.
26. **Mbassa, G.K., Balemba, O., Maselle, R.M., Mwaga, N.V. (1994):** Severe anaemia due to haematopoietic precursor cell destruction in field cases of East Coast Fever in Tanzania. Vet. Parasitol.,; 52: 243-256.
27. **Mehta, H.K., Sisodia, R.S., Misraulia, K.S.:** Clinical and haematological observations in experimentally induced cases of bovine tropical theileriosis. Indian J. Anim. Sci., **1988**; 58: 584-587.
28. **Montgomery H. A. and Dymock J. F. (1961):** Analyst, 86, 414
29. **Moore, K., Roberts, L.J., 1998**. Measurement of lipid peroxidation. Free Radic. Res. 28, 659–671.
30. **Nishikimi M., Roa NA, and Yogi K., (1972):** Biochem. Bioph. Res. Common., 46, 849-854.
31. **Okawa H. Ohishi W, and Yagi K. (1979):** Biochem. 95, 351.
32. **Omer, O.H., El-Malik, K.H., Mahmoud, O.M., Haroun, E.M., Hawas, A., Sweeney, D., Magzoub, M., 2002**. Haematological profiles in pure bred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. Vet. Parasitol. 107, 161–168.
33. **Omer, O.H., El-Malik, K.H., Mahmoud, O.M., Haroun, E.M., Hawas, A., Sweeney, D., Magzoub, M. (2002):** Haematological profiles in pure bred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. Vet. Parasitol.,**;** 107: 161-168. Haematological and Coagulation Profiles during Severe Tropical Theileriosis in Buffaloes, 582.

34. **Owen T. 1996.** Fundamentals of modern UV–vis. spectroscopy. Hewlett-Packard Publication no. 12, 5965-5123E.
35. **Ozan, S.T., Yaralioglu, S., Yilmaz, S., Ozer, E., Saki, C.E., Segili, M., 1999.** GSH-Px, G6PD and arginase activities and some biochemical parameters in cattle infected with Theileria annulata. Tr. J. Vet. Anim. Sci. 23, 553–557.
36. **Ramazan C., and Ugur U., (2006):** Haematological and Coagulation Profiles during Severe Tropical Theileriosis in Buffaloes. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 30, 577-582.
37. **Roth Jr, E.F., Calvin, M.C., Max-Audit, I., Rosa, J., Rosa, R., 1988.** The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with Plasmodium falciparum malaria parasites. Blood 72, 1922–1925.
38. **Osman, S.A. and AL-Gaabary, M.H.(2007):** Clinical, haematological and therapeutic studies on tropical theileriosis in water buffaloes (Bulbalus bulbalis) in Egypt. Veterinary paracytology, 146, 337-340.
39. **Sandhu, G.S., Grewal, A.S., Singh, A., Kondal, J.K., Singh, J., Brar, R.S. (1998**): Haematological and biochemical studies on experimental *Theileria annulata* infection in crossbred calves. Vet. Res. Commun.,**;** 22: 347-354.
40. **Satoh, (1978):** Clinca Chimica Acta, 90, 37.
41. **Schalm, O.W., Jain, N.C., Carroll, E.J., 1986**. Veterinary hematology, third ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 20–86.
42. **Sendecor, G. W. and Cochran, P. W. (1989):** Statistical methods, 8th ed. Lowa state University, Press, Ames, I. A.
43. **Sheu, J.Y., Ku, H.P., Tseng,W.C., Chen, M.T., Tsai, L.Y., Huang, Y.L., 2003.** Determination of thiobarbituric acid adduct of Malondialdehyde using on-line microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography. Anal. Sci. 19, 621–624.
44. **Shiono, H., Yagi, Y., Chikayama, Y., Miyazaki, S., Nakamura, I., 2003a.** The influence of oxidative bursts of phagocytes on red blood cell oxidation in anemic cattle infected with Theileria sergenti. Free Radic. Res. 37, 1181–1189.
45. **Shiono, H., Yagi, Y., Chikayama, Y., Miyazaki, S., Nakamura, I., 2003b.** Oxidative damage and phosphatidylserine expression of red blood cells in cattle experimentally infected with Theileria sergenti. Parasitol. Res. 89 (3), 228–234.
46. **Shiono, H., Yagi, Y., Thongnoon, P., Kurabayashi, N., Chikayama, Y., Miyazaki, S., Nakamura, I., 2001.** Acquired methemoglobinemia in anemic cattle infected with Theileria sergenti. Vet. Parasitol. 102, 45–51.
47. **Singari, N.A., Bhardwaj, R.M., Chugh, S.K., Bhardwaj, S., 1991.** Status of erythrocytic glucose-6-phosphate-dehydrogenase in phosphorus deficiency haemoglobinuria of buffaloes. Vet. J. 68, 226–230.
48. **Singh, A., Singh, J., Grewal, A.S., Brar, R.S. (2001):** Studies on some blood parameters of crossbred calves with experimental *Theileria annulata* infections. Vet. Res. Commun.,; 25: 289-300.
49. **Stockham, S.L., Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., Schmidt, D.A., Scott, M.A., Robinson, T.W., Tyler, J.W., Johnson, G.C., Carson, C.A., Cuddihee, P. (2000):** Theileriosis in a Missouri beef herd caused by Theileria buffeli: case report, herd investigation, ultrastructure, phylogenetic analysis, and experimental transmission. Vet. Pathol.,; 37: 11-21.
50. **Tietz N. W. (1999):** Text book of clinical chemistry, W. B. Saunders Co., Philadelphia.
51. **Uilenberg, G. (1981):** Theileria infections other than east coast fever. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.,; 6: 411-427.
52. **Yagi, Y., Thongnoon, P., Shiono, H., Chikayama, Y. (2002**): Increase in oxidized proteins in Theileria sergenti-infected erythrocyte membrane. J. Vet. Med. Sci.,**;** 64: 623-625.
53. **Yagi, Y., Thongnoon, P., Shiono, H., Chikayama, Y., (2002)**: Increase in oxidized proteins in Theileria sergenti-infected erythrocyte membrane. J. Vet. Med. Sci. 64, 623–625.
54. **Young D. S. (2001)**: Effects of disease on clinical lab. 4th ed. AACC.

Secţiunea Producţii Animaliere şi Sănătate Publică

DETERMINAREA REZIDUURILOR DE STREPTOMICINA DIN MIERE, PRIN TESTUL IMUNOENZIMATIC ELISA.

DETERMINATION OF STREPTOMYCIN RESIDUES IN HONEY BY ENZYME IMMUNOASSAY TEST, ELISA

ABAITANCEI CRAITA[1] , COMAN I.[2] , TARCA FELICIA[1] , ZISU CORINA[1]
[1]DSVSA Iasi, Laboratorul Sanitar Veterinar Iasi
USAMV Iasi, Facultatea de Medicina Veterinara
a_craita @ yahoo.com

Streptomycin and si dihydrostreptomycin belong to the aminoglycosides group of antibiotics. All the aminoglycosides are potential toxic compounds affecting the vestibular and the auditory function both in human and animal subjects. Regardless of that negative aspect this group of antibiotics are widely used because of their antibacterial and antifungal activity. When the recomended withdrawl time are not respected or the antibiotics are improper used, the risk of apearing streptomycine residues in food is significantly icreased. Higher concentrations of streptomycine can have ototoxic and nefrotoxic effects, while lower concentrations may lead to alergies, disorders of the intestinal flora and to the development of antibiotic resistant pathogens.

The purpose of this study was the identification and evaluation of the streptomycine residues in honey samples collected between 2005 and 2008, from several counties from Moldova region.

The results of the study showed 5 samples presumed to contain streptomycine out of 59 analysed during the mentioned period of time.

Key words : streptomycine, residues, honey, ELISA

MATERIAL SI METODA

S-au utilizat kituri ELISA produse de R-Biopharm (Germania), articol nr. R3101 avand urmatoarea compozitie:

- 1 x placa de microtitrare cu 96 de godeuri (12 stripuri a cate 8 godeuri detasabile)
- 6 x standarde concentrate de streptomicina, 1.3 ml fiecare. 0 ppb, 5 ppb, 20 ppb, 80 ppb, 320 ppb, 1280 ppb streptomicina.
- 1 x conjugat (0.7 ml), streptomicina conjugata cu peroxidaza, concentrat (dop rosu)
- 1 x anticorpi anti-streptomicina (0.7 ml), concentrat (dop negru)
- 1 x substrat (7 ml), contine peroxid de uree (dop verde)
- 1 x cromogen (7 ml), contine tetrametilbenzidina (dop albastru)
- 1 x solutie de stopare (14 ml) contine acid sulfuric 1 N
- 1 x buffer (60 ml) folosit pentru dilutia standardelor, probei, conugatului.

- standard de streptomicina (Sigma, SUA)
- tampon de extractie, continand: acid heptan -sulfonic (sare de sodiu) (Merck, Germania), fosfat trisodic dodecahidrat (Na_3PO_4 x 12 H_2O) (Merck, Germania), acid o-fosforic – pentru ajustarea pH-ului la 2 (MERCK, Germania).
- tampon PBS, continand: fosfat monosodic monohidrat (NaH_2PO_4 x H_2O) (Merck, Germania), fosfat disodic dihidrat (Na_2PO_4 x 2 H_2O) (Merck, Germania), clorura de sodiu (Merck, Germania);
- metanol (Merck, Germania);
- apa distilata.

Echipamente necesare:

- Activitatea enzimatica a fost masurata cu un cititor de microplaci tip V – max, produs de Molecular Device Co (SUA)
- Sistem de purificare in faza solida si coloane C18, 100 mg
- Rotavapor tip Laborota 6300.
- Centrifuga tip Hettich Rotofix

Investigatiile s-au facut pe 19 probe de miere in 2005, 17 probe in 2006, 11 probe in 2007, 12 probe in 2008.

Toate probele luate in studiu au provenit din 4 judete ale Moldovei.

Recoltarea si pregatirea probelor pentru efectuarea analizelor s-a facut in conformitate cu normele sanitare veterinare in vigoare

Procedura de lucru:

- se dilueaza mierea cu tampon de extractie: 1 g de miere se aduce la 10 ml cu solutie tampon;
- se agita 10 minute pana la dizolvarea completa a mierii
- se centrifugheaza pana cand solutia este limpede: aprox. 10 minute /3000 g/ temperatura camerei (20 – 25 °C)
- Se purifica extractul pe coloane RIDA C 18:
  - se clateste coloana cu 2 ml metanol (100%) si 2 ml apa distilata
  - se aplica 5 ml din extractul de proba si se impinge usor (aprox. 15 picaturi/min)
  - se clateste coloana cu 3 ml apa distilata
  - se indeparteaza excesul de lichid prin trecerea unui curent de aer sau azot prin coloana timp de 2 minute
  - se elueaza proba incet cu 1 ml metanol (100%) (aprox. 15 picaturi/min)
  - se evapora eluatul pana la uscarea completa la 40 – 50 °C, sub curent slab de aer sau de azot
- se preia reziduul uscat cu 10 ml tampon PBS
- se folosesc 50 µl per godeu pentru analiza.

Testul ELISA propriu-zis:

- Se reconstituie reagentii concentrati furnizati in kit (standarde, anticorpi, conjugat enzimatic);
- Se pregatesc un numar de godeuri suficient pentru standarde si pentru probe ;
- Se adauga 50 µl din fiecare solutie standard sau proba extrasa conform metodei de lucru. Se adauga cate 50 µl conjugat in fiecare godeu;
- Se adauga 50 µl anticorp diluat in fiecare godeu, agitati usor prin miscarea placutei inainte si inapoi si incubati 2 ore la temperatura camerei. (20 – 25 °C);
- Se indeparteaza lichidul din godeuri si se loveste usor placuta de hartie de filtru (de trei ori) pentru a asigura indepartarea eficienta a lichidului din godeuri. Se umplu godeurile cu 250 µl apa distilata si se goleste lichidul din nou. Se repeta de 2 ori.
- Se adauga 50 µl de cromogen in fiecate godeu. Se agita prin miscarea placutei inainte si inapoi timp 30 de minute la temperatura camerei (20 – 25 °C) la intuneric ;
- Se adauga 100 µl de reactiv de stopare in fiecare godeu. Se agita usor manual prin miscarea placutei inainte si inapoi. Se citeste absorbanta la 450 nm fata de un blanck de aer. Se citeste in cel mult 60 minute de la adaugarea solutiei de stopare ;

Curba de calibrare trebuie sa fie liniara in intervalul 2 – 32 ppb (µg/kg). Pentru a obtine concentratia reala de streptomicina din proba se inmulteste concentratia citita de pe curba de

calibrare cu factorul de dilutie corespunzator. Cand se lucreaza conform metodei, factorul de dilutie este 20.

Daca luam in considerare interefernta reactiei cu dihidrostreptomicina, factorul de dilutie devine 14.

Limita inferioara de detectie a testului RIDASCREEN Streptomicina este in jur de 0.5 µg/kg (ppb). Coroborand aceste date oferite de producator cu factorii de dilutie impusi in protocolul de lucru, limitele de detectie vor fi: streptomicina – 20 ppb si dihidrostreptomicina – aprox. 14 ppb

Specificitatea testului RIDASCREEN Streptomicina a fost determinata prin analizarea intereferntei cu diferite antibiotice:

- streptomicina – 100 %;
- dihidrostreptomicina – 149 %;

Eficacitatea prelucrarii probelor si a performantele kitului ELISA se verifica prin intermediul mai multor factori:

- absorbanta pentru standardul zero trebuie sa fie mai mare de 0,6;
- recuperarea in probele fortificate trebuie sa fie de minim 80 % ;
- curba de calibrare trebuie sa fie liniara in domeniul specificat de producator si pentru verificarea acestui aspect se determina coeficientul de corelare. Acesta trebuie sa fie cat mai aproape de1.

REZULTATE SI DISCUTII

In perioada 2005 – 2008 s-au analizat un numar de 59 probe de miere provenite din judetele Iasi, Bacau, Botosani si Suceava, de la producatori particulari.

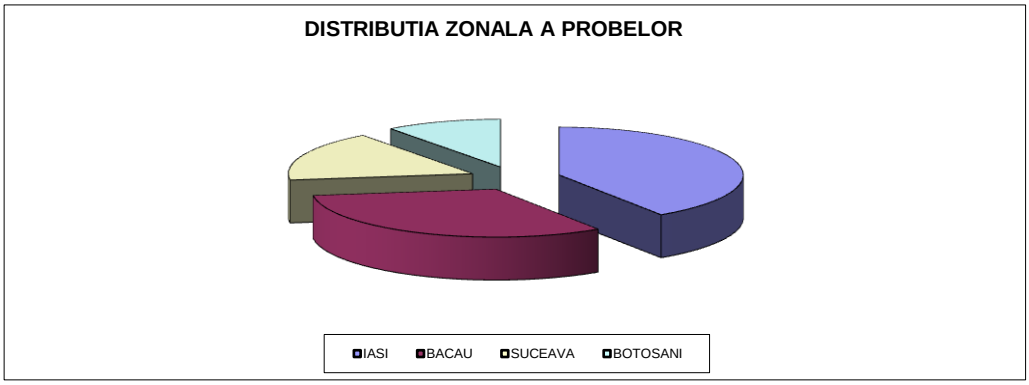


Fig1.Didtributia zonala aprobelor recoltate in perioada 2005-2008

Evaluarea reziduurilor de streptomicina s-a facut la 450nm cu cititorul Molecular Device v max

Procentajul probelor suspecte de contaminare cu streptomicina sunt prezentate in Tabelul nr 1 si Fig nr 2.

Tab.1. Distributia zonala a probelor suspecte din perioada 2005 –2008

Nr.crt.	Judetul de provenienta a probelor	Perioada	Numar total de probe	Numar de probe suspecte	Procentaj total de probe conforme, %
1	Iasi	2005	10	2	91,7
		2006	10	0	
		2007	2	0	
		2008	2	0	
2	Bacau	2005	9	1	89,5
		2006	4	1	
		2007	4	0	
		2008	2	0	
3	Botosani	2005	0	0	100
		2006	0	0	
		2007	2	0	
		2008	4	0	
		2004	0	0	
4	Suceava	2005	0	0	90
		2006	3	1	
		2007	3	0	
		2008	4	0	
5	Total judete	2004-2008	59	5	91,5

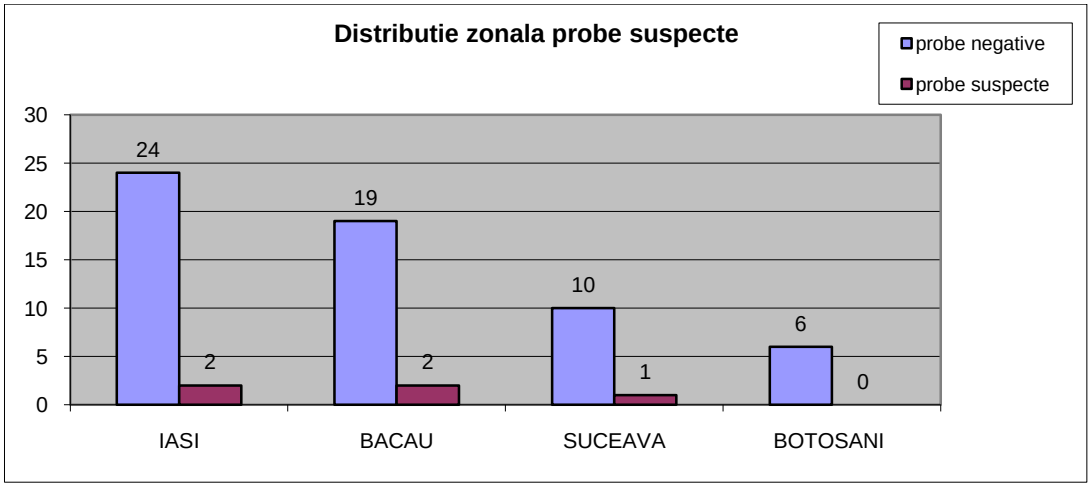


Fig. 2. Distributia zonala a probelor suspecte

CONCLUZII

Studiindu-se repartitia pe ani aprobelor decelate negativ prin testul ELISA s-au obtinut urmatoarele rezultate :

- in anul 2005, 16 probe conforme din cele 19 recoltate, reprezentand un procent de 84,2 % ;
- in anul 2006, din cele 17 probe recoltate ,un numar de15 probe conforme , reprezentand 88.2% din totalul de probe recoltate ;
- in anul 2007 ,din cele 11 probe recoltate, toate s-au dovedit a fi conforme, reprezentand 1005din numarul total de probe.

Din analiza datelor privind procentajele de probe conforme decelate intre anii 2005-2008, se observa o scadere semnificativa a contaminarii potentiale a probelor de miere cu reziduuri de streptomicina , de la 84,2 %si 88,2% in anul 2005si 2006,pentu ca in 2007 si 2008 sa se atinga 100% probe lipsite de reziduuri de strptomicina.

Datele acestea trebuie coroborate si cu re zultatele obtinute in urma derularii testelor de confirmare a prezentei antibioticului de interes in probele definite ca fiind suspecte.

BIBLIOGRAFIE

1. Bogdanov, St.(2003) - Current state of the analytical methods, used for the detection of residues in bee products, TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES, .3,1:19.
2. Renar – Instructiuni pentru validarea metodelor utilizate in laboratoarele de analize medicale, ed.1_0.
3. Ghid Eurachem – The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.
4. SR EN ISO / CEI 17025:2005 – Criterii generale pentru competenta laboratoarelor de incercari si etalonare.
5. Ridascreen Streptomycine.(2007): 3101.R – Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany.

DETERMINAREA REZIDUURILOR DE SULFAMIDE PRIN TESTUL RIA CHARM II

DETECTION OF SULPHONAMIDES RESIDUES IN HONEY BY RIA CHARM II TEST

ABAITANCEI CRAITA[1] , COMAN I.[2] , TARCA FELICIA[1] , ZISU CORINA[1]
[1]DSVSA Iasi, Laboratorul Sanitar Veterinar Iasi
USAMV Iasi, Facultatea de Medicina Veterinara
a_craita @ yahoo.com

Charm II test allows the detection of several types of sulphonamides in honey at levels between 10 and 50 µg/kg. The extraction procedure needs a special attention in order to free the sulphonamides bound to the sugars in honey and to prevent any interferences due to the para-aminobenzoic acid. Charm II test uses a specific receptor so most of the substances belonging to the sulphonamides group can be detected with this analytical method.

The purpose of this study was the identification and evaluation of the solphonamides residues in honey samples collected between 2006 and 2008, from several counties from Moldova region.

The results of the study showed 14 samples presumed to contain different compounds from the sulphonamides group out of 69 analysed during the mentioned period of time. The results of the Charm II test are only orientative and needs to be confirmed with a suitable analytical method.

Key words : sulphonamide, Charm II, honey

MATERIAL SI METODA

a. Kitul Charm II Sulfa Drugs

S-au utilizat kituri RIA CHARM , cod SMIIHH 100, ce contine(1)

- 100 comprimate cu agent de legare specific pentru toata clasa de sulfamide;
- 100 comprimate cu compusul marcat radioactiv;
- tampon de extractie;
- control negativ (care serveste si la reconstituirea martorului pozitiv);
- martor pozitiv (care, dupa reconstituire contine 10 ppb sulfametazina).

b. Other necessary reagents not included in the ELISA kit:

- HCl, solutie 1 M (J.T.Baker) ;
- hidroxid de sodiu, p.a. (Merck, Germania) ;
- Metanol, p.a. (Merck, Germania) ;
- Optifluor, lichid de scintilatie (Perkin Elmer) ;
- Apa distilata

Materiale necesare:

a. Centrifuga Hettich, tip Rotofix;
b. Statie de lucru prevazuta cu agitator tip Maxi Mix ;
c. Incubator Charm;
d. Numarator cu scintilatie, tip Charm II 6600 (Charm Sciences, SUA);

Prelucrarea probelor pentru determinarea reziduurilor de sulfamide presupune o etapa de hidroliza si una de purificare pe coloana, astfel:(2)

- se cantaresc 20 g miere intr-un tub de centrifuga de 50 ml;
- se adauga 30 ml HCl, 1 M si se amesteca bine ;
- se incubeaza la temperatura camerei timp de 1 ora ;
- se ajusteaza pH-ul la 7,7 – 7,8 cu ajutorul unei solutii de NaOH ;

- se filtreaza proba;
- se activeaza 1 coloana C 18 cu 5 ml metanol, urmat de 5 ml apa ;
- se trece proba filtrata pe coloana C18 ;
- se spala coloana cu 5 ml apa ;
- se preia proba cu 2 ml metanol ;
- extractul purificat se aduce la sec ;
- reziduul se rehidateaza cu 1 ml control negativ reconstituit si se dilueaza ulterior cu inca 4 ml control negativ.

Tehnica de lucru:

- intr-o eprubeta de borosilicat se iau 5 ml proba, si se adauga un comprimat cu agentul de legatura ;
- se amesteca bine proba timp de 10 secunde ;
- se adauga apoi comprimatul cu sulfametazina marcata cu tritiu (^3H) si se incubeaza proba la 85 ^oC ;
- proba incubata se centrifugheaza si lichidul decantat se arunca ;
- la reziduul ramas se adauga 300 μl de apa si se amesteca ;
- Dupa omogenizarea solutiei se adauga 3 ml de lichid de scintilatie ;
- Dupa 1 minut de repaos, proba se analizeaza in numaratorul Charm 6600, unde activitatea ^3H se analizeaza timp de 1 minut.

REZULTATE SI DISCUTII

In perioada 2006 – 2008, s-a analizat un numar de 69 probe de miere provenita de la producatori particulari din judetele Iasi, Harghita, Vaslui.

Analizele s-au facut in seturi de cate 4 probe de lucru si 2 de control, pentru o mai mare eficienta a testului analitic. S-au utilizat 4 kituri RIA Charm II, pentru fiecare in parte stabilindu-se punctul de control. S-au obtinut rezultatele ilustrate in tabelul de mai jos.

Tabel 1. Situatia probelor de miere analizate pentru decelarea reziduurilor de sulfamide in perioada 2006 – 2008

Kit Charm numerotat 1 - 4	Punct de control		Numar de probe analizate per kit	Probe prezumtiv pozitive per kit
	Media probelor de control	Punct de control stabilit (media probelor de control + 25 %)		
1	1065	1331,25	13	5
2	989	1236,25	12	3
3	1008	1260	16	2
4	1106	1382,5	28	4

Avand in vedere faptul ca fiecare kit in parte are un punct diferit de control, analiza probelor s-a facut prin impartirea activitatii 3H determinate pentru fiecare proba in parte la punctul de control stabilit pentru kitul cu care s-au lucrat probele respective. Astfel s-au obtinut datele din figura 1. (4;)

Situatia analizelor efectuate in perioada mentionata este ilustrata in tabelul 1 si figurile 2,3 si 4, , probele suspecte necesitand confirmare prin HPLC – FL

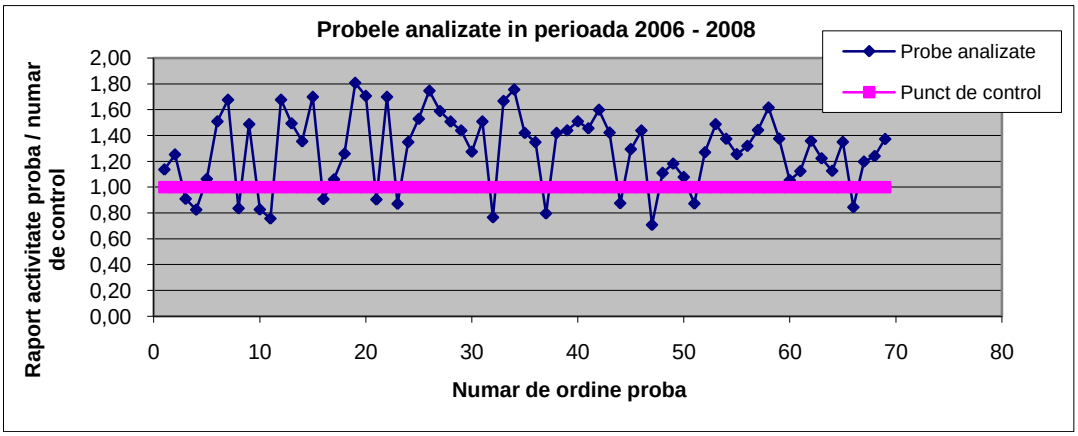


Figura 1.Situatia generala a probelor analizate in perioada 2006 – 2008

Tabel 2. Probele de miere analizate in perioada 2006 – 2008 pentru decelare reziduuri de sulfamide

	2006	2007	2008	Probe prezumtiv pozitive
Iasi	14	10	11	8
Harghita	7	10	5	4
Vaslui	7	5	0	2

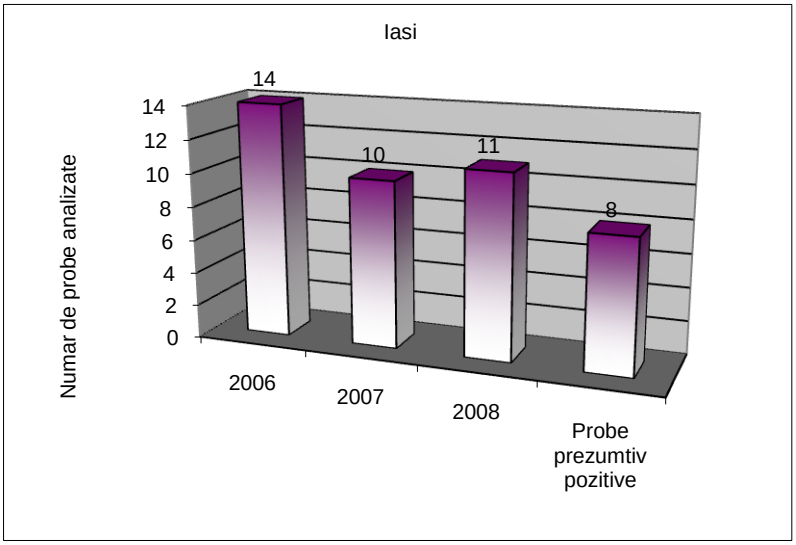


Figura 2. Probe analizate pentru judetul Iasi

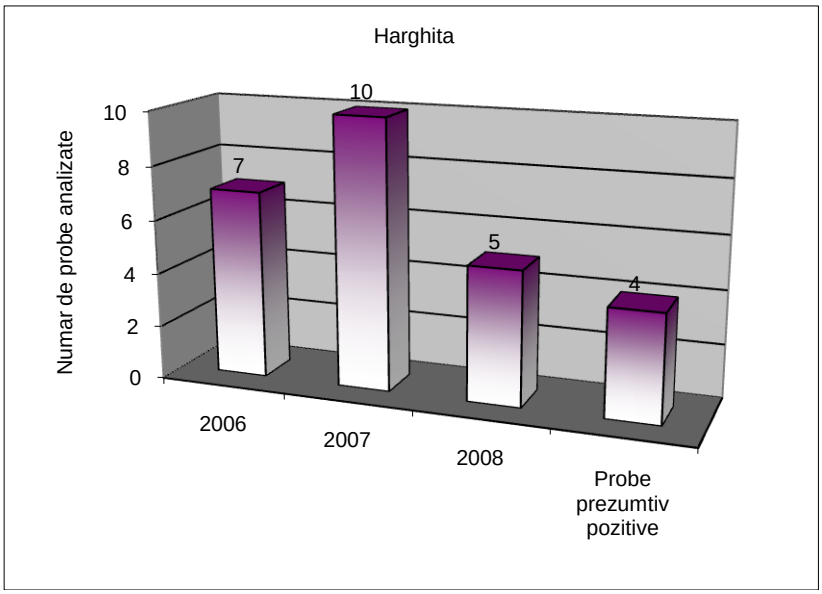


Figura 3. Probe analizate pentru judetul Harghita

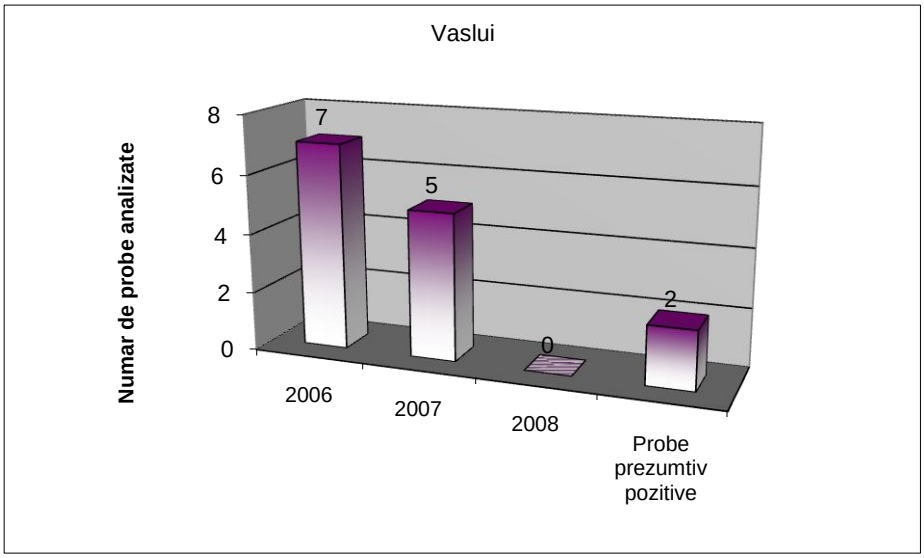


Figura 4. Probe analizate pentru judetul Vaslui

CONCLUZII

Datele obtinute in urma efectuarii testelor Charm II in perioada 2006 – 2008, au condus la urmatoarele concluzii:

Din punct al distributiei zonale a probelor analizate:

1. Judetul Iasi are un procent total de 77 % probe conforme (remarcandu-se insa numarul cel mai mare al probelor recoltate in perioada mentionata);
2. Judetul Harghita are un procent de aproximativ 82 % probe conforme;
3. Judetul Vaslui are un procent de 83 % probe conforme (cu mentiunea faptului ca in anul 2008 nu s-au recoltat probe din acest judet).

Din punct de vedere al distributiei temporale a probelor conforme analizate:

1. anul 2006 – din 28 de probe recoltate, 22 s-au dovedit a fi conforme, adica un procent de 78,6 % din numarul total de probe din anul respectiv
2. anul 2007 – din 25 probe recoltate, 20 s-au dovedit a fi conforme, reprezentand 80 %
3. anul 2008 – din 16 probe recoltate, 15 s-au dovedit a fi conforme, reprezentand 93,7 % din totalul probelor anului respectiv (cu mentiunea ca arealul geografic de pe care s-a efectuat recoltarea este mai mic decat in anii 2006 – 2007).

Din cele expuse mai sus se poate concluziona faptul ca potentiala contaminare a mierii cu reziduuri de sulfamide este in prezent in scadere fata de aniii 2006 si 2007. Rezultatele trebuie insa coroborate si cu datele obtinute in urma etapei de confirmare a probelor prezumtiv pozitive.

BIBLIOGRAFIE

1. Edder, P., Corvi, C., Utilisation du Charm II pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale, Mitt.Lebensm.Hyg. 92 : 218-228, 2001
2. Salter, R – Charm II System – Comprehensive residue analysis system for honey, Apiacta 38, 2003 (198 – 206).
3. Ghid Eurachem – The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics
4. SR EN ISO / CEI 17025:2005 – Criterii generale pentru competenta laboratoarelor de incercari si etalonare.

EVALUAREA NIVELURILOR REZIDURILOR DE NITRAŢI/NITRIŢI ÎN UNELE NUTREŢURI FOLOSITE ÎN ALIMENTAŢIA VACILOR DE LAPTE ŞI POTENŢIALUL LOR TOXIC

EVALUATION OF NITRATE/NITRITE RESIDUE LEVELS IN SOME DAIRY COW FEEDS AND THEIR TOXIC POTENTIAL

ALBU AIDA, ŞINDILAR E.
USAMV Iaşi

The goal of the present work was to evaluate the nitrate/nitrite residue levels in some dairy cow feeds harvested from a dairy cow farm in 2006 year and to assess their potential toxic effects.

The mean values of the residues ranged from 8.49 to 210.94 mg/kg dry matter for nitrates and from 2.49 to 8.86 mg/kg dry matter for nitrites. The analytical results were significantly lower than those showed in literature to have harmful effects to the dairy cows.

Key words: nitrate,nitrite, feed, dairy cows.

Folosirea excesivă a îngrăşămintelor cu azot poate conduce la creşteri ale concentraţiilor de nitraţi şi nitriţi în recolte. Conţinutul de azot absorbit de către plante sub formă de amoniu (NH_4^+) sau nitrat (NO_3^-) depinde de specia, vârsta plantei cultivate, starea solului etc.(13). Nivelul nitraţilor poate creşte sau scădea rapid in plante acumulându-se numai în părţile vegetale ale plantei şi mai puţin în seminţe şi fructe (3, 4).

În mod normal nitraţii absorbiţi din sol de către rădăcinile plantei, sunt transformaţi în ţesuturile acesteia sub formă de aminoacizi, proteine precum şi sub forma altor compuşi ce conţin azot. Când există un exces de azot în sol plantele preiau o cantitate mai mare de N-mineral, iar metabolizarea lui este parţială în azot proteic, diferenţa fiind azotul neproteic acumulat în plante sub formă de nitraţi (8, 14).

Ca şi plantele, animalele folosesc azotul din nitraţi pentru a obţine proteină. Multe specii de animale sunt susceptibile la otrăvirea cu nitraţi şi nitriţi. Rumegătoarele sunt afectate cel mai frecvent, toxicitatea nitraţilor fiind amplificată de acţiunea reducătoare a bacteriilor din rumen prin care sunt transformaţi în nitriţi(care sunt de 8-12 ori mai toxici) (1, 6, 9, 10, 12, 16).

Nitriţii rezultaţi în rumen se absorb în circulaţia sangvină unde se combină cu hemoglobina rezultând methemoglobina, compus chimic stabil, incapabil de a transporta oxigen în ţesuturi (2, 5, 12, 15).

MATERIAL ŞI METODĂ

Investigaţiile s-au efectuat în anul 2006 pe un număr de 60 probe: pajişte naturală, borceag masă verde, lucernă masă verde, iarbă de Sudan masă verde, fân de lucernă, fân natural, siloz de porumb, porumb boabe, tărâţe de grâu, şrot de floarea soarelui, borhot de bere, nutreţ combinat pentru vaci de lapte. Nutreţurile au provenit de la o fermă de vaci de lapte aflată în zona limitrofă a municipiului Iaşi .

Recoltarea şi pregătirea probelor de nutreţuri pentru analiză s-a făcut cu respectarea normelor prevăzute în standardele actuale şi a normelor sanitar veterinare în vigoare.

Determinările s-au realizat prin metoda spectrofotometrică conform SR 13175-93, utilizând ca soluţii pentru dezvoltarea culorii sulfanil amida şi N(naphtyl-1) ethylene diamină. Metoda a constat în dozarea concentraţiei nitriţilor din probă prin măsurarea intensităţii culorii compusului azotic format

în urma reacţiei de diazotare dintre acidul sulfanilic şi nitriţii din extractul apos al probei şi cuplarea cu N(naphtyl-1) ethylene diamină.

Dozarea conţinutului de nitraţi s-a făcut prin reducerea acestora la nitriţi, în prezenţa cadmiului metalic şi determinarea conţinutului de nitriţi totali. Concentraţia de nitraţi s-a obţinut prin diferenţa dintre conţinutul nitriţilor totali şi cei iniţiali, iar apoi transformarea cu ajutorul factorului corespunzător în nitraţi. Citirile s-au efectuat la 538 nm la un spectrofotometru monofascicul Shimadzu UV-VIS 1240 Mini.

Rezultatele analizelor au fost exprimate în mg/kg (ppm) prin raportare la masa uscată a nutreţurilor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele analizelor cu privire la conţinutul de nitraţi şi nitriţi sunt prezentate în tab. 1 şi 2, în timp ce în fig. 1 sunt reprezentate grafic în fig. 1 şi în fig. 2.

Tabelul 1 Valori medii ale conţinutului de nitraţi în nutreţuri

Nr. crt.	Proba	Nr. probe	mg NO_3^-/kg substanţă uscată		
			$\overline{X} \pm s_{\bar{x}}$	lim min/max	V%
1.	Pajişte naturală	5	62.66±1.29	58.86/66.01	4.61
2.	Borceag m.v.	5	210.94±1.81	206.51/215.57	1.92
3.	Lucernă m.v.	5	101.31±0.71	99.07/102.79	1.56
4.	Iarbă de Sudan m.v.	5	70.39±0.85	68.08/72.36	2.69
5.	Făn de lucernă	5	31.55±0.21	30.98/32.11	1.48
6.	Făn natural	5	13.78±0.24	12.92/14.28	3.84
7.	Siloz de porumb	5	43.67±0.33	42.46/44.47	1.69
8.	Porumb boabe	5	13.47±0.18	13.02/14.05	3.06
9.	Tărâţe de grâu	5	8.49±0.40	7.12/9.30	10.41
10.	Şrot de floarea soarelui	5	11.95±0.15	11.37/12.22	2.88
11.	Borhot de bere	5	14.60±0.22	14.25/15.44	3.41
12.	Nutreţ combinat	5	14.27±0.31	13.34/14.99	4.79

Tabelul 2 Valori medii ale conţinutului de nitriţi în nutreţuri

Nr. crt.	Proba	Nr. probe	mg NO_2^-/kg substanţă uscată		
			$\overline{X} \pm s_{\bar{x}}$	lim min/max	V%
1.	Pajişte naturală	5	6.49±0.16	6.07/6.96	5.67
2.	Borceag m.v.	5	8.04±0.19	7.53/8.41	5.16
3.	Lucernă m.v.	5	8.19±0.18	7.63/8.65	4.86
4.	Iarbă de Sudan m.v.	5	8.86±0.11	8.64/9.26	2.79
5.	Făn de lucernă	5	4.54±0.07	4.42/4.75	3.48
6.	Făn natural	5	4.86±0.12	4.59/5.21	5.36
7.	Siloz de porumb	5	6.29±0.13	5.97/6.72	4.55
8.	Porumb boabe	5	2.81±0.03	2.72/2.88	2.78
9.	Tărâţe de grâu	5	2.69±0.06	2.51/2.90	5.24
10.	Şrot de floarea soarelui	5	2.49±0.05	2.35/2.64	4.87
11.	Borhot de bere	5	2.99±0.07	2.81/3.22	5.03
12.	Nutreţ combinat	5	2.75±0.09	2.52/3.01	7.17

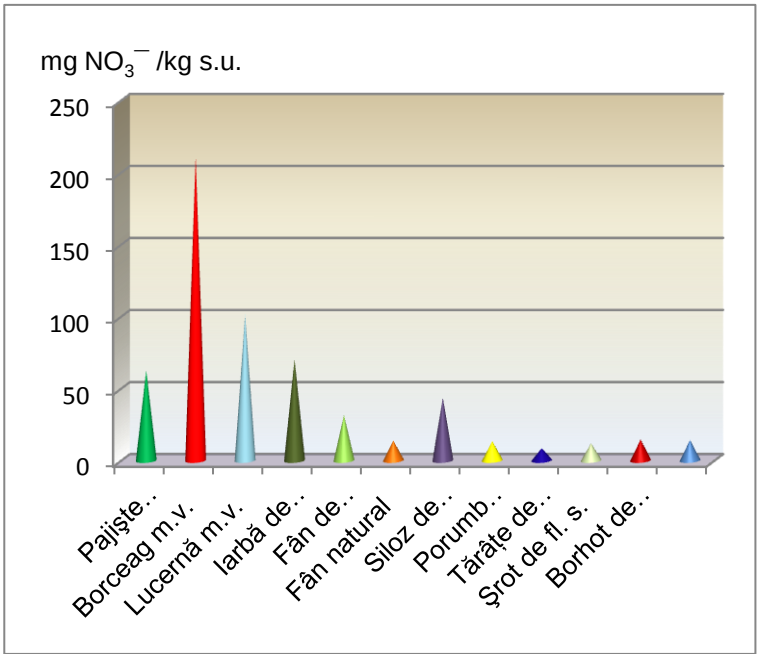


Fig. 1 Concentrația medie de nitrați în nutrețuri, mg NO_3^-/kg s.u.

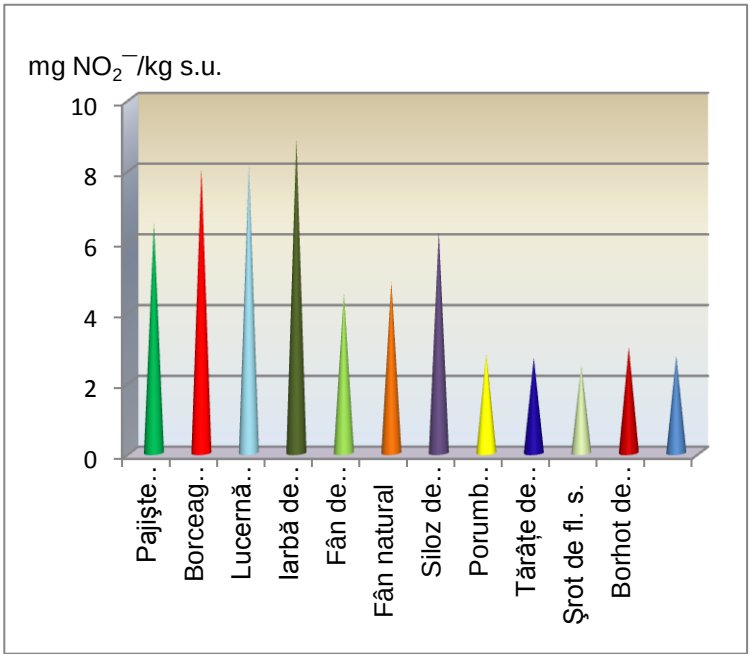


Fig. 2 Concentrația medie de nitriți în nutrețuri, mg NO_2^-/kg s.u.

Datele analitice redate în tabelele de mai sus indică faptul că în toate probele de furaje investigate sunt prezenți ionii de nitrați. Nivelul conținutului de NO_3^- este diferit de la o probă la alta, de la un sortiment de furaje la altul. Valorile medii înregistrate pentru nitrați au fost cuprinse între

8.49 mg NO_3^-/kg s.u.la tărâţe de grâu şi 210.94 mg NO_3^-/kg s. u. iar valorile medii înregistrate pentru nitriţi au fost cuprinse între 2.49 mg NO_2^-/kg substanţă uscată şi 8.86 mg NO_2^-/kg s. u..

Din rezultatele analizelor efectuate, se remarcă o mare diferenţă în ceea ce priveşte nivelul conţinutului de NO_3^-, astfel: categoria de nutreţuri cu un nivel redus de NO_3^- o formează concentratele cultivate şi subprodusele industriale iar categoria de nutreţuri cu un nivel ridicat al conţinutului de NO_3^- este formată din nutreţurile verzi.

Cuantificarea nivelurilor de nitraţi şi nitriţi obţinute din probele analizate prezentate în tab.3, evidenţiază faptul că 50% dintre nutreţurile analizate au un nivel al conţinutului de NO_3^- sub 20.0 mg NO_3^-/kg s.u. şi 41.7% din probe au un nivel al conţinutului de NO_2^- sub 4.0 mg NO_2^-/kg s.u.

Tabelul 3 Distribuţia probelor după conţinutul mediu de NO_3^-şi NO_2^-în nutreţuri

Limite	NO_3^-		Limite	NO_2^-	
mg/kg	Nr. probe	%	mg/kg	Nr. probe	%
<10.0	5	8.3	<2	-	-
10.01-20.0	25	41.7	2.01-4.0	25	41.7
20.01-40.0	5	8.3	4.01-6.0	10	16.7
40.01-60.0	5	8.3	6.01-8.0	10	16.7
60.01-80.0	10	16.7	>8.01	15	24.9
80.01-100	-	-			
>100.01	10	16.7			
Total	60	100	Total	60	100

Unele plante au tendinţa de a acumula un conţinut mai mare de nitraţi, cum ar fi: ovăzul, lucerna, iarba de Sudan, grâul, porumbul etc. (11).

Nivelul ridicat de nitraţi în probele de borceag de 210,94 mg NO_3^-/kg s.u. este cauzat de prezenţa ovăzului, plantă acumulatoare de nitraţi.

De asemenea, nivelul conţinutului în nitraţi este mare în nutreţurile masă verde, fără a fi dăunătoare pentru animale cum ar fi: pajişte naturală de 62.66 mg NO_3^-/kg s.u., lucernă m.v. de 101.31 mg NO_3^-/kg s.u., iarba de Sudan m.v. de 70.39 mg NO_3^-/kg s.u..

După lucrările bibliografice consultate referitoare la conţinutul de nitraţi din nutreţuri, mulţi specialişti au clasificat conţinutul de nitraţi conform tab. 4 (7):

Tabelul 4 Siguranţa şi toxicitatea nivelului de nitraţi în nutreţuri

NO_3^-, mg/kg s.u.	Recomandări
0 – 4.400	Sigur pentru animale
4.500 – 8.800	De obicei, în condiţii de siguranţă a hranei pentru animale cu regim alimentar echilibrat. Limitarea la 50% din aportul în s.u. pentru animale gestante.
8.900 – 15.000	Limita de aport la 20-25% din aportul s.u. Utilizat cu precauţie. Nu se alimentează animalele gestante
> 15.000	Toxic!

* Limin Kung, Jr., 2007, Management of Drought Stressed Corn for Silage, University of Delaware

Din datele prezentate, se poate constata prin comparare că rezultatele analizelor obţinute privind conţinutul de NO_3^- şi NO_2^- în nutreţuri sunt scăzute şi că acestea se pot încadra în categoria produselor vegetale sigure pentru consumul animalelor, nu reprezintă risc toxic pentru animale şi nu pun în pericol sănătatea lor.

CONCLUZII

1. Valorile medii înregistrate ale concentraţiei de nitraţi în nutreţuri au fost cuprinse între 8.49 mg NO_3^-/kg s.u. la tărâţe de grâu şi 210.94 mg NO_3^-/kg s. u. la borceag masă verde.

2. Nivelul concentraţiilor medii de nitriţi înregistrate în nutreţurile analizate au variat de la 2.49 mg NO_2^-/kg s. u. la şrot de floarea soarelui până la 8.86 mg NO_2^-/kg s. u. în probele de iarbă de Sudan masă verde.

3. Analiza toxicologică a concentraţiilor în nitraţi şi nitriţi determinate din probele prelevate, arată că acestea sunt conforme şi nu prezintă risc toxic pentru animale.

BIBLIOGRAFIE

1. Beasley V., 1999 , IVIS Books, Ed.Veterinary Toxicology, (online), U.S.A
2. Cotrău Marţian, 1991 , Toxicologie, Edit. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti
3. Hancock Dennis W., 2007 , Nitrate toxicity, Extension Forage Agronomist, The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences and the U.S. Department of Agriculture cooperating, USA
4. Hartwig Nolan R, 2005 , Nitrate Toxicity, Extension Veterianian, Iowa State University, USA
5. Hura Carmen, 2005 , Contaminarea chimică a alimentelor în România în anii 2004, vol. 4, Edit. Cermi, Iaşi
6. Jarrige R., Ruckebusch Y, Dermarquilly C., France M.-H., Journet M., 1995 , Nutrition des ruminants domestique-ingestion et digestion, INRA, Paris, France
7. Limin Kung Jr., 2007 , Management of Drought Stressed Corn for Silage, University of Delaware
8. Lixandru Gh., Lixandru T., Beldiman Gh., Buzdugan C., 1993 , Consecinţele sanogenice ale nitraţilor din hrana oamenilor. Rev. Şt. „V. Adamache", vol.II, nr. 4. Universitatea „Alexandru Ioan Cuza", Iaşi
9. Manea L., Manea Iuliana, 2004 , Investigaţii privind potenţialul patogen al nitraţilor şi metalelor grele asupra vacilor de lapte, Lucrări ştiinţifice, U.Ş.A.M.V.B., Seria C, Medicină veterinară, vol. XLVI-XLVII, Bucureşti
10. NRC, 1985 , Ruminant Nitrogen Usage - National Academy of Sciences-National Research Council, Washington, D.C.
11. Pinkerton B.W., Understander D.J., Wright R.E., 1988 , Nitrate poisoning, Forages-Cooperative Extension Service Clemson University, USA
12. Popescu O., Enache Tr., 1996 , Medicina legală veterinară, vol II, Edit. ALL, Bucureşti
13. Prakasa Rao E.V.S., Puttanna K., 2000 , Nitrates, agriculture and environment, Current Science, vol.79, no.9, p:1163-1168
14. Rusu M., Mărghitaş Marilena, Oroian I., Mihăiescu Tania, Dumitraş Adelina, 2005 , Tratat de Agrochimie, Edit. Ceres, Bucureşti
15. Şindilar E., 1998 , Controlul igienic al produselor şi subproduselor de origine animală, vol. II, Edit. MOLDOGRUP, Iaşi
16. Şindilar E.V., 2005 , Contribuţii la studiul reziduurilor de nitraţi, nitriţi şi nitrozamine în unele produse de origine animală şi semnificaţia lor sanitar-veterinară, Teză de doctorat, USAMV Iaşi

OBSERVAŢII PRIVIND CALITATEA MICROBIOLOGICĂ A LAPTELUI DE COLECTURĂ PENTRU O UNITATE CU SISTEM HCCP ÎN CURS DE IMPLEMENTARE

OBSERVATIONS REGARDING THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF GATHERED MILK FOR A UNIT WITH HCCP SYSTEM IN COURSE OF IMPLEMENTATION

AMARICAI MARIANA, RIMBU CRISTINA, GUGUIANU ELEONORA, CRETU CARMEN, CARP CARARE M.

In order for cow milk to correspond of quality demand's, both physic-chemical and microbiological parameters must be respected, thus assuring the quality of milk in prime form and the quality of the final product.

The implementation of the HCCP system in a milk processing unit requires a special attention oriented towards owners of milk producing animals.

The microbiological quality is certainly influenced by the hygiene of the milking workers, type of milkmaid, type and quality of the recipients used for collecting, and also the milk transportation conditions from the shelter to the collecting centers.

We have taken into study 70 samples of milk coming from 3 gathering centers, between 2007 and 2008. We harvested in the same day of the same month a sample from each of the three centers for collection.

The microbiological parameters studies were: determining the total number of germs (NTG), identifying and determining the Escherichia coli, Salmonella ssp., Staphylococcus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes bacterial charge. Also, for a correct evaluation of the hygienically quality the somatic cell related to milk ml was determined. As following, we have established that there still exist gaps in human hygiene, presuming that transportation and storage hygiene of gathered milk was respected. Load with contaminant microorganisms is still predominant although the NSC/ml and even NTG/ml is within normal accepted parameters by sanitary and sanitary-veterinary limits.

Key words: milk, microbiological, quality

MATERIAL SI METODA

S-au luat în studiu 70 probe de lapte recoltate din 3 puncte de colectare pe parcursul anilor 2007-2008, prin *Programul de Autocontrol*. Laptele de pe cele două rute de colectare, provine de la vaci de lapte din gospodării particulare şi dintr-o fermă particulară de vaci producătoare de lapte. (Fig.1)

Rutele de colectare a laptelui au fost stabilite din necesitatea colectării unei cantităţi cât mai mare de lapte pentru a fi acoperite necesităţile tehnologice şi economice propuse de unitate. Ferma particulară este constituită din 18 vaci aflate în perioade diferite de lactaţie în condiţii foarte bune de întreţinere şi asigurând un muls automatizat.

Probele de lapte au fost supuse examenelor de laborator, în cadrul LSVSA Vrancea, în vederea monitorizării calităţii microbiologice a laptelui.

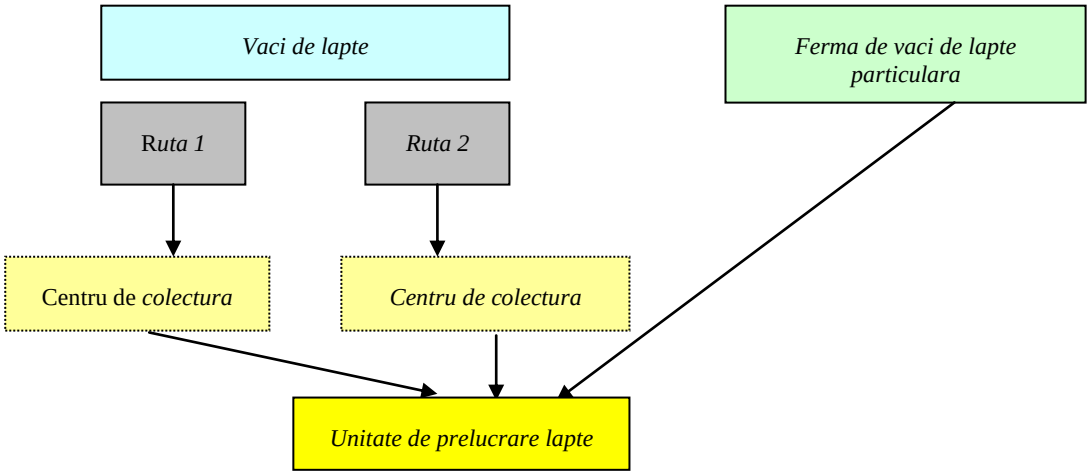


Fig.1. Schema traseelor de recoltare a lapte, pentru unitatea de prelucrare a laptelui

Conform normativelor în vigoare OMS 975-98 analiza microbiologică constă în aprecierea şi determinarea numărului total de germeni, identificarea şi determinarea bacteriilor coliforme, identificarea şi determinarea bacteriilor *Escherichia coli*, *Salmonella* ssp., *Staphylococcus* ssp. (coagulazo-pozitivi), *Bacillus cereus*. Deasemenea pentru evaluarea corectă a calităţii igienice s-a determinat pe aceleaşi probe de lapte şi numărul de celule somatice/ml. (tabel 1)

Tabel 1
Valorile normale ale indicatorilor microbiologici, pentru lapte

	NTG /ml	NCS /ml	B.coliformi /mml	E.coli /ml	Salm /25ml	Staph. /ml	B.cereus /ml,
Lapte	500.000	400.000	1000	100	abs	abs	abs

Parametrii NTG/ml şi NCS/ml admişi de normative pentru etapa 1.01.2007–31.12.2008 sunt: *NTG<=500.000;NCS<=400.000*

Determinarea **NTG** s-a realizat prin metoda numărării coloniilor obţinute la 30^0C, în conformitate cu cerinţele SR ISO 4833/1992, respectiv SR ISO 4833/2003.

Determinarea **NCS/ml** s-a efectuat prin metoda floro-opto-electronică de numărare, conform SR ISO 13366-3/2001, care permite aprecierea numărului de celule epiteliale de origine mamară şi celule de infiltraţie.

Determinarea **bacteriilor coliforme** din lapte, este un indicator igienico-sanitar important, metoda de lucru fiind în conformitate cu SR ISO 5541-1/1994, pentru ***Escherichia coli*** s-a utilizat metoda de lucru conform cerinţelor SR ISO 7251/96. iar prezenţa genul ***Salmonella*** s-a efectuat conform SR ISO 6579/2003 cu modificări aduse prin SR ISO 6579/AC 2006. şi SR ISO 6579/$A_1$2007.

Stafilococii coagulazo-pozitivi/ml lapte au fost identificaţi conform normelor SR ISO 6888-2/2002 şi SR ISO 6888-1-2/$A_1$2005 iar pentru izolarea şi identificarea ***Bacillus cereus*** s-a utilizat metoda orizontală pentru determinarea celui mai mic număr prezumtiv, în conformitate cu SR ISO 21871/2006.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

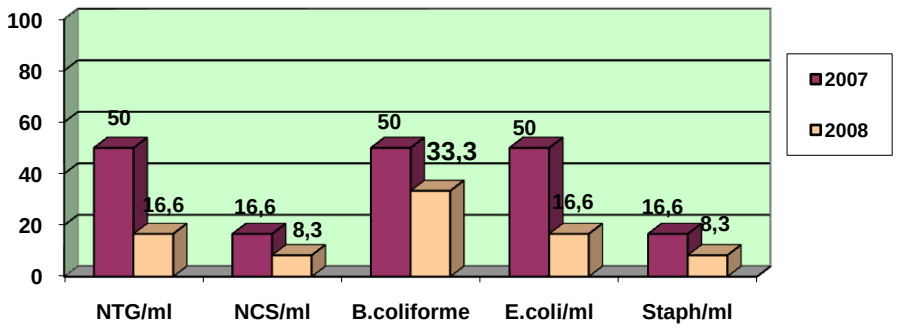
Rezultatele examenelor de laborator, pentru indicatorii microbiologici analizaţi pe laptele provenit din 3 centre de colectare, sunt redate în tabelul 2 (ruta 1), tabelul 3 (ruta2), tabelul 4 (ferma de vaci).

Astfel, din analiza de ansamblu a investigaţiilor microbiologice efectuate pe probe de lapte recoltate de pe ruta 1, s-a constatat că în anul 2007, au fost identificate 50% probe, cu valori peste cele admise la NTG/ml, bacterii coliforme/ml şi *Escherichia coli*/ml. De asemenea 16,6% din probele de lapte a fost neconform datorită NCS/ml şi stafilococi coagulazo-pozitivi/ml. (tabel 2, grafic 1)

Tabel 2

Indicatorii microbiologici evaluaţi pe probe de lapte colectat, (ruta 1)

RUTA1	NTG/ml		NCS/ml		B.coliforme /ml		E.coli/ml		Staph./ml	
Valori normale	500.000		200.000		1000		100		abs	
anul	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
1	350.000	330.000	80.000	94.000	400	200	80	50	abs	abs
2	220.000	300.000	60.000	73.000	400	260	70	70	abs	abs
3	450.000	200.000	105.000	125.000	320	89	70	60	abs	abs
4	400.000	230.000	190.000	189.000	200	80	88	89	prez.	abs
5	600.000	400.000	225.000	190.000	2000	600	110	90	abs	abs
6	900.000	400.000	190.000	187.000	3500	700	190	90	abs	abs
7	810.000	600.000	200.000	190.000	3000	1560	120	120	abs	abs
8	700.000	550.000	230.000	220.000	4000	1500	150	180	prez.	abs
9	550.000	500.000	180.000	200.000	2000	1100	110	90	abs	prez
10	380.000	400.000	100.000	190.000	1100	1200	110	89	abs	abs
11	400.000	300.000	110.000	170.000	600	800	90	90	abs	abs
12	400.000	450.000	60.000	167.000	770	780	89	67	abs	abs



Grafic 1. Incidenţa probelor de lapte necorespunzătoare prelevate din punctul de colectare aferent rutei 1

In anul 2008, se observă o scădere a numărului de probe necorespunzătoare, cu excepţia bacteriilor coliforme, unde 33% din probele de lapte examinate nu erau corespunzătoare la indicatorul igienic.

Analizând indicatorii microbiologici ai probelor de lapte prelevate din centrul de colectare aferent rutei 2, se constată o scădere a numărului de probe neconforme. Asfel în 2007, câte 3 (25%) probe sunt necorespunzătoare pentru indicatorii NTG/ml, 3(25%)probe la indicatorul bacterii coliforme/ml şi 3 (25%) probe la *Escherichia coli*/ml. (tabel 3, grafic 2)

Tabel 3

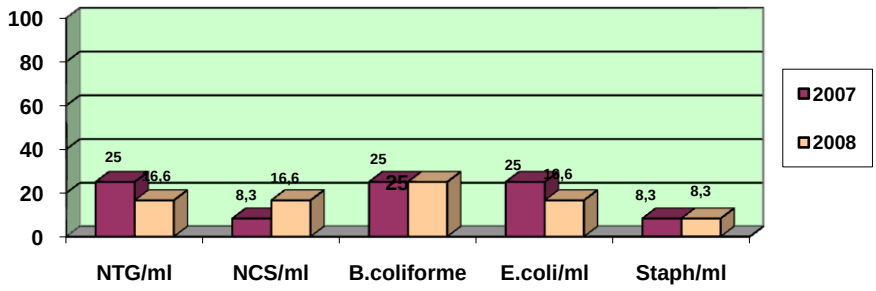
Indicatorii microbiologici evaluaţi pe probe de lapte prelevate din centrul de colectură aferent rutei 2

RUTA 2	NTG/ml		NCS/ml		B.coliforme /ml		E.coli/ml		Staph./ml	
Valori normale	500.000		200.000		1000		100		abs	
anul	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
1	300.000	400.000	110.000	180.000	600	220	99	50	abs	abs
2	280.000	400.000	100.000	175.000	500	280	90	70	abs	abs
3	400.000	300.000	165.000	150.000	300	890	89	90	abs	abs
4	400.000	380.000	180.000	180.000	500	560	87	66	abs	abs
5	400.000	480.000	200.000	240.000	1000	400	100	50	abs	abs
6	1100.000	480.000	690.000	280.000	1200	700	167	90	prez	prez
7	680.000	580.000	200.000	190.000	2000	1560	180	110	abs	abs
8	600.000	600.000	200.000	190.000	2000	1500	190	120	abs	abs
9	450.000	400.000	170.000	200.000	900	1100	90	80	abs	abs
10	480.000	500.000	100.000	190.000	900	900	100	99	abs	abs
11	420.000	400.000	110.000	170.000	600	600	90	80	abs	abs
12	400.000	200.000	60.000	167.000	680	800	89	78	abs	abs

Corelarea celor trei indicatori necorespunzători şi existenţa unei singure probe de lapte cu NCS/ml peste normele admise, denotă o problemă de igienă, care influenţează calitatea şi salubritatea laptelui materie primă.

Stafilococilor cogulazo-pozitivi au fost identificaţi în proba de lapte colectură din luna iunie, la care s-a constatat şi valori ridicate ale NCS/ml (690.000), ceea ce putem conchide ca pe ruta 2, în luna a VI-a existau vaci cu mamită infecţioasă. Laptele provenit de la vaci cu mamite subclinice este un lapte periculos pentru consumatori, cu o valoare alimentară relativ redusă, datorat conţinutului scăzut de cazeină şi lactoză. (4)

Dintre speciile coaglulazo-pozitive se disting *S. aureus, S. intermedius, S. hycus, Scheleiferi*, unele dintre acestea având capacitate condiţionat-patogenă prin posibilitatea dezvoltării unui biofilm bacterian pe suprafeţe electronegative ale corpilor străini, ceea ce accentuează patogenitatea acestora. (2,3)



Grafic 2. Incidenţa probelor de lapte necorespunzătoare prelevate din punctul de colectare aferent rutei 2

În anul 2008, probele necorespunzătoare au fost în scădere: câte 2 probe cu NTG/ml(16,6%) şi *E.coli*/ml(16,6%) şi s-a dublat numarul de probe necorespunzătoare la indicatorul NCS/ml (16,6%).

Prezenţa unor valori ridicate de NCS/ml în condiţiile unui NTG/ml încadrat în parametrii acceptaţi de normative, au relevat existenţa unor mamite subacute şi care au impus depistarea, excluderea şi tratarea acestor animale pentru a nu influenţa calitatea laptelui de colectură şi implicit a laptelui materie primă.

Probele de lapte prelevate din laptele de colectură provenit de la ferma particulară, s-au apropiat cel mai mult de valorile normale ale parametrilor microbiologici testaţi.

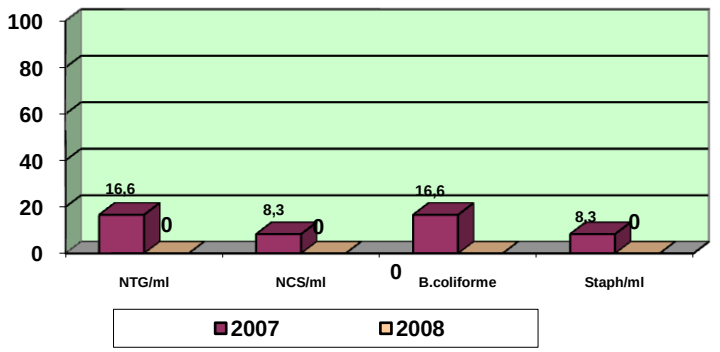
Tabel 4

Indicatorii microbiologici evaluaţi pe probe de lapte prelevate din laptele colectat de la ferma de vaci producătoare de lapte

Ferma vaci Ruta 3	NTG/ml		NCS/ml		B.coliforme /ml		E.coli/ml		Staph./ml	
Valori normale	500.000		200.000		1000		100		abs	
anul	**2007**	**2008**	**2007**	**2008**	**2007**	**2008**	**2007**	**2008**	**2007**	**2008**
1	380.000	200.000	120.000	110.000	300	210	99	50	abs	abs
2	350.000	280.000	110.000	165.000	300	233	90	70	abs	abs
3	390.000	300.000	185.000	140.000	200	390	89	90	abs	abs
4	420.000	330.000	190.000	158.000	400	360	87	66	abs	abs
5	470.000	280.000	190.000	200.000	500	400	100	50	abs	abs
6	500.000	440.000	**210.000**	200.000	200	300	100	90	**prez**	abs
7	**550.000**	400.000	190.000	190.000	**1100**	300	90	66	abs	abs
8	**620.000**	500.000	200.000	190.000	**1100**	500	93	98	abs	abs
9	400.000	400.000	160.000	200.000	900	566	90	80	abs	abs
10	400.000	500.000	110.000	110.000	500	660	100	99	abs	abs
11	400.000	400.000	130.000	133.000	300	400	90	80	abs	abs
12	200.000	200.000	89.000	153.000	280	500	89	78	abs	abs

Analizând tabelul 4 şi graficul nr.3 se constată în 2007 s-au identificat câte 2 probe cu valori necorespunzătoare pentru NTG/ml (16,6%), bacterii coliforme/ml (16,6%) şi câte o singură probă pentru NCS/ml (8,3%) şi stafilococi coagulazo-pozitivi /ml (8,3%).

De remarcat este faptul că în anul 2008, toate probele au corespuns la toţi indicatorii microbiologici evaluaţi, ceea ce dovedeşte că respectarea normelor de igienă pe tot parcursul transabilităţii prodului lapte materie primă, definesc practic noţiunea de *lapte conform*.



Grafic 3. Incidenţa probelor de lapte necorespunzătoare prelevate din laptele colectat de la ferma de vaci producătoare de lapte

La analiza de ansamblu a rezultatelor obținute se constată că NTG/ml, NCS/ml, şi bacteriile coliforme /ml sunt indicatorii de calitate incriminați cel mai frecvent în stabilirea laptelui neconform. Studiile efectuate anterior stabilesc faptul că, laptele provenit de la o vacă sănătoasă situează NCS la 80.000/ml, între 80.000 şi 300.000/ml încadrează laptele ca fiind dubios, iar peste aceste valori, laptele este suspect. Prezența în lapte a celulelor somatice cu valori apropate de cele admise de normativele în vigoare (200.000/ml), pot fi cauza unor mamite subclinice incipiente, dar se pot datora şi stressului de muls sau perioadei de lactație, fiind cunoscut faptul că în lactația a III-a creşte numărul acestora. (1).

Măsurile inteprinse de conducerea unitatea de prelucrare a laptelui privind igiena mulgatorilor, decontaminării şi deratizării ale spațiilor în care se realizează mulgerea, igiena ugerului, filtrarea obligatorie a laptelui, prin strecurători cu tifon curat în patru straturi, igiena vaselor de muls şi a ambalajelor, răcirea laptelui imediat după muls cu apă rece sau gheață şi temperatura spațiului de depozitare sunt factori care au dus la scăderea numărului de probe de lapte neconform şi implicit la o cantitate mai mare de lapte corespunzător calitativ.

CONCLUZII

1. S-au luat în studiu 70 probe de lapte provenite din 3 centre de colectare pe parcursul anilor 2007-2008
2. În anul 2007, 50% probe de lapte colectat din centrul de colectare aferent rutei 1, prezentau valori depăşite la indicatorii NTG/ml, bacterii coliforme/ml şi *Escherichia coli*/ml şi 16,6% din probele de laptele colectat a fost neconform, datorită NCS/ml şi prezenței stafilococi coagulazo-poztivi.
3. In anul 2008, 16,6% probe de lapte au depăşit valorile normale ale indicatorilor microbiologici NTG/ml, Escherichia coli/ml, şi 8,3% din probe au fost necorspunzătoare la indicatorii stafilococi coagulazo-pozitivi/ml şi NCS/ml.
4. In anul 2007, din centrul de colectare lapte, aferent rutei 2, 3(25%) probe au fost necorespunzătoare pentru NTG/ml, 3(25%) probe la indicatorul bacterii coliforme/ml şi 3 (25%) probe la *Escherichia coli*/ml.
5. Corelarea celor trei indicatori necorespunzători şi existența unei singure probe de lapte cu NCS/ml peste normele admise, denotă o problemă de igienă, care influențează calitatea şi salubritatea laptelui materie primă
6. Prezența sfailococilor coagulazo-pozitivi în proba de lapte prelevată în luna iunie şi valoarea ridicată ale NCS/ml (690.000), relevă faptul că pe ruta 2, în luna a VI-a existau vaci cu mamită infecțioasă.
7. În anul 2008, probele de lapte necorespunzătoare, prelevate din laptele colectat de pe ruta 2, au fost în scădere: 2(16,6%) probe pentru indicatorul NTG/ml şi 2 (16,6%) probe pentru indicatorul *E.coli*/ml dar s-a dublat numărul de probe de lapte neconform la indicatorul NCS/ml (16,6%).
8. Prezența unor valori ridicate de NCS/ml în condițiile unui NTG/ml încadrat în parametrii acceptați de normative, a relevat existența unor mamite subacute la vacile producătoare de lapte din sistemul gospodăresc.
9. În 2007 din laptele provenit din ferma de vaci, s-au identificat: 2(16,6%) probe cu valori necorespunzătoare pentru NTG/ml, 2 (16,6%) probe cu valori peste limita admisă la indicatorul- bacterii coliforme/ml şi câte o singură probă pentru NCS/ml (8,3%) şi stafilococi coagulazo-pozitivi /ml (8,3%).
10. În anul 2008, toate probele prelevate din laptele de colectură, obținut de la ferma de vaci, au corespuns la toți indicatorii microbiologici investigați, ceea ce dovedeşte că au fost respectate normelor de igienă şi igieno-sanitare.

11. Analiza de ansamblu a rezultatelor obţinute pe cele trei centre de colectare, relevă faptul că NTG/ml, NCS/ml, şi bacteriile coliforme /ml sunt indicatorii de calitate incriminaţi cel mai frecvent în stabilirea laptelui neconform

BIBLIOGRAFIE

1. Apostu S., (2004).- Managementul calităţii alimentelor, Ed. Risoprint, Cluj Napoca.
2. Bârzoi D. Apostu S. (2002)- Microbiologia produselor alimentare. Ed. Risoprint, Cluj Napoca.
3. Bondoc I., Sindilar E.V. (2002)- Controlul sanitar veterinar al calităţii şi salubrităţii alimentelor, vol. I, Editura Ion Ionescu de la Brad Iasi.
4. Bondoc I. (2007) – Tehnologia şi controlul calităţii laptelui şi produselor lactate, vol.I, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iaşi.
5. Standarde de stat, norme tehnice de calitate şi de metode de analiză pentru laptele integral- materie primă STAS 6348-76
6. STAS 1981-A1_1998 -Laptele şi produsele lactate
7. SR ISO 7218/996 – Microbiologia alimentelor şi hranei animalelor. Reguli generale pentru examenul microbiologic
8. SR ISO 8261/1996 – Lapte şi produse lactate. Pregătirea eşantioanelor pentru analiză şi a diluţiilor pentru examenul microbiologic.
9. Ministerul agriculturii şi alimentaţiei, ANSVS, LCCPOAF- Program provizoriu de supraveghere pentru controlul contaminării cu Escherichia coli O157H7
10. Ordin 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, MO 860, partea I.
11. Ordin MAAP 8/2001 pentru aprobarea Normei sanitare veterinare privind stabilirea unor metode de analiză şi testare a laptelui materie primă şi a celui tratat termic.
12. Regulament CE 853/2004 care stabileşte cerinţe de sănătate, criterii de calitate privind laptele crud, sec.IX.
13. Regulament CE nr. 2073 privind criteriile microbiologice pentru produsele alimentare, cu amendamentele ulterioare.
14. Directiva CEE 46/1992 privind regulile sanitare de producţie şi comercializare a laptelui crud, a celui tratat termic şi a produselor lactate.

ASPECTE EPIDEMIOLOGICE IN UNELE ZOONOZE PARAZITARE LA OM IN ROMANIA

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS IN SOME PARASITIC ZOONOSIS AT HUMANS IN ROMANIA

AMFIM ADRIANA, SIMION VIOLETA ELENA , PARVU MONICA
Facultatea de Medicina Veterinara, Universitatea Spiru Haret, Bucuresti
diana_vva@yahoo.com

At this hour, both in Romania and International level, parasitic diseases are one of the public health problems, carefully looked upon, due to increased prevalence, problems of health – due to the lack of an correct treatment, differential diagnostic issues and not last, of an numerous economics implications.

The research study consisted in investigation of five parasitic zoonosis (amibiosis, giardiasis, echinococcosis, toxoplasmosis, toxocariasis) for an period of research of six years (2000-2005). The purpose was the establishment of the dynamic for these diseases, in hospitals, medical cabinets, specialized outpatient, at national level.

Epidemiologic estimation was made trough the evaluation of the situation of parasitic zoonosis, at national level, pursuing as evaluation parameters, prevalence and incidence of cases in one calendar year/ source of reporting epidemiologic data. The comparative analytic epidemiologic analyses of investigated zoonosis. During 2000-2005, shows an maximum prevalence for echinococcosis and toxocariasis and minim values of prevalence for toxocariasis. Regarding the incidence value, this was at maximum level in the case of giardiasis related to echinococcosis situation where it were registered the smallest values.

Regarding the report source - family cabinets and specialized outpatients - one can see the significant difference in the maximum values of prevalence case. Thus, the report of family doctors cabinets present a maximum prevalence values (P-64.3%) for echinococcosis, in change, the data from the report of outpatients doctors shows a maximum prevalence (P- 45.96%) for toxocariasis. The pointed out differences can have several causes which imply an separated research study which isn't the epidemiologic analytic-descriptive analyses subject used in the present study.

Key words: parasitic zoonosis, incidence, prevalence

INTRODUCERE

Prin coabitarea strânsă a oamenilor cu animalele, în zone largi şi în condiţii mai mult decât nesatisfăcătoare, zoonozele, indiferent de natura lor continuă să ia amploare. Dacă în trecut zoonozele erau tratate ca o problemă în care sunt implicate în mare parte animalele de interes economic, la ora actuală, prin creşterea tot mai mare a numărului de animale de companie în special câine/pisică, perspectiva abordării zoonozelor de natură parazitară tinde sa îşi schimbe orientarea (1).

Datele comunicate de către ONU şi OMS, arată că din cei 150 agenţi etiologici implicaţi în declanşarea zoonozelor, 75 sunt de natură parazitară ceea ce înseamnă că în proporţie de 50% oamenii pot contracta o zoonoză parazitară; aceste date susţin manifestările de ordin endemic/epidemic al unora dintre ele (2).

La nivel naţional problematica zoonozelor de natură parazitară este dezbătută în cadrul programelor aflate sub egida unor organizaţii ministeriale şi administrative**. Astfel Autoritatea Naţională Sanitară Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor** (A.N.S.V.S.A) contribuie la prevenirea apariţiei zoonozelor la om prin diverse dispoziţii şi programe strategice. Prin atribuţile sale **Institutul de Diagnostic şi Sănătate Animală (I.D.S.A)** ca laborator de referinţă pentru diagnosticul de

laborator în domeniul sănătăţii animalelor, *este coordonatorul activităţii de diagnostic şi supraveghere pentru boli majore, boli endemice, emergente şi zoonoze la nivel naţional (***)*

Indiferent de situaţia actuală din domeniul sănătăţii publice (ceea ce implică şi sănătatea animală) şi de nivelul avansat sau nu, al cunoaşterii domeniului - parazitologie medicală, este imperios necesară conlucrarea mai multor sisteme medical naţionale, guvernamentale, administrative şi de sănătate publică pentru a îndeplini dezideratul de « sănătate publică » care să satisfacă medicii umani sau veterinari şi nu în ultimul rând oamenii sau animalele.

MATERIAL SI METODE

Prezentul studiu a fost efectuat în baza datelor epidemiologice (incidenţă/prevalenţă) furnizate de către serviciile de sănătate judeţene, centralizate la nivel naţional de către Centrul Naţional pentru Organizarea şi Asigurarea Sistemului Informaţional şi Informatic în Domeniul Sănătăţii, Bucureşti, România.

Studiul a avut drept **scop stabilirea aspectelor cantitaive ale unor zoonoze parazitare raportate la om în România**. De asemena, în baza datelor obţinute, s-a realizat prelucrarea statistică a acestora precum şi interpretarea principalilor indici epidemiologici, putându-se obţine o evaluare a situaţiei epidemiologice a zoonozelor parazitare la om într-o perioadă determinată de timp.

Au fost investigate cinci zoonoze parazitare (amibioza, giardioza, toxoplasmoza, hidatidoza, larva migrans viseceralis/ocularis). Perioada de cercetare a fost de şase ani, urmărindu-se dinamica acestora în cabinete medicale, ambulatorii specializate, la nivel naţional (numărul total de cazuri din România). Prezentul studiu a folosit ca metodologie de cercetare *ancheta epidemiologică*, urmărind evaluarea cantitativă a parametrilor epidemiologici, în primul rând a celor esenţiali (incidenţa, prevalenţa).

Ancheta epidemiologică s-a realizat prin **analiză retrospectivă**, folosind **investigaţiile analitice** (prelucrarea statistică a datelor obţinute), în cadrul cercetărilor **operaţionale cantitative** de tipul **modelării epidemiologice** (metodă modernă în investigaţiile epidemiologice realizată prin modelarea matematică a caracterelor zoonozelor şi a dinamicii acestora; este concretizată prin programe specifice computerizate; permite simularea biologică a stărilor patologice prin reproducerea lor experimentală la animalele de laborator) (3).

Datele obţinute au fost apreciate prin calcularea incidenţei şi prevalenţei cazurilor de zoonoze parazitare din România între anii 2000-2005 şi ulterior transpuse în tabele care au fost exprimate, prin intermediul programului computerizat EXCEL, ca informaţie finală în grafice, diagrame etc.

REZULTATE SI DISCUTII

Prezentul studiu de cercetare a fost orientat în doua direcţii:

Prima direcţie a urmărit stabilirea dinamicii incidenţei şi prevalenţei tuturor zoonozelor investigate prin raportare la intreaga perioadă de studiu (2000-2005). In acest scop au fost centralizate şi prelucrate statistic datele provenite din două surse de raportare: cabinetele medicilor de familie şi ambulatoriile de specialitate. Comparativ, au fost analizate valorile minime şi maxime ale incidenţei şi prevalenţei pentru fiecare zoonoză parazitară luată în studiu (tabel 1).

A doua direcţie a urmărit evaluarea epidemiologică a fiecărui an calendaristic din intervalul 2000-2005 în baza valorii incidenţei celor cinci zoonoze prin raportarea unei singure surse (cabinetele medicilor de familie) (tabel 2).

1. Analiza dinamicii colective a zoonozelor investigate, în perioada 2000-2005, în baza incidenţei şi prevalenţei în urma raportării cabinetelor de familie şi medicilor din ambulatorii de specialitate este redata grafic dupa cum urmeaza (tabel 1, fig 1,2).

Tabel 1 Dinamica incidenţei si prevalenţei amibiozei, toxoplasmozei, giardiozei, hidatidozei, larvei migrans în perioada 2000-2005 (raportarea medicilor de familie/ambulatorii de specialitate)

Zoonoza	Prevalenţa (%)		Incidenţa (%)	
	Cabinete de familie	Ambulatorii	Cabinete de familie	Ambulatorii
Amibioza	58.80	41.87	3	2.49
Giardioza	44.92	38.88	8.1	12
Toxoplasmoza	44.25	45.96	1.6	1.85
Hidatidoza	64.30	35.47	0.6	0.86
Larva migrans	51.28	31.05	4	4.21

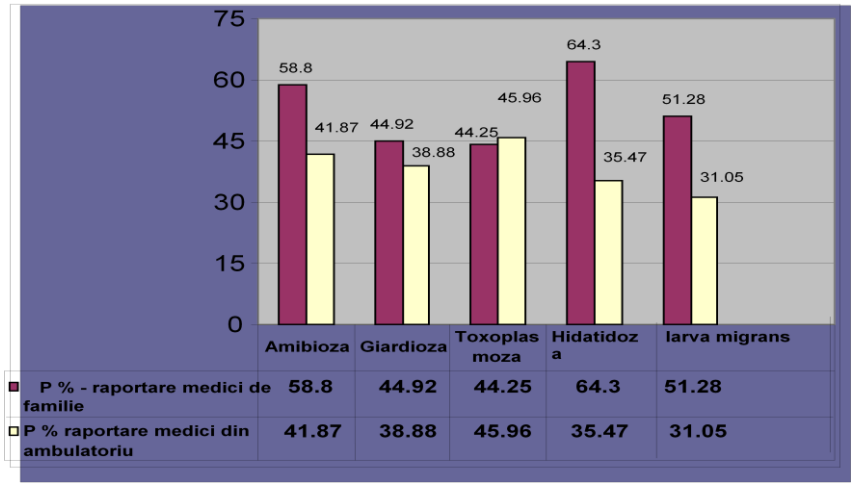


Fig.1 Prevalenţa celor cinci zoonoze (2000-2005) prin raportarea cabinetelor de familie şi a medicilor din ambulatorii de specialitate

Din analiza fig. 1 se observă diferenţe între valorile prevalenţei în funcţie de sursa de raportare. Astfel datele provenite din cabinetele medicilor de familie indică prevalenţa maximă (P-64.3%) pentru **hidatidoză** iar raportarea ambulatorilor de specialitate arata prevalenţa maximă (P- 45.96%) pentru **toxoplasmoză**. Diferenţele sunt semnificative şi pentru valorile minime ale prevalenţei; **toxoplasmoza** inregistrând valori minime (P – 33.36%) prin raportarea medicilor de familie, în timp ce raportarea medicilor din ambulatoriu indică o valoare minimă a prevalenţei (P- 31.05 %) pentru cazuriile de **larva migrans**.

In ceea ce priveste valoarea incidenţei pentru cele cinci zoonoze in perioada de studiu 2000-2005, s-a constat ca nu exista diferente intre valorile mine si maxime pentru acest indicator epidemiologic indiferente de sursa de raportare (tabel 1, fig. 2).

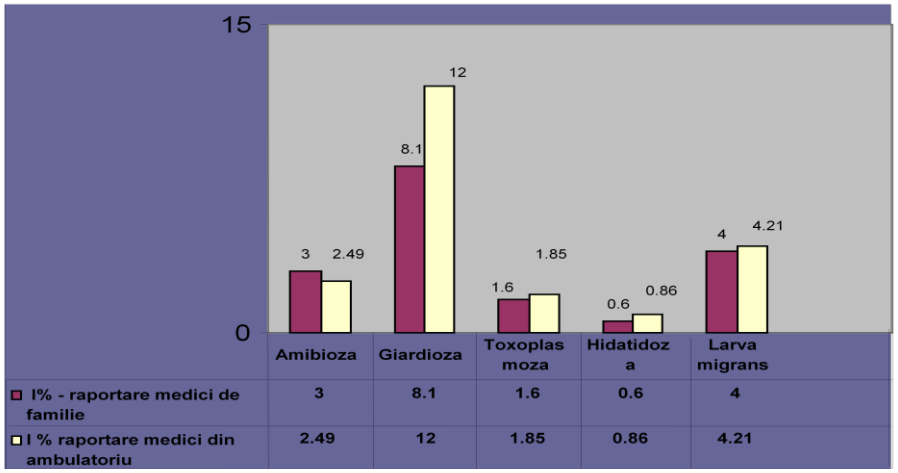


Fig. 2 - Incidența celor cinci zoonoze (2000-2005) prin raportarea cabinetelor de familie şi a ambulatoriilor de specialitate

Prin analiza graficelor 1 si 2 se poate observa că **hidatidoza** deşi are prevalența maximă (P-64.3%), valoarea incidenței este minimă. Această situație poate fi explicată prin faptul că apariția cu o frecvență mică (I – 0,6-1.86%) a cazurilor noi de hidatidoza într-o populație, se poate datora atât măsurilor de combatere corect aplicate, precum şi igienei şi educației medicale a populației, în felul acesta posibilitatea de contaminare umană fiind redusă. Valorile mari ale prevalenței se pot atribui perioadei lungi de vindecare a bolii (spitalizare de lungă durată/recidive/vindecări insiduoase) precum şi datorită diagnosticării doar în cazuri accidentale.

Prin analiza comparativă a celor cinci zoonoze, pe întreaga perioadă de investigare (2000-2005), în baza datelor furnizate de către cabinetele medicale şi ambulatorile specializate din întreaga țară, şi prin prelucrarea statistică (parțial) de către Centrul Național pentru Organizarea şi Asigurarea Sistemului Informațional şi Informatic în Domeniul Sănătății, Bucureşti se pot face următoarele observații:

- Analiza epidemiologică analitică comparativă a zoonozelor investigate (2000-2005), indică o prevalență maximă pentru **hidatidoză şi toxoplasmoză** și valori minime pentru **larva migrans**; valorile maxime ale incidenței au fost înregistrate în cazul **giardiozei** şi minime pentru **hidatidoză**;
- Valorile prevalenței sunt diferite în funcție de sursa de raportare a datelor, în timp ce valorile maxime si minime ale incidenței sunt atribuite aceleaşi boli **(hidatidoaza**) indiferent de sursa de raportare a cazurilor;
- Diferențele semnalate pot avea mai multe cauze care implică un studiu de cercetare separat şi care nu face obiectul analizei epidemiologice analitice/descriptive utilizate în prezentul studiu. În acest sens este indicată utilizarea altor etape ale anchetei epidemiologice (investigarea/colectarea datelor de la sursele secundare, în unele cazuri chiar şi din surse primare).

2. Evaluarea epidemiologică a fiecărui an calendaristic din intervalul 2000-2005 în baza valorii incidenței prin raportarea cabinetelor medicilor de familie

Pentru aprecierea situației epidemiologicice a fiecărui an calendaristic (din perioada de investigare) separat este nevoie de existența unei baze de date care să cuprindă valorile indicilor epidemiologici pentru fiecare zoonoză în parte pentru anul calendaristic investigat (tabel 2, fig. 3).

Tabel 2 Dinamica valorilor incidenţei zoonozelor parazitare investigate în urma raportării medicilor de familie

An calendaristic	Amibioza (I%)	Giardioza (I%)	Larva migrans (I%)	Hidatidoza (I%)	Toxoplasmoza (I%)
Anul 2005	2.75	8.4	4.1	0.5	1.38
Anul 2004	3.82	9.2	4.1	0.68	1.43
Anul 2003	5.72	7.6	3.5	0.69	1.97
Anul 2002	1.28	8.2	4.7	0.77	1.64
Anul 2001	3.32	8.8	4.4	0.67	1.76
Anul 2000	1.21	6.8	3.6	0.36	1.15

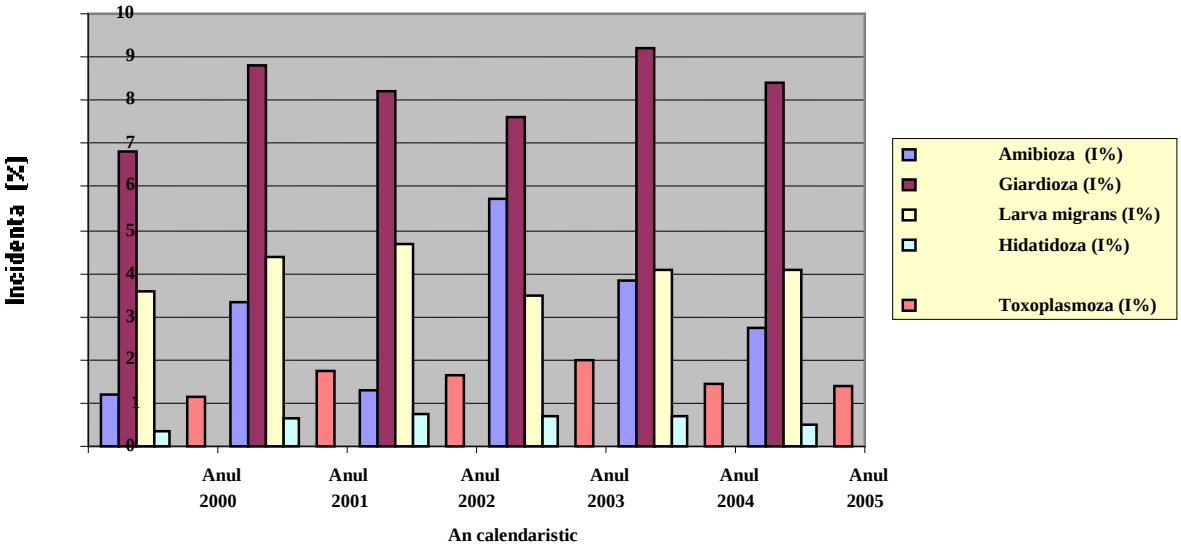


Fig. 3 – Dinamica valorilor incidenţei celor cinci zoonoze parazitare în perioada 2000-2005

Analiza dinamicii valorilor incidenţei (fig. 3) indică urmatoarele aspecte:

Cele mai multe cazuri noi care apar în rândul populaţiei din România, în fiecare an calendaristic din perioada învestigată (2000-2005), sunt cele de **giardioză** (in anul 2004 riscul de contaminare cu *Giardia* sp. a fost maxim (I – 9.2%).

Cele mai puţine cazuri noi care apar in randul populatiei umane in perioada 2000-2005 au fost cele de **hidatidoză**;

Cele mai mari variaţii ale valorilor incidenţei, au fost observate pentru cazurile de **amibioză (I - 1.21- 5.72%);**

Toxoplasmoza a fost singura zoonoză care a avut tendinţa de a-şi menţine frecvenţa de apariţie în rândul populaţiei la valori constante pentru întreaga perioadă de investigare (I- 1.15-1.97%).

CONCLUZII

Scopul prezentului studiu a fost sa stabilieasca, in baza a doi indici epidemiologi – prevalența și incidența, dinamica anuală a unui numar reduz de zoonoze parazitare cu care se poate confrunta populatia umană din Romania la ora actulă.

Cele doua direcții în care a fost orientată analiza retrospectivă analitică au reusit sa stabilească câteva aspecte importante care fac ca zoonozele să fie privite în continuare ca o problemă de sănătate umană. Astfel că atât **hidatidoza** cât și **toxoplasmoza**, două zoonoze cu implicații sociale și economice grave, își mențin valorile prevalenței maxime pe intreaga perioadă de studiu. In ceea ce privește incidența, s-a constat ca aceasta are valori minime pentru **hidatidoza**, ceea ce inseamnă o apariție anuală limitată a cazurilor noi de hidatidoză.

De asemenea prezentul studiu a reușit să stabilească un aspect important ce ține de monitorizarea bolilor transmisibile la om, și anume diferențele, uneori, semnificative între datele ce provin din cele două surse de raportare, astfel că valoarea maximă și minimă a prevalenței este diferite în funcție de sursa de raportare a datelor, în timp ce valorile maxime și minime ale incidenței sunt atribuite aceleaşi boli **(hidatidoaza**) indiferent de sursa de raportare a cazurilor. Diferențele semnalate pot avea mai multe cauze care implică un studiu de cercetare separat şi care nu face obiectul analizei epidemiologice analitice/descriptive utilizate în prezentul studiu. În acest sens este indicată utilizarea altor etape ale anchetei epidemiologice (investigarea/colectarea datelor de la sursele secundare, în unele cazuri chiar şi din surse primare).

BIBLIOGRAFIE

1. Gordis, L., Epidemiology. 2nd. Ed. Philadelphia: Saunders, 2000.
2. Ionescu, V., Zoonoze parazitare - problemă de actualitate. Revista Română de Parazitologie, vol. XV, Nr. 1, pag. 19, 2005
3. Vior, C., Introducere în Epidemiologia Generală, Ed. F.R.M., Bucureşti, 1999.
4. ***Agenția Națională Sanitară Veterinară şi pentru Siguranța Alimentelor, Raport de activitate pentru anul 2006, www.ansv.ro

SEROLOGICAL EVIDENCE OF HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN DIFFERENT SWINE CATEGORIES FROM IAŞI COUNTY

EVIDENŢIEREA SEROLOGICĂ A INFECŢIEI CU VIRUSUL HEPATITEI E LA DIFERITE CATEGORII DE SUINE DIN JUDEŢUL IAŞI

ANITA ADRIANA, ANITA D., TANASE OANA IRINA, LUDU LUANDA, SAVUŢA GH.
Faculty of Veterinary Medicine Iaşi
adrianalazar79@yahoo.com

Hepatitis E, caused by hepatitis E virus (HEV) is an infectious disease that in human show clinical and morphological feature of acute hepatitis. It is usually transmitted through food or drinking water contaminated with faecal materials. HEV was first detected in pigs in 1997 in SUA; since then swine infections have been described worldwide. In general HEV in pigs seems to be subclinical, although some studies have shown a possible correlation of the infection with liver damage.

The aim of this study was to investigate the presence of HEV infection in wild boars from Iaşi county and pigs imported from two European countries (Holland and Spain). The presence of infection was exanimate by detection of HEV antibodies (anti-HEV IgG) in pig sera. Specific antibodies against hepatitis E virus were detected at 4 wild boars from 90 samples tested and in 16 out of 79 pigs.

Keywords: hepatitis E, swine, wild boar

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) infections are responsible for large waterborne outbreaks in developing countries. HEV is a spherical, non-enveloped, single stranded, positive-sense RNA virus. The genome, which is about 7.5 kb in size, contains three open reading frames (ORF's). There are two well-characterized genotypes of swine HEV: Asia and Europe-America. These genotypes can not be differentiated by serology, but the viral RNA nucleotide sequence is different for each genotype. There is increasing evidence for the zoonotic origin of infections with genotype 3 and 4 (Purcell et al 2008). Swine HEV sequences closely related to human HEV sequences have been detected in many countries and in several cases the source of infection has been linked to contact with swine or ingestion of undercooked swine meat.

Swine HEV infection generally occurs at about 2-3 month of age in commercial farms. Pigs naturally infected are asymptomatic and appear clinically normal, bat they do show anti-HEV antibodies, viremia and virus excretion (Meng et al 1997). Swine HEV viremia and faecal virus shedding generally occur in pigs of 2 to 4 month of age (Kasorndorkbua et al 2004).

The aim of this study was to clarify if HEV infection is present Romanian wild boar population from Iaşi County. Also were serologically tested samples from pigs imported from two European countries.

MATERIALS AND METHODS

For the purpose of the study 90 blood samples of wild boars, from 10 forest districts from Iaşi County were collected. Also 79 blood samples were collected from clinically healthy pigs imported from two countries: Holland and Spain. The ages of the pigs ranged from 3 months to 10 months. The samples were collected in short time after the pigs were imported. For the preservation of samples

prior to the analysis blood serums, after centrifugal separation, were stored at -20^{0}C. All serum samples were tested for IgG antibodies against HEV (anti-HEV) by enzyme immunoassay.

For the detection of anti-HEV antibodies was used the Genelabs ELISA kit produced by MP Biomedicals, according to the manufacturer's recommendations and modified using anti-swine IgG horseradish peroxidase enzyme conjugate. The absorbance was determined at 450 nm, with the reference wavelength at 620 nm (Tecan Sunrise). Blank solution, non-reactive and reactive controls were included for each plate.

RESULTS AND DISCUSSION

The results showed that only four serums (4.44%) of 90 samples tested that were taken from wild boars were positive in anti-HEV IgG. Here we report for the first time the presence of HEV infection in romanian wild boars. First evidence of wild boars as HEV reservoirs for human was reported in Japan after consumption of undercooked meat (Li et al 2005). Moreover, detection of HEV evidenced that the virus was circulating in the wild boars population in European countries as Spain, Germany and Italy (Martelli et al 2008). More than 40% of the studied wild boars in Spain had anti-HEV IgG, IgA or IgGM antibodies and around 20% of them were PCR positive (de Deus et al 2008). In Germany from 89 sera tested using the real time-PCR protocol, 5.3% gave a positive result (Kaci et al 2008). Therefore, the relevance of the wild boar as a potential HEV reservoir for both human and domestic animals is of concern.

Sera from 79 swine were collected from different age categories and tested for anti-HEV antibodies, than optical density (OD) values were analyzed.

Table 1. Category and origin of the pigs

Age	Number of serums tested	Country of origin
6 month	21	Holland
10 month	21	Spain
4 month	28	Holland
3 month	9	Holland

The average HEV seroprevalence for pig samples was 20.25% (16 out of 79). Serological data revealed that circulation of HEV occurs at the end of the nursery or the beginning of the fattening period, suggesting that concentrations of maternal antibodies decline rapidly after weaning. Similar results were obtained in Spain after a study made on 41 farms, where the mean anti-HEV IgG seroprevalence was 42.6±24.4% (Seminati et al 2008).

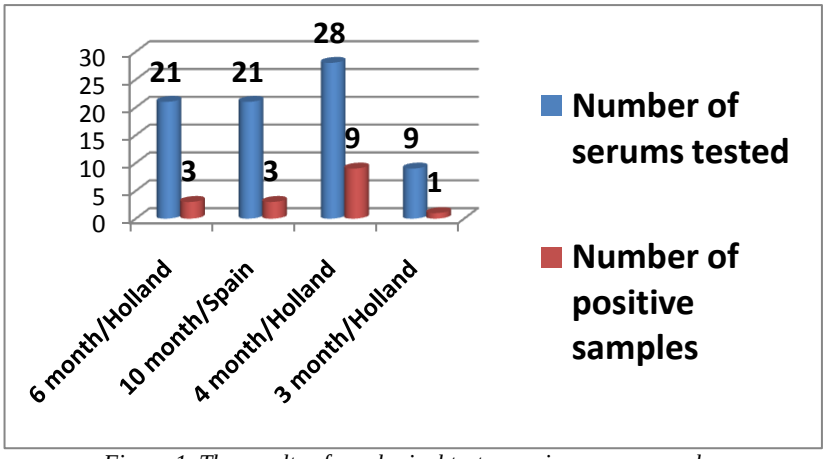


Figure 1. The results of serological test on swine serum samples

Other serological studies of our research team (Savuţa et al 2007), about swine HEV in the East region of Romania indicated the presence of the infection in pigs from farms and household system. Our results confirm that wild boars together with domestic pigs may represent an important animal reservoir of HEV infection.

Swine HEV infection seems to be widespread in many European countries. The importance of HEV in romanian pigs as a cause of the diseases is unknown, but the abundant presence of infected pigs raises the concern of potential zoonotic transmission of the virus infection.

CONCLUSIONS

1. The positive serums representing 4,44% in wild boars and 20,25% in pigs were detected using un human ELISA kit adapted for swine.
2. Even though the virus presence was not detected, antibodies evidence show as HEV circulation among wild and domestic swine in Iaşi county.

REFERENCES

1. De Deus N., Peralta B., Pina S., Allepuz A., Mateu E., Vidal D., Riuz-Fons F., Martin M., Gortazar C., Segales J. – Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (Sus scrofa) in Spain. Veterinary Microbiology 129, pg. 163-170, 2008.
2. Li T.C., Chijiwa K., Sera N., Ishibashi T., Etoh Y., Shinohara Y., Kurata y., Ispida M., Sakamoto S., Takeda N., Miyamura T. – Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. Emerging Infectious Diseases 11, pg. 1958-1960, 2005.
3. Kaci S., Nockler K., Johne R. – Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. Veterinary Microbiology 128, pg. 380-385, 2008.
4. Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F.,Thomas P.J., Meng X.J., Halburg P.G. – Route of transmission of swine hepatitis E in pigs. Journal of Clinical Virology, pg. 5047-5052, 2004.
5. Martelli F., Caprioli A., Zengarini M., Marata A., Fiegna C., Di Bartolo I., Ruggeri F.M., Delogu M., Ostanello F. – Detection of hepatitis E virus (HEV) ina demographic managed wild boar (Sus scrofa scrofa) population in Italy. Veterinary Microbiology 126, pg. 74-81, 2008.
6. 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. – 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 94, pg. 9860–9865, 1997.
7. Purcell R.H., Emerson S.U. – Hepatitis e: an emerging awareness of an old disease. Journal of Hepatology 48, pg. 494-503, 2008.
8. Savuţa Gh., Aniţă A., Aniţă D., Ludu L., Pavio N. - Preliminary epidemiological investigations regarding hepatitis E virus infection in swine from the north-east of Romania. Bulletin USAMV-CN, 64, ISSN 1454-2382, 2007.
9. Seminati C., Mateu E., Peralta B., de Deus N., Martin M. – Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. The Veterinary Journal 175, pg.130-132, 2008.
10. Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H - 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), pg. 5371-5374, 2004.

NIVELUL REZIDUURILOR DE CADMIU DIN MIERE PRIN METODA SPECTROFOTOMETRIEI DE ABSORBŢIE ATOMICĂ

EVALUATION OF CADMIUM RESIDUES LEVEL FROM HONEY BY ATOMIC ABSORBTION SPECTROFOTOMETRY METHOD

M. E. BÎRSĂ, ŞINDILAR E. , Aida ALBU

Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară – Iaşi

Heavy metals in honey are of interest not only for quality control, but also for determination environmental contamination.

The objective of this work was to determine the levels of cadmium in honey. Forty honey samples were harvested from different areas of Moldavia during 2006–2007 year.

The quantitative determination of Cd in samples was made using an absorption spectrophotometry method.

The means contents for the element determined were found to be: 0,002 mg/kg Cd in 2006 and 0,001 mg/kg Cd in 2007 in acacia honey and in mixed flowers honey were: 0,003 mg/kg Cd in 2006 and 0,002 mg/kg Cd in 2007 year. Levels of cadmium residues in all samples of honey were low and the assessed values were under the maximal limits established by the the Regulation of the European Parliament and of the Council 2007/333/CE and by the ANSVSA Romanian Order no. 82/2005.

Key words: atomic absorption spectrofotometry method, cadmium, honey

Cadmiul (Cd) este unul dintre cele mai toxice metale din mediul înconjurător alături de mercur, plumb şi arsen (10). Cadmiul are o mobilitate ridicată, este slab reţinut de sol şi uşor absorbit de către plante (raportul dintre concentraţia cadmiului din sol şi cea din plante este de 1:10). El este prezent nu numai în sol ci şi în toate ţesuturile la plante şi la animale, uneori în concentraţii importante dar fără să aibă o funcţie esenţială (3).

Gradul de poluare a mediului înconjurător este un element principal în evaluarea stării de sănătate a populaţiei, a speciilor de animale precum şi a calităţii produselor alimentare.

Albinele considerate bioindicatori ai poluării mediului, recoltează pentru necesităţile proprii de dezvoltare nectar, mană, substanţe răşinoase, polen şi apă din mediul înconjurător. Mierea de albine este apreciată ca un aliment valoros datorită funcţiei sale energetice şi a însuşirilor organoleptice particulare; proprietăţile sale curative o încadrează în categoria aliment-medicament (8). Metalele grele, cum ar fi Pb şi Cd în miere sunt de interes pentru controlul calităţii şi pot fi utilizate ca un indicator de poluare a mediului (6).

Scopul acestui studiu desfăşurat pe o perioadă de doi ani (2006 şi 2007), a fost de a evalua concentraţia de cadmiu în mierea provenită din diferite zone ale Moldovei.

MATERIAL ŞI METODĂ

În anii 2006 şi 2007 au fost colectate patruzeci mostre de miere de două tipuri: de salcâm şi polifloră, din diferite zone ale Moldovei.

Recoltarea şi pregătirea probelor de miere pentru analiză s-a făcut cu respectarea normelor prevăzute în standardele actuale şi a normelor sanitar veterinare în vigoare. Determinarea concentraţiei de Cd din probe s-a făcut prin metoda spectrofotometriei de absorbţie atomică (AAS) în flacără.

Rezultatele analizelor au fost exprimate în mg/kg miere.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Concentraţiile medii de cadmiu din cele două tipuri de miere analizate în anii 2006 şi 2007 sunt prezentate în tab. 1 şi 2. şi reprezentate grafic, cumulat pe cei doi ani în fig.1.

Tabel 1

Concentraţia medie de cadmiu în mierea polifloră, 2006-2007, mg/kg

Nr. probă	Miere polifloră	
	2006	2007
1	0.007	0.004
2	0.001	0.003
3	0.004	0.003
4	0.002	0.003
5	0.003	0.003
6	0.002	0.002
7	0.006	0.002
8	0.003	SLD*
9	SLD*	0.001
10	0.005	0.002
Media	0.003	0.002
LMA**	0.01	

*SLD=sub limita de detecţie

**LMA=limita maximă admisibilă-conform Ord. *ANSVSA nr. 82/2005*

Tabel 2

Concentraţia medie de cadmiu în mierea de salcâm, 2006-2007, mg/kg

Nr. probă	Miere de salcâm	
	2006	2007
1	0.001	0.001
2	0.002	0.002
3	0.004	0.003
4	0.002	0.002
5	0.003	0.001
6	0.001	0.001
7	0.001	0.001
8	SLD*	SLD
9	0.001	0.001
10	SLD	0.001
Media	0.002	0.001
LMA**	0.01	

*SLD=sub limita de detecţie

**LMA=limita maximă admisibilă-conform Ord. *ANSVSA nr. 82/2005*

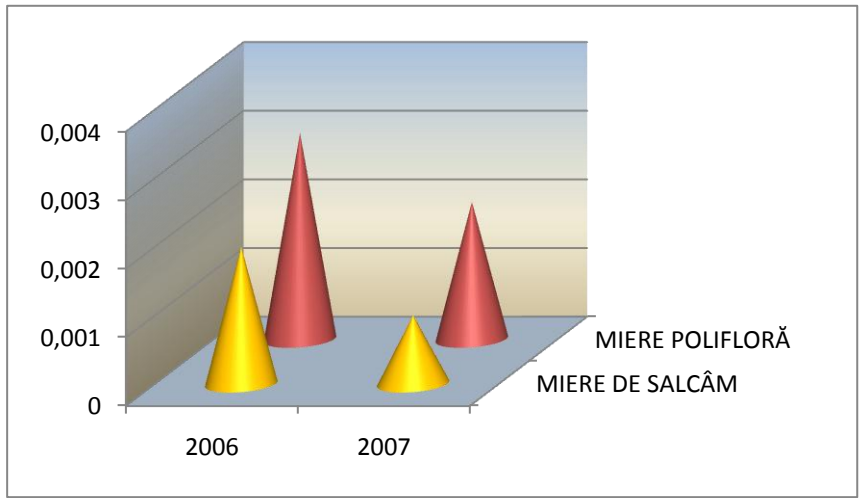


Fig. 1 Concentraţia medie de cadmiu în mierea polifloră şi de salcâm, mg/kg, 2006-2007

Conţinutul mediu de cadmiu determinat în urma analizelor efectuate la mierea polifloră în anul 2007 a fost de 0.002 ppm, mai mică decât cel găsit în 2006 de 0.003 ppm. Atât în anul 2006 cât şi în 2007, 10% din probe au prezentat un nivel a concentraţiei de Cd sub limita de detecţie.

Concentraţia medie de Cd în mierea de salcâm în anul 2006 a avut o valoare de 0.002 mg/kg iar în anul 2007 de 0.001 mg/kg. Din totalul de probe analizate de miere de salcâm, în anul 2006, 20% au avut valori medii ale concentraţiei de Cd sub limita de detecţie; în 2007, 10% din probele colectate au avut valori medii ale concentraţiei de Cd sub limita de detecţie.

Din rezultatele analizelor efectuate la probele de miere observăm faptul că nivelul conţinutului de Cd din miere este mai mic în anul 2007 faţă de 2006, precum şi faptul că în ambii ani de studiu, nivelul Cd este mai mare în mierea polifloră faţă de mierea de salcâm.

Evaluări ale concentraţiei de Cd din diferite tipuri de miere s-au efectuat în mai multe zone din România şi în străinătate:

- niveluri ale concentraţiei de cadmiu determinate în diferite tipuri de miere colectată în zona Copşa Mică au fost de: 0.008 ppm în mierea de rapiţă, 0.015 ppm în mierea polifloră, 0.017 ppm în mierea de salcâm şi 0.018 în mierea de tei (1);
- în probele de miere colectate în judeţul Constanţa, concentraţia cadmiului a variat între 0.15 ppm în mierea de salcâm şi 0.20 ppm în mierea de tei (4);
- în zona Banatului, concentraţiile de cadmiu din probele de miere de rapiţă, amestec de rapiţă şi salcâm cât şi din miere de floarea soarelui, s-au situat sub limita de detecţie (7);
- în Lituania, concentraţia de Cd din probele de miere a variat într-un interval larg, de la 4.1 µg/kg până la 14.6 µg/kg (9);
- în Spania, concentraţia de cadmiu din miere, determinată prin două metode de analiză, a variat de la 1.200 µg/kg la 1.430 µg/kg (6);
- **nivelul de cadmiu din probele de miere colectate pe parcursul a două sezoane de pe întreg teritoriul Marii Britanii a variat de la 0.3 ng/g la 300 ng/g (5);**
- valori scăzute dar pe un interval larg de variaţie a concentraţiei de cadmiu de la 2.0 µg/kg la 63.0 µg/kg s-au găsit în probele de miere colectate din zone situate în apropierea Romei, Italia (2).

Rezultatele cercetărilor acestui studiu privind prezenţa Cd în mierea de salcâm şi polifloră se află sub limitele maxime stabilite şi prevăzute de Ord.ANSVSA nr. 82/2005.

CONCLUZII

1. Concentraţia medie de cadmiu în mierea de salcâm în anul 2006 a avut o valoare de 0.002 mg/kg iar în anul 2007 de 0.001 mg/kg. În 2006, valorarea medie a concentraţiei de cadmiu a fost de 0.003 mg/kg iar în 2007 de 0.001 mg/kg la mierea polifloră.
2. Concentraţia de cadmiu a fost mai mare la mierea polifloră faţă de mierea de salcâm în cei doi ani de studiu.
3. Valorile concentraţiei de cadmiu s-au situat sub limitele maxime stabilite şi prevăzute de Ord.ANSVSA nr. 82/2005.
4. Prezenţa cadmiului în probe, impune continuarea investigaţiilor şi monitorizarea calităţii mierii.

BIBLIOGRAFIE

1. Bratu Iuliana, Georgescu Cecilia, 2005, Contaminarea chimică a mierii de albine – senzor de identificarea a mediului poluat, Journal of Central European Agriculture, vol. 6(1),pg. 467-470.
2. Conti Marcelo Enrique, Botrè Francesco,2001, Honeybees and their products as potential bioindicators of heavymetals contamination, Environmental Monitoring and Assessment, vol. 69, Edit. Kluwer Academic, Netherlands, pg. 267-282.
3. davidescu d.,1988, Chimizarea agriculturii. Microelemente în agricultură, vol VI, Edit. Academiei RSR, Bucureşti.
4. Dobrinaş Simona, Matei Nicoleta, Soceanu Alina, Birghila Semaghiul, Popescu Viorica,2006, Estimation of vitamin C and Cd, Cu, Pb content in honey and propolis, SCIENTIFIC STUDY & RESEARCH, vol. VII (4), pg. 729-734.
5. Jones K.C.,1987, Honey as an indicator of heavy-metal contamination, Water Air and Soil Pollution vol. 33(1-2),pg.179-189.
6. Muñoz Emma, Palmero Susana, 2006, Determination of heavy metals in honey by potentiometric stripping analysis and using a continuous flow methodology, Food Chemistry,vol. 94, pg.478-483.
7. Pătruică Silvia, Jivan A., Hărmănescu Monica,2008, Researches regarding the mineral content of honey brands rise from Banat area, Buletin USAMV Animal Science and Biotechnologies Cluj-Napoca, Edit. Academic Press, Cluj-Napoca, vol. 65(1-2), pg.446
8. Sfetcu Ionica,2007, Salubritatea produselor apicole-un indicator al relaţiei mediu-consumator, Teza de doctorat, USAMV Bucureşti
9. Staniškienė Birutė, Matusevičius Paulius, Budreckienė Rūta, Sinkevičienė Ingrida,2007, determination of heavy metals concentration in honey and fish using MS–ICP model, VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA. T., vol.39(61), on line www.lva.lt/vetzoo/data/vols/2007/39/en/staniskiene.pdf
10. Şuţeanu Em., Danielescu N., Popescu D., Trif Alexandra,1995, Toxicologie şi Toxicoze. Edit. Did. şi Pedag., Bucureşti.

NIVELUL REZIDUURILOR DE PLUMB ÎN MIEREA DE SALCÂM ŞI POLIFLORĂ

LEAD RESIDUES LEVEL IN ACACIA AND MIXED FLOWERS HONEY

M. E. BÎRSĂ, E. ŞINDILAR, Aida ALBU
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară – Iaşi

The goal of the present work was to evaluate the level of lead residues from acacia and mixed flowers honey. Forty samples of honey were harvested and analysed using atomic absorption spectrofotometry method to evaluate the metal residues during 2006-2007 years.

The mean values of the lead residues were: 0,05 mg/kg Pb in 2006 and 0,03 mg/kg Pb in 2007 in mixed flowers honey; for acacia honey the results were 0,02 mg/kg Pb in 2006 and 0,01 mg/kg Pb in 2007.

The residue levels of Pb were under the maximal limits for honey substrates as stipulated by the Regulation of the European Parliament and of the Council 2007/333/CE and by the ANSVSA Romanian Order no. 82/2005.

The investigated honey samples did not have toxicological risk for human health.

Key words: lead, honey, environment

Plumbul este considerat un poluant major al mediului înconjurător, ce contribuie la contaminarea tuturor nivelurilor din lanţul trofic datorită folosirii lui în cantităţi mari în diverse activităţi umane (4).

Mierea posedă numeroase proprietăţi nutriţionale, de vindecare, şi profilactice. Toate acestea sunt o consecinţă directă a compoziţiei chimice a acestui produs. Pentru a beneficia de proprietăţile deosebite pe care le are mierea, aceasta trebuie să nu fie contaminată de agenţi poluanţi (2).

Abordarea problemei calităţii mierii din punct de vedere a siguranţei alimentare, a fost pusă nu numai din perspectiva prezenţei în bazinele melifere a unor plante susceptibile a fi la originea mierii toxice (1), ci şi din perspectiva prezenţei unor poluanţi chimici. Metalele grele în miere sunt de interes pentru controlul calităţii şi pot fi utilizate ca un indicator de mediu (3, 10).

Mierea poate caracteriza nivelul de poluare a solului, a plantelor şi a aerului pe o zonă de câţiva kilometri pătraţi (8). Atât albinele cât şi produsele lor sunt considerate bioindicatori ai poluării mediului. Conţinutul de plumb în miere constituie un criteriu de apreciere a stării de poluare a zonei de colectare a probelor (9).

Scopul acestui studiu a fost de a evalua concentraţia de plumb în mierea provenită din diferite stupine ale producătorilor particulari din judeţul Vaslui.

MATERIAL ŞI METODĂ

În anii 2006 şi 2007 au fost colectate câte zece mostre de miere de salcâm şi polifloră. Mierea a provinit din diferite stupine ale producătorilor particulari din judeţul Vaslui.

Recoltarea şi pregătirea probelor de miere pentru analiză s-au făcut cu respectarea normelor prevăzute în standardele actuale şi a normelor sanitar veterinare în vigoare.

Determinarea concentraţiei de Pb din probe s-a făcut prin metoda spectrofotometriei de absorbţie atomică (AAS) în flacără cu arzător alimentat cu un amestec de acetilenă-aer, utilizînd aparatul cu flacără GBC-AVANTA. Rezultatele analizelor au fost exprimate mg/kg (ppm).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Concentraţiile medii de plumb din cele două tipuri de miere analizate în anii 2006 şi 2007 sunt prezentate în tab. 1 şi 2 şi reprezentate grafic în fig.1.

Tabel 1

Concentraţia medie de plumb în mierea polifloră, 2006-2007, mg/kg

Nr. probă	Miere polifloră	
	2006	2007
1	0.06	0.04
2	0.03	0.01
3	0.06	0.03
4	0.04	0.02
5	0.03	0.04
6	0.04	0.02
7	0.05	0.05
8	0.07	0.04
9	0.05	0.01
10	0.03	0.02
Media	0.05	0.03
LMA*	0.20	

*LMA=limita maximă admisibilă-conform Ord. ANSVSA nr. 82/2005

Tabel 2

Concentraţia medie de plumb în mierea de salcâm, 2006-2007, mg/kg

Nr. probă	Miere de salcâm	
	2006	2007
1	0.01	0.01
2	0.02	0.02
3	0.03	0.03
4	0.02	0.02
5	0.03	0.02
6	0.03	0.01
7	0.01	0.01
8	SLD*	SLD
9	0.01	0.01
10	SLD	SLD
Media	0.02	0.01
LMA**	0.20	

*SLD=sub limita de detecţie

**LMA=limita maximă admisibilă-conform Ord. ANSVSA nr. 82/2005

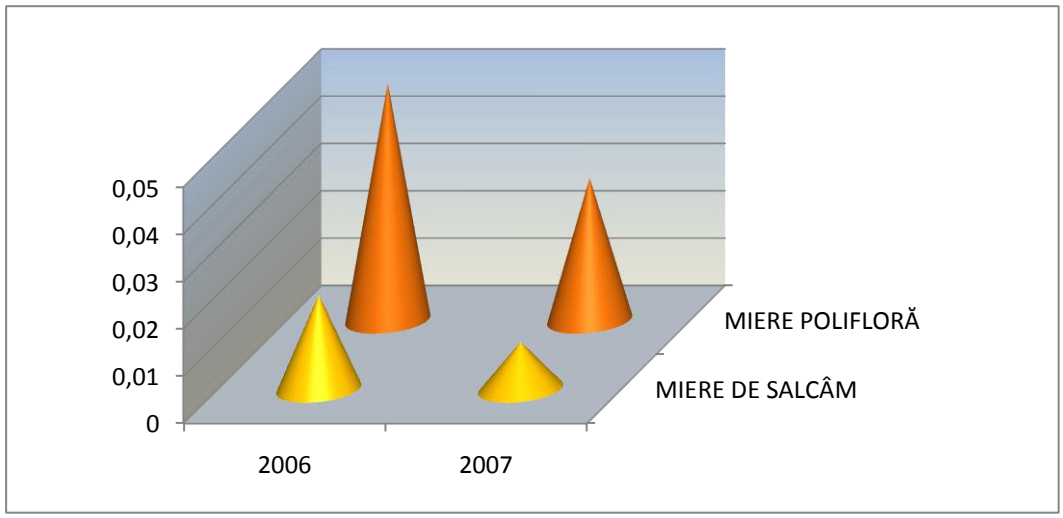


Fig.1 Concentraţia medie de plumb în mierea polifloră şi de salcâm, mg/kg, 2006-2007

Rezultatele analizelor efectuate la mierea polifloră în anii 2006 şi 2007, au arătat că la toate probele, plumbul s-a găsit în cantităţi detectabile. În 2006, valorarea medie ale concentraţiei de plumb a fost de 0.05 mg/kg iar în 2007 de 0.03 mg/kg. Comparativ, valoarea medie ale concentraţiei de plumb a fost mai scăzută în anul 2007 faţă de 2006.

Concentraţia medie de plumb în mierea de salcâm în anul 2006 a avut o valoare de 0.02 mg/kg iar în anul 2007 de 0.01 mg/kg. Din totalul de probe analizate de miere de salcâm, atât în anul 2006 cât şi în anul 2007, 20% au avut valori medii ale concentraţiei de plumb sub limita de detecţie.

Din rezultatele analizelor efectuate la cele două tipuri de miere în timpul celor doi ani de studiu, se observă o concentraţie de plumb mai mare la mierea polifloră faţă de mierea de salcâm.

Investigaţiile întreprinse din străinătate, făcute pe diferite tipuri de miere legate de gradul de poluare cu metale grele au indicat prezenţa plumbului: în Spania, concentraţia de plumb din miere a avut o valoare medie de 0.023 mg/kg (10), în Slovenia, valoarea concentraţiei medii a Pb în mierea de salcâm a variat între 1.86 mg/kg şi 4.3 mg/kg (6); plumb s-a regăsit şi în mierea colectată din Lituania, valorile concentraţiei de Pb variind în intervalul 2.9 µg/kg ÷ 22.1 µg/kg (13).

În ţara noastră, au fost făcute evaluări ale concentraţiei de plumb, în diferite zone, unele dintre ele considerate ca fiind poluate, astfel:

- niveluri ale concentraţiei de plumb determinate în diferite tipuri de miere colectată în zona Copşa Mică au fost de 0.03 ppm în mierea de rapiţă, 0.07 ppm în mierea polifloră, 0.089 ppm în mierea de salcâm şi 0.09 în mierea de tei (2); în probele colectate de miere de rapiţă şi de floarea soarelui din zona Banatului nu s-au găsit concentraţii detectabile de plumb (11);
- în probele de miere colectate în judeţul Constanţa, concentraţia plumbului a variat între 0.03 ppm în mierea de salcâm şi 0.05 ppm în mierea de tei (5);
- prezenţa plumbului a fost studiată şi în probele de miere de albine din judeţul Timiş; concentraţia medie a plumbului a fost de 0.09 ppm în mierea polifloră şi de salcâm în anul 2006 (7);
- timp de patru ani s-a realizat un studiu legat de nivelul concentraţiei de plumb în diferite varietăţi de miere: floarea soarelui, polifloră şi de salcâm. Rezultatele concentraţiei medii de plumb de 0.871 ppm în mierea de floarea soarelui, 0.838 ppm în mierea polifloră şi respectiv de 0.817 ppm în mierea de salcâm, nu au evidenţiat diferenţe mari cele trei sortimente (14);
- prin determinarea concentraţiei de plumb din miere în funcţie de intensitatea circulaţiei din zona de amplasare a stupinelor, s-a observat că mierea de salcâm colectată de la stupinele aflate în imediata apropiere de drumul principal (1.05 ppm Pb) a avut o cantitate mai mare de plumb faţă de mierea de salcâm colectată de la stupinele aflate în apropierea drumurilor auxiliare (0.2 ppm Pb) (12).

Investigaţiile din ţară şi din străinătate, făcute pe diferite sortimente de miere, legate de gradul de poluare cu metale grele, au arătat faptul că acest aliment poate fi considerat un senzor a mediului poluat.

Rezultatele cercetărilor acestui studiu privind prezenţa Pb în mierea de salcâm şi polifloră, prin comparare cu datele obţinute din alte investigaţii din ţară şi străinătate, sunt scăzute şi se află sub limitele maxime stabilite şi prevăzute de Ord.ANSVSA nr. 82/2005.

CONCLUZII

1. În 2006, valorarea medie a concentrației de plumb a fost de 0.05 mg/kg iar în 2007 de 0.03 mg/kg la mierea polifloră.
2. Concentrația medie de plumb în mierea de salcâm în anul 2006 a avut o valoare de 0.02 mg/kg iar în anul 2007 de 0.01 mg/kg
3. În cei doi ani de studiu, s-a remarcat o concentrație de plumb mai mare la mierea polifloră față de mierea de salcâm.
4. Valorile concentrației de plumb s-au aflat sub limitele maxime stabilite şi prevăzute de Ord. ANSVSA nr. 82/2005.

BIBLIOGRAFIE

1. Bondoc I., Diana Bondoc, Şindilar E.,1999, Mierea naturală toxică, Rev. Rom. Med. Vet., vol. 9(3), pg.289-297.
2. Bratu Iuliana, Georgescu Cecilia, 2005, Contaminarea chimică a mierii de albine – senzor de identificarea a mediului poluat, Journal of Central European Agriculture, vol. 6(1), pg. 95-98.
3. Celli Giorgio, Maccagnani Bettina,2003, Honey bees as bioindicators of environmental pollution, Bulletin of Insectology. vol. 56(1), pg. 137-139.
4. Clarke E.G.C, Clarke Myra L., 1975 , Veterinary toxicology, Ed. Bailliere, Tindalle, Lodon UK.
5. Dobrinaş Simona, Matei Nicoleta, Soceanu Alina, Birghila Semaghiul, Popescu Viorica,2006, Estimation of vitamin C and Cd, Cu, Pb content in honey and propolis, SCIENTIFIC STUDY & RESEARCH, vol. VII (4), pg. 729-734.
6. Golob T., Doberšek U., Kump P., Nečemer M.,2005, Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy, Food Chemistry, vol. 91,pg.593-600.
7. Harmanescu Monica, Popovici Daniel, Gergen Iosif, Heavy metals contents for different honey samples from Berini, Timiş country,2008, Journal of EcoAgriTourism, Proceeding of the International Conference BIOATLAS, vol.1, Edit. Universității Transilvania din Braşov,pg.205-207.
8. Jones K.C.,1987, Honey as an indicator of heavy-metal contamination, Water Air and Soil Pollution vol. 33(1-2),pg.179-189.
9. Leita L., Muhlbachova G., Cesco S., Barbatrini R., Mondini C.,1996, Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination, Environmental Monitoring and Assessment, vol. 43, pg.1-9.
10. Muñoz Emma, Palmero Susana, 2006, Determination of heavy metals in honey by potentiometric stripping analysis and using a continuous flow methodology, Food Chemistry,vol. 94, pg.478-483.
11. Pătruică Silvia, Jivan A., Hărmănescu Monica, 2008, Researches regarding the mineral content of honey brands rise from Banat area, Buletin USAMV Animal Science and Biotechnologies Cluj-Napoca, Edit. Academic Press, Cluj-Napoca, vol. 65(1-2), pg.446
12. Sfetcu Ionica, 2007, Salubritatea produselor apicole-un indicator al relației mediu-consumator, Teza de doctorat, USAMV, Bucureşti.
13. Staniškienė Birutė, Matusevičius Paulius, Budreckienė Rūta, Sinkevičienė Ingrida,2007, determination of heavy metals concentration in honey and fish using MS–ICP model, VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA. T., vol.39(61). on line *www.lva.lt/vetzoo/data/vols/2007/39/en/staniskiene.pdf*
14. Tudoreanu Liliana, Crivineanu V., Goran G.V., Codreanu M.D.,2008, Models (NOMINAL LOGISTIC REGRESSION AND ANOVA) for lead accumulation in honey, Buletin USAMV Veterinary Medicine, 65(2),pg.371.

CONTAMINAREA FUNGICĂ A UNOR SORTIMENTE DE BRÂNZETURI PROVENITE DIN REŢEAUA ALIMENTARA

FUNGAL CONTAMINATION OF SOME KIND OF CHEESE FROM COMMERCIAL CHAIN

BOBUTAC MARIA NICOLETA
FMV-Iaşi

It was examinated 51 samples of chees from the commercial chain, from wich: 17 samples of cow cheese, 11 buffalo chees, 7 cheese in skin and 7 pressed chees.

*After the mycological exam it was observed that 29 (56,8%) of the samples were contaminated with yeast and filamentous fungi. The total number of colony formatting units per gram product (CFU/g) varied between <10 and 2, 4*105 UFC/g.*

Were identified the following genera of yeasts: Geotrichum, Trichosporon and Candida upon the physiological and morphological aspects.

Key words: fungi, dairy products, contamination

INTRODUCERE

Fungii şi levurile din produsele lactate pot produce uneori consumatorilor probleme, atât prin modificarea insusirilor organoleptice cît si prin pierderi economice. Fungii si levurile prezente frecvent in laptele crud nu rezistă pasteurizarii, prezența lor in lapte si produsele lactate datorându-se recontaminării acestora in timpul procesarii. Contaminarea produselor lactate, in special a brânzeturilor, este datorată fungilor si levurilor prezenți in mediul ambiant (cum ar fi pereții si rafturile din incăperile pentru maturare, aerul, echipamnetele, apa, laptele, saramura,etc.)

Levurile care deterioreaza produsele lactate sunt acelea care fermentează lactoza, acestea au o crestere rapidă, inducând o aromă caracteristică de drojdie sau fructe fermentate si producând un gaz evident.

Prezența anumitor tulpini de fungi filamentoşi şi levuriformi este indezirabilă, deaorece ei pot afecta caracterele organoleptice ale brânzeturilor, putând produce micotoxine si reprezintă un risc potențial pentru sănătate.

MATERIAL SI METODE

Calitatea celor 51 probe de brânzeturi a fost apreciată prin examene organoleptice şi investigații micologice cantitative şi calitative.

Examenul micologic cantitativ a fost realizat prin metoda diluțiilor seriate, prima diluție a fost preparată din 10 g de branză omogenizată in 90 mL de ser fiziologic steril, din fiecare dilutie s-a repartizat in doua placi Petri câte 1 ml suspensie. Peste suspensia din plăcile Petri s-a turnat mediu CGA(Chloramphenicol Glucose Agar) topit si racit la 47ºC incorporând inoculul in mediu prin mişcări de lateralitate si rotație. După racirea si solidificarea mediului, plăcile au fost incubate la temperatura de 25^{o}C timp de 5 zile.

În vederea identificării şi incadrării taxonomice a tulpinilor izolate, acestea au fost pasate pe PDA (Potato Dextrose Agar), astfel incat sa se obtina colonii izolate dupa incubare.

Fiecare colonie diferită morfologic a fost din nou transferată pe mediu PDA şi incubate la temperatura de 25ºC timp de 5 zile. Prima clasificare a coloniilor de pe mediul solid s-a bazat pe aspecul macroscopic (culoarea coloniei, forma si culoarea reversului) şi microscopic, coroborându-se

aspectele culturale si particularitaţile corpilor fructificanţi ale micromicetilor. Pentru diferenţierea genului *Geotrichum* de genul *Trichosporon* s-a utilizat testul de producere a ureazei.

REZULTATE SI DISCUŢII

Calitatea produselor examinate pe baza insuşirilor organoleptice s-a înscris in exigenţele normelor in vigoare în cazul a 47 (92,2%) de probe, restul de 4 probe s-au dovedit improprii consumului datorită unor însusiri organoleptice modificate.

Examenul micologic cantitativ a relevat ca 29 de probe (56,8%) au fost contaminate cu fungi filamentoşi si levuriformi. Limitele de variatie ale acestora oscilând intre $<10^1$…$2,4*10^5$ UFC/g produs.

Fig. 1. Telemea de vacă- examen micologic cantitativ

Fig. 2. Brânză de burduf- examen micologic cantitativ

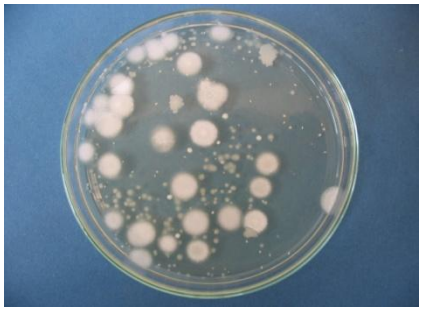


Fig. 3. Telemea de bivoliţă - examen micologic cantitativ

Fig. 4. Telemea de oaie – examen micologic cantitativ

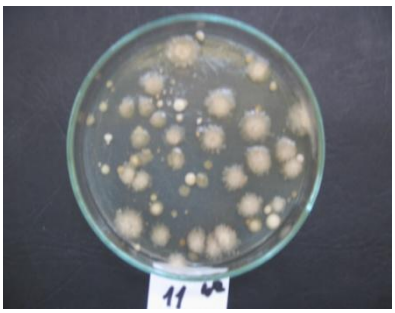


***Fig. 5**. Caşcaval - examen micologic cantitativ*

Gradul de contaminare a sortimentelor de brânza examinate nu a fost uniform (Tabel. Nr. 1), el a prezentat valori variabile in funcţie de natura produsului. Astfel, 11 din 17 probe de telemea de vacă (64,7%), 7 din 11 probe telemea de oaie (63,6%),5 din 9 probe de telemea de bivoliță (55,5%), 4 din 7 probe de brânză de burduf (57,2%) si 2 din 7 probe de caşcaval (28,8%) au evidențiat un grad ridicat de contaminare fungică, depăşind limitele maxime admise de standardul in vigoare(....).

Tabel nr.1 Gradul de contaminare micotică a probelor analizate

Nr. Crt.	Denumire sortiment	Nr. probe	Nr. de probe contaminate(%)	Numarul de unități formatoare de colonii per gram (UFC/g)
1.	Telemea de vacă	17	11(64,7%)	$m<10^1$ $M=2,3x10^5$
2.	Telemea de oaie	11	7(63,6%)	$m<10^1$ $M=1,7x10^5$
3.	Telemea de bivoliță	9	5(55,5%)	$m<10^1$ $M=2,1x10^5$
4.	Brânză de burduf	7	4(57,2%)	$m<10^1$ $M=2,4x10^5$
5.	Caşcaval	7	2(28,8%)	$m<10^1$ $M=3,7x10^3$

Legenda:m=incarcatura minima decelata
M=incarcatura maxima decelata

Examenul micologic calitativ a evidențiat o floră micotică destul de variată, cantonată totuşi in cea mai mare parte în spectrul levuric. Au fost identificate levuri apartinând genurilor *Candida, Geotrichum* si *Trichosporon.*

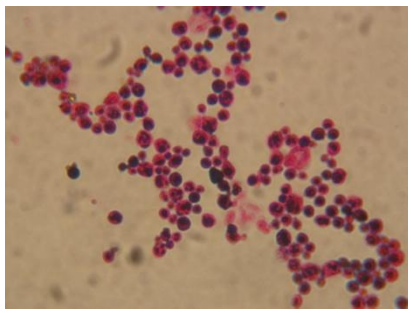


Fig.6. *Candida sp.-aspect microscopic, frotiu col. GRAM, x90*

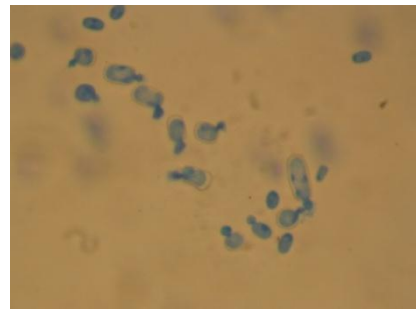


Fig. 7. *Candida sp.-aspect microscopic, preparat cu lactofenol , x40*

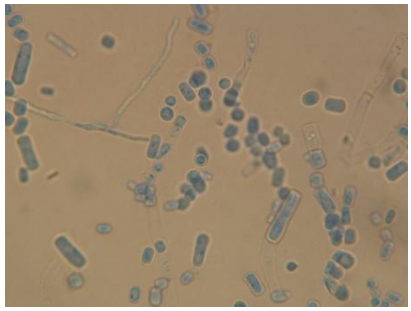


Fig. 8*.Geotrichum sp.-aspect microscopic Preparat cu lactofenol, x40*

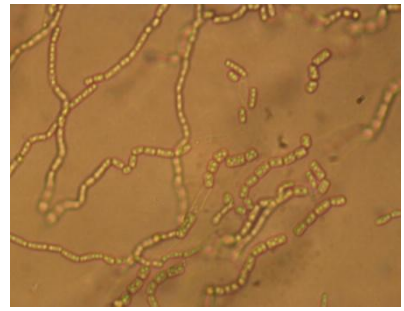


Fig.9.*Trichosporon sp.-aspect microscopic Preparat extemporaneu, x40*

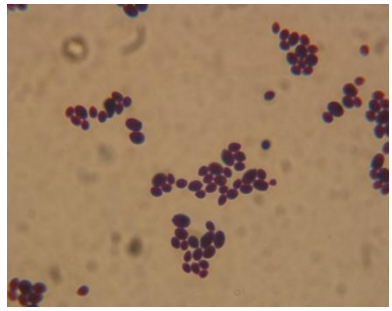


Fig.10*. Candida sp.-aspect microscopic, frotiu Col.GRAM, x90*

CONCLUZII

1. Au fost examinate organoleptic, respectiv micologic calitativ si cantitativ 51 probe de branzeturi din care 17 telemea de vacă, 11 telemea de oaie,9 telemea de bivolită, 7 brânză de burduf si 7 caşcaval.

2. 4 din cele 51 de probe s-au dovedit improprii consumului datorita însuşirilor organoleptice modificate.

3. Examenul micologic cantitativ a evidenţiat o încărcătură micotică polimorfă, cantonată totuşi în spectrul levuric, cu limite de variaţii între $<10^1 \ldots 2,4*10^5$.

4. Examenul micologic calitativ a permis izolarea şi dentificarea unor suşe levurice apartinânâd genurilor *Candida ,Geotrichum* si *Trichosporon.*

BIBLIOGRAFIE

1. G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené and M.J. Figueras (2000)-Atlas of Clinical Fungi ,2rd edition
2. Coman si M.Mares(2000)-Micologie medicala aplicata,Ed.Junimea,Iaşi
3. K.Godik Torkar., A.Vengust-The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia (2007), Food control
4. S. Senses-Ergul., R . Agoston., A. Belak and T.Deak (2006)-Characterization of some yeast isolated from foods by traditional and molecular tests., International Journal of Food Microbiology 108, (2006) 120-124

CERCETARI ETIOLOGICE ŞI EPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECŢIILE BACTERIENE DIGESTIVE LA PUII PENTRU CARNE CRESCUŢI LA SOL

ETIOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL RESEARCHES REGARDING DIGESTIVE BACTERIAL INFECTIONS IN BROILER CHICKENS GROUND BRED

BUSUIOC OANA
S.C. Vis Agri S.R.L. - Buzău

Researches had in view the digestive bacterial flora in broiler chickens ground bred on permanent bedding within the farm S.C. VIS AGRI S.R.L. from 0 to 42 days.

To isolate the bacterial flora, inseminations were made from intestinal content, liver, nutritive bag, (vitelline), unopened long bone and heart from 728 dead bodies, on usual mediums (gelose, nutritive bullion and bullion with liver) but also on selective and enrichment mediums (Chapmann, Istrate-Meitert, Drigalsky).

The identification of the isolated germs was made on the basis of morphological, cultural and biochemical characteristics.

197,000 broiler chickens died of those 5,631,109 which populated those 13 series, meaning 3.46%. The bacteriological examination effectuated on samples taken from 728 dead bodies allowed the isolation of a mixed bacterial flora, represented by Escherichia coli, Streptococus spp., Clostridium perfringens, Pseudomonas aeruginosa, Campylobacter jejun/colii.

The isolated strains have been identified as: Escherichia coli 226 (31.04%) strains, Streptococus spp.28(3.8%) strains, Clostridium perfringens 50(6.86%) strains, Pseudomonas aeruginosa 34(4.6) strains, Campylobacter coli/ jejuni 18(2.47)strains.

Key words: etiology, bacterial infections, broiler chickens, ground.

Cauzele mortalitatilor sunt multiple iar flora bacteriana întâlnită diferă în funcţie de originea puilor, de condiţiile de întreţinere, vârsta puilor, managementul tehnologic precum şi de calitatea furajelor. Astfel, Kostakev(1963) comunică o septicemia cu Streptococcus faecalis şi Streptococcus faecium la puii de găină imediat dupa eclozionare, presupunând ca sursă primară de infecţie, a constituit-o intestinul.

Deoarece la unele serii de pui broiler crescuţi la sol în sistem intensiv au fost înregistrate procente diferite de mortalitate atât ca număr cât şi ca perioadă, ne-am propus a investiga flora bacteriana responsabila de aceste pierderi.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe un numar de 13 serii a 5.631.109 pui la populare cu vârste cuprinse intre 0 şi 42zile, urmarindu-se mortalitatea şi flora bacteriană.

Pentru izolarea florei bacteriene, însămânţările s-au efectuat de la 728 cadavre, din continutul intestinal, ficat, sac nutritiv (vitelin), os lung nedeschis şi cord, pe medii uzuale aerobe şi anaerobe(geloză, bullion nutritiv şi bullion cu ficat), dar şi pe medii selective şi de îmbogăţire (Chapmann, Drigalsky, Istrate-Meitert)

Identificarea germenilor izolaţi s-a făcut pe baza caracterelor morfologice, culturale şi biochimice.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din investigaţiile epidemiologice rezultă că din cei 5.631.109 pui broiler care au populat cele 13 serii, au murit un număr de 197.000, ceea ce reprezintă 3,46%.

În urma examenului bacteriologic efectuat, pe probe recoltate de la 728 cadavre, s-a izolat o floră bacteriană mixtă, reprezentată de mai multe entităţi microbiene (tabelul 1şi fig.1)

Tabelul 1 Rezultatul examenului bacteriologic

Nr. serie	Nr. Probe	Escherichia coli		Streptococcus		Pseudomona aeruginosa		Campylobacter coli/jejuni		Clostridium perfringens		Staphylococus aureus	
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr	%	Nr	%	Nr.	%
Total	728	226	31.04	37	3,8	34	4,6	18	2,47	50	6,86	23	3,15

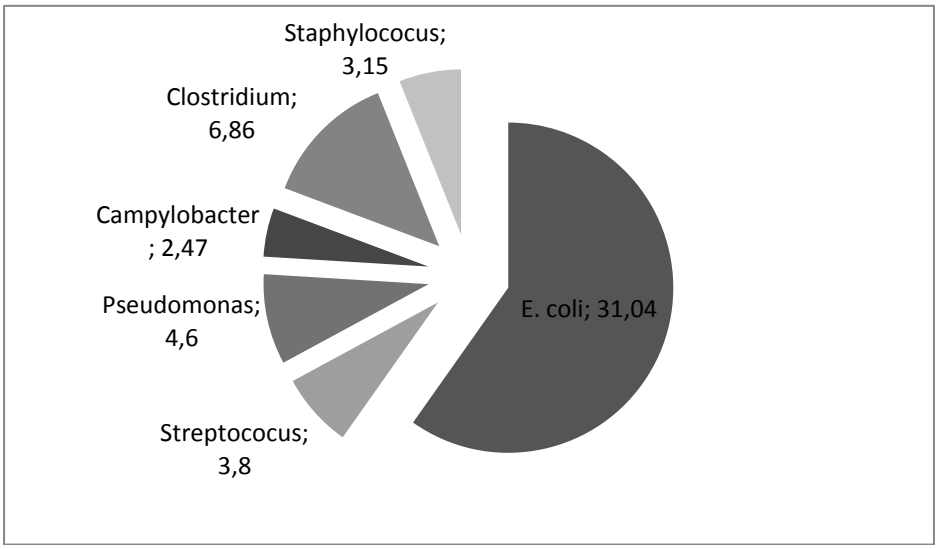


Fig. 1. Rezultatul examenului bacteriologic

Din analiza rezultatelor se observa ca însămânţările efectuate pe medii de cultură din cele 728 de cadavre s-au izolat 388 tulpini bacteriene, identificate ca: Escherichia coli 226(31,04) tulpini, Streptococus spp.28(3,8) tulpini, Pseudomonas aeruginosa 34 (4,6%) tulpini, Campylobacter jejuni si coli 18 (2,47) tulpini, Clostridium perfringens 50 (6.86) tulpini şi Staphylococus aureus 23 (3,15) tulpini.

De asemenea, se constată că flora bacteriană întalnită cel mai frecvent la puiul broiler, indiferent de sezon şi vârstă este reprezentată de Escherichia coli in proportie de 31,04% . Deoarece de la unele cadavre s-a izolat o floră asociată constituită din Escherichia coli şi Clostridium perfringens , sau Escherichia coli, Streptococus spp. şi Clostridium perfringens, este posibil ca asocierea acestora să ducă la potenţarea capacităţii infectante şi deci a multiplicării lor masive în organism conditii diferite de microclimat şi furajare.

Rezultatele obţinute prezintă un important interes epidemiologic dar şi economic, intrucât pierderile cele mai mari in creşterile din sistemul intensiv sunt datorate in principal entităţilor bacteriene digestive care sunt de fapt porţi de intrare pentru pentru majoritatea germenilor patogeni. Deasemenea, constituie factor de potentare pentru creşterea patogenităţii unor germeni şi

sunt cele ce dau semnalul şi sancţionează fiecare neregulă existentă in echilibrul biologic al organismului.

Entităţile bacteriene au fost izolate în toate stadiile de creştere a puiului pentru carne; de la ziua 0 până la ziua 42.

CONCLUZII

Din investigaţiile efectuate privind flora bacteriană digestiva întâlnită la puiul broiler crescut la sol pe aşternut permanent, se desprind următoarele concluzii:

1. Investigaţiile epidemiologice efectuate evidenţiază că din cei 5.631.109 pui broiler care au populat cele 13 serii au murit un număr de 197.000 ceea ce reprezintă 3,46%.
2. Examenul bacteriologic efectuat, pe probe recoltate de la 728 cadavre, a permis izolarea unei flore bacteriene mixte, reprezentate de: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Campylobacter jejuni/coli, Clostridium perfringens şi Staphylococus aureus.
3. Cele 388 tulpini bacteriene izolate, au fost identificate ca: Escherichia coli 226(31,04%) tulpini, Pseudomonas aeruginosa 34(4,6%) tulpini, Campylobacter jejuni/coli 18(2,47%) tulpini , Clostridium perfringens 50(6.86 %) tulpini şi Staphylococus aureus 23(3,15%) tulpini.

BIBLIOGRAFIE

1. Carp Carare M., Guguianu Eleonora, Timofte Dorina,(1997) – Lucrări practice de microbiologie veterinară. U.S.A.M.V. Iaşi
2. Mânzat Moga Radu, (coordinator) (2001) – Bolile infecţioase ale animalelor – Bacterioze, Ed. Brumer, Timişoara.
3. Perianu T. (coordonator),(2003) – Bolile infecţioase ale animalelor domestice. Bacterioze. Vol I, Ed. Venus, Iaşi.
4. Răpunteanu Gh., Răpunteanu S (1999) – Bacteriologie special veterinară.Ed. Tipo Agronomia Cluj-Napoca.

RĂSPUNSUL IMUN UMORAL LA SUINE AFECTATE DE PCV2 ŞI CLINIC SĂNĂTOASE PCV2 POZITIVE

HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 INFECTED PIGS

CADAR D.[1], SPINU MARIANA[1], CSAGOLA A.[3], TUBOLY T.[3], MICLAUS V.[2], RUS V.[2], KISS TIMEA[1], KOBOLKUTI L.[1], NICULAE MIHAELA[1], URICARU A.[1], UNGVARI A.[1], RINDT KRISZTINA[1]

[1]Disciplina de Boli Infectioase

[2]Disciplina de Biologie Celulară, Histologie, şi Embriologie, USAMV, Facultatea de Medicina Veterinara, Cluj

[3]Szent István University, Faculty of Veterinary Sciences, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Budapest, Hungary

dimmuvet@yahoo.com

Circoviruses are viruses that can cause morbid entities with high economic effects both in the animal and the plant kingdom, with a main target for animal lymphoid tissues, influencing in a negative sense the functionality of the immune system and thereby inducing a very severe immunosuppression. The aim of this paper was to evidence and evaluating the changes induced by circoviral infection to different floors of the immune system, actually watching how the changes induced by infection or disease affecting the unspecific humoral defense (whole immunoglobulin and circulating immune complexes) both at PMWS and sub clinical healthy infected pigs.

Key words:porcine circovirus type 2, PMWS, immune system;

Circovirusul porcin tip 2 este cunoscut ca fiind un virus imunosupresor, cum sunt şi alte circovirusuri patogene, după cum indică şi modificările de la nivelul ţesuturilor limfoide (Gresham,1999). PCV2 se localizează predominant în celulele liniilor monocito/macrofagice, cum sunt celulele prezentatoare de antigen, de ex., celulele dendritice foliculare (Clark, 1997; Rosell şi col., 2000; Kennedy şi col., 2000). Sistemul imun nespecific beneficiază de o serie de efectori al căror nivel optim constituie garanţia "armării" primei linii de apărare ca şi integritatea mecanismelor distructive lipsite de specificitate. Aprecierea concentraţiei gammaglobulinelor totale, a complexelor imune circulante reprezintă tot atâtea puncte de reper pentru conturarea profilului imunologic al individului respectiv şi stabilirea unor valori fiziologice ale speciei.

MATERIAL ŞI METODE

Investigaţiile au fost efectuate într-o unitate particulară de creştere intensivă a suinelor din nord-vestul Transilvaniei, în care infecţia cu PCV2 respectiv prezenţa bolilor asociate acestuia (PDNS/PMWS) au fost semnalate înca din anul 2002. Au fost recoltate probe de ser (n=30) de pe întreg fluxul tehnologic, de la scroafe până la grăsuni. Gammaglobulinele precipită chiar în concentraţie foarte mică în prezenţa sărurilor metalelor grele. Turbiditatea mediului de reacţie poate fi dozată spectrofotometric, oferind indicii asupra concentraţiei gammaglobulinelor totale. Astfel, una dintre metodele cele mai facile, atât datorită aplicabilităţii cât şi rezultatelor uşor de interpretat, este testul de precipitare cu sulfat de zinc. Testele de disproteinemie (sau de labilitate coloidală) se bazează pe faptul că la pH = 7,4 încărcarea electrică şi stabilitatea coloidală a gammaglobulinelor este mai scăzută decât cea a abuminelor serice. Din acest motiv, în urma diluării cu apă distilată a serului şi a adăugării de mici cantităţi de agenţi precipitanţi ai proteinelor, se produce o floculare cu atât mai bine exprimată cu cât raportul albumine/globuline va fi mai scăzut. Datorită dimensiunilor mari

complexele imune circulante (CIC) pot fi precipitate prin polimeri cu greutate moleculară ridicată, cum este polietilenglicolul (PEG), chiar la concentraţii mici ale complexelor (Boldizsar şi col., 1996).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În figura1este reprezentată evoluţia în dinamică a imunoglobulinelor totale detectate la toate categoriile de suine studiate, observându-se valor ice variază in funcţie de categoriile de animale (clinic sănătoase şi afectate de sindromul multisistemic caşectizant după înţărcare - PMWS). Determinarea concentraţiei imunoglobulinelor circulante totale (Ig) poate completa imaginea globală a capacităţii de apărare nespecifică antimicrobiană (Bellido şi col., 1981). Concentraţia gammaglobulinelor circulante (Fig.1), care include atât anticorpii cu specificitate faţă de diferite antigene cât şi opsoninele, reprezintă măsura reactivităţii serologice a individului. Urmărind rezultatele obţinute se constată că imunoglobulinele totale (Fig.1) au prezentat variaţii în funcţie de categoria de vârstă. Diferenţele înregistrate dintre categorii au fost asigurate statistic la nivele constante ($p<0,05$). Reiese foarte clar din cele prezentate anterior (nivelul imunoglobulinelor totale, nivelele imunoglobulinelor totale M şi G), că la vârsta de 6-7 săptămâni au loc fenomene imune critice fiind corelate cu un posibil prim contact cu circovirusul porcin tip 2. Această ipoteză este susţinută pe de o parte, datorită începerii sintezei imunoglobulinelor M, care sunt cunoscute ca fiind primii "soldaţi" propulsaţi în urma unei agresiuni virale, iar pe de altă parte ca urmare a sintezei acestei clase de imunoglobuline, creşte concentraţia serică a globulinelor totale, fapt consacrat şi susţinut prin precipitarea nivelului de imunoglobuline totale serice (vezi figura 1). La aceste categorii de animale, mai precis suine de 5, 6 săptămâni nu au fost semnalate, doar foarte rar, cazuri clinice de PMWS. Acesta s-ar fi putut datora, nivelului încă protector al anticorpilor maternali prezenţi la aceste categorii de suine, iar la indivizii manifestanţi ai formei clinice, probabil datorită unei slabe imunizări maternale, la care se adaugă o serie de factori potenţiali declanşatori (stresul de înţărcare, lotizare, imunostimulări – vaccinări etc.). Mergând mai departe pe această linie, semnalăm că punctul alarmant şi critic a imunoglobulinelor maternale G, este sesizabilă la suinele de 8 săptămâni, în timp ce a celor M este în continuă creştere (creşterea Ig totale). Probabil că această perioadă reprezintă secvenţa cea mai importantă a unei piese de teatru în care rolul principal revine sistemului imun al gazdei şi virusului agresant. Dacă aceste evenimente sunt privite din momentul apariţiei PMWS (suine 8-12 săptămâni), atunci devine foarte clar că perioada cea mai critică şi descoperită din punct de vedere imunologic se află la vârsta de 8 săptămâni.

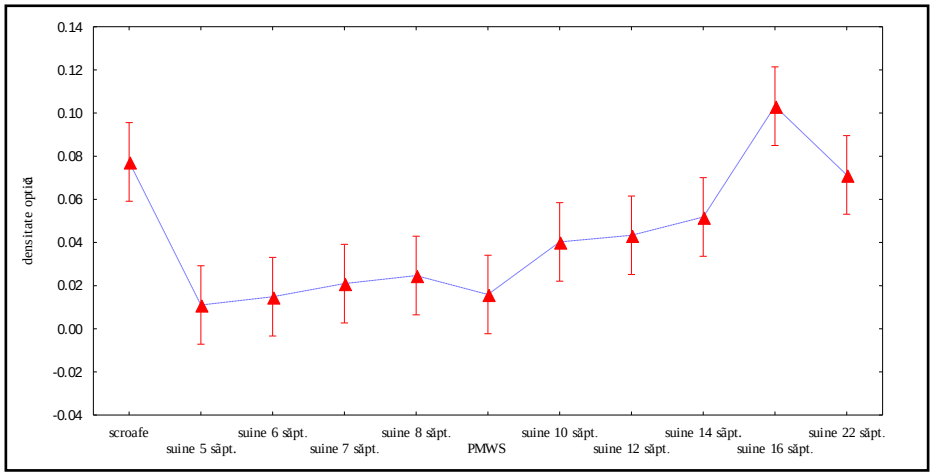


Figura 1. *Interpretarea grafică şi statistică a dinamicii imunoglobulinelor totale înregistrate la categoriile de suine studiate.*

Figura 2 ilustrează evoluţia în dinamică a complexelor imune circulante detectate la toate categoriile de suine studiate, observându-se faptul că valorile de precipitare sunt variabile. Nu este o surpriză, faptul că cele mai ridicate valori ale CIC dintre toate categoriile de suine studiate să fie înregistrate la cele cu boala clinic manifestată, adică la cele afectate de PMWS Contactul organismului gazdă cu antigenul induce o activare a răspunsului imun, tradusă prin implicarea secvenţială a efectorilor şi mecanismelor nespecifice apoi specifice. În acest context, este inerentă modificarea concentraţiei imunoglobulinelor circulante, iar atunci când mecanismele de epurare funcţionează corespunzător, iniţial creşte, apoi revene la normal nivelul complexelor imune circulante. Complexele imune circulante reprezintă una din posibilităţile organismului infectat de a epura germenii microbieni.

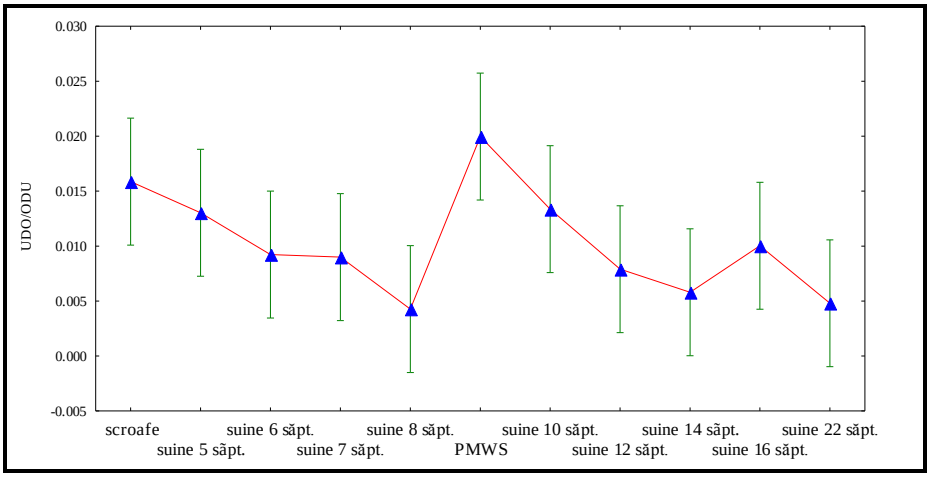


Figura 2. *Interpretarea grafică şi statistică a dinamicii complexelor immune circulante înregistrate la categoriile de suine studiate.*

Ele rezultă în urma cuplării anticorpilor cu specificitate faţă de diferite antigene, cu antigenele corespondente şi sunt în mod obişnuit eliminate din organism, facilitând astfel îndepărtarea diverşilor agresori pe cale fiziologică. Formarea complexelor imune la suine este facilitată de prezenţa pe limfocitele B şi macrofage a receptorilor pentru fragmentul Fc al Ig şi pentru complement Aceste aspecte justifică cuantificarea nivelelor CIC pentru completarea profilului imunologic. Ceea ce putem extrage din cele prezentate anterior, este că complexele imune rezultate în urma anihilării agentului viral, la suinele afectate de boala clinică (PMWS) acestea se acumulează în cantităţi mari, ceea ce denotă o afectare gravă a diferitelor etaje ale sistemului imun, tradusă de fapt prin afectarea gravă a clearence-ului sistemului imun de a asigura eliberarea corespunzătoare a acestor reziduri rezultate. Probabil, tot ca urmare a presiunii efectului imunosupresor a PCV2, suinele clinic sănătoase din perioada apariţiei PMWS (mai ales suine de 10 săptămâni) se confruntă cu o eliminare a CIC rezultate în urma complexării specifice a PCV2.

BIBLIOGRAFIE

1. Gresham A.C.J. (1999). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs – a review and assessment of the situation in UK.Pig J. 43, 72–79.
2. Rosell C., Segalés J., Rovira A., Domingo, M. (2000). Porcine circovirosis in Spain.Vet Rec. May 13;146(20):591-2.
3. Clark E.G. (1997). Postweaning multisystemic wasting syndrome. Proc Am Assoc Swine Prac:44-51.
4. Kennedy S., Moffett D., McNeilly F., Meehan B., Ellis J., Krakowka S., Allan G.M. (2000). Reproduction of Lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by Infection of Conventional Pigs with Porcine Circovirus Type 2 Alone or in Combination with Porcine Parvovirus. In: J. Comp. Path. 122(1), p.: 9-24.

PREVALENŢA INFECŢIEI CU PCV2 ÎN POPULAŢIILE DE MISTREŢI DIN NORD-VESTUL TRANSILVANIEI

PREVALENCE OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 INFECTION IN WILD BOAR FROM NORTH WEST OF TRANSILVANIA

CADAR D.[1], CSAGOLA A.[2], TUBOLY T.[2], SPINU MARINA[1], BRUDASCA F.[1], KOBOLKUTI L.[1]

[1]Disciplina de Boli Infecţioase, USAMV, Facultatea de Medicină Veterinară, Cluj

[2]Szent István University, Faculty of Veterinary Sciences, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Budapest, Hungary

e-mail:dimmuvet@yahoo.com

Porcine circoviruses (PCV) are widespread in domestic pigs worldwide and there is only limited information about PCV prevalence in other suin species. Based on serological studies with sera of wild boars it was established that PCV1 was present in these animals (Tischer et al., 1986) and antibodies specific to PCV2 were also detected in wild boars living in captivity or in the sylvatic areas both with or without signs of PMWS (Sanchez et al., 2001; Segalés et al., 2002; Vicente et al., 2004). Studies including PCV2 genome or antigen detection confirmed the previous findings. This is the first report about the presence of PCV in Transylvanian wild boar populations. Four hundred sixty-nine samples were collected and grouped throughout according to geographic origin, tested for the presence of PCV DNA and 13.52% of the animals proved to be positive for one or both of the PCV genotypes. PCV2 was detected in all of the PCV positive samples. The prevalence of PCV2 infection registered in feral populations indicated a significant difference compared with other molecular investigations (Toplak et al., 2004; Schulze et al., 2004).

Key words: porcine circovirus, wild boar, prevalence, PCR

INTRODUCERE

Numeroase studii au indicat iniţial că circovirusul porcin infectează doar suinele domestice. Actualmente există puţine informaţii cu privire la infecţia cu PCV a altor specii de suide decât cele domestice. În urma unor studii serologice efectuate pe probe de ser de mistreţi s-a observat că PCV1 este prezent la aceste animale (Tischer şi col., 1986). De asemenea au fost detectaţi şi anticorpi PCV2 specifici la mistreţi cu sau fără semne a PMWS atât la cei din captivitate cât şi la cei din mediul silvatic (Sanchez şi col., 2001; Segalés şi col., 2002; Vicente şi col., 2004), iar în urma investigaţiilor moleculare s-a izolat şi genomul sau antigenul PCV2 (Ellis şi col., 2003; Vicente şi col., 2004).În România până la ora actuală nu au fost efectuate investigaţii în direcţia detectării circovirusului porcin la nivelul populaţiilor de mistreţi. Astfel, studiul de faţă reprezintă primul la nivel naţional care a urmărit efectuarea unei cartografieri moleculare ale amprentelor de circovirus porcin în cadrul populaţiilor de mistreţi

MATERIAL SI METODE

Toate probele de mistreţi care au reprezentat suportul acestui studiu au fost colectate şi trimise de către Direcţiile Sanitare Veterinare judeţene a; probele au fost recoltate în urma sezoanelor de vânătoare a mistreţilor 2006/2007 şi 2007/2008. Materialul supus examinării a fost reprezentat de porţiuni de organe şi anume: splină, rinichi, limfoganglioni, pulmoni, tonsile, ficat. Până la data prelucrării, probele au fost păstrate la -20 ^{o}C. Fiecare dintre acestea a fost identificată având date legate de proveniență, judeţ, fond de vânătoare, fiind marcate cu iniţialele ROWB (romanian wild boar sample). În cadrul acestui studiu au fost incluse în total un număr de 469 probe.

Fiecare probă a fost supusă reacţiei în lanţ a polimerazei (tehnica sybr green REAL-TIME PCR) în vederea detectării materialului genetic a circovirusului porcin.

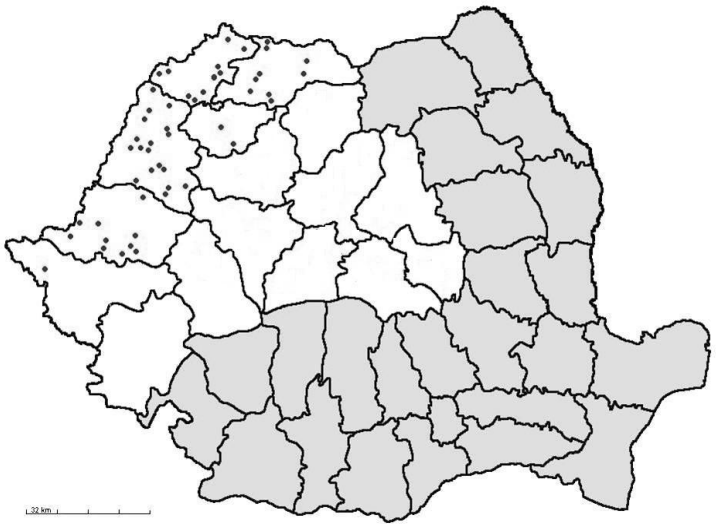


Figura 1. *Reprezentarea geografică a judeţelor si fondurilor de vânătoare (puncte) de unde provin probele de mistreţi.*

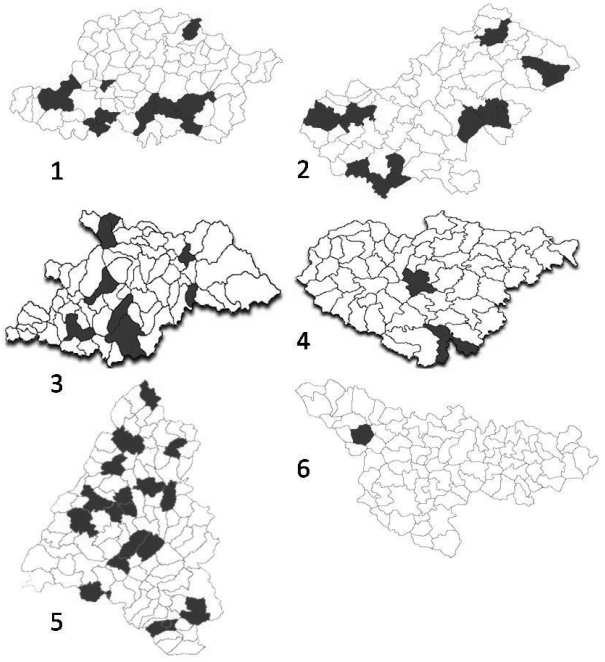


Figura 2. *Proveniența probelor (fonduri de vânătoare – marcate) de mistreți din județul (1) Arad, (2) Satu Mare, (3) Maramureş, (4) Sălaj, (5) Bihor, (6) Timişoara.*

Rezultatele studiului efectuat de noi au demonstrat faptul că atât circovirusul porcin tip 1 (PCV1) cât şi cel de tip 2 (PCV2) sunt prezenţi în populaţiile de mistreţi din România, astfel: judeţul Maramureş cu un număr de 13 (100%) probe din care 2 (15.38%) pozitive pentru PCV2; judeţul Satu Mare cu un număr de 44 (100%) probe din care 10 (22.72%) pozitive, 9 pentru PCV2 şi 1 pentru PCV1; judeţul Cluj cu un număr de 27 (100%) probe din care 4 (14.81%) pozitive pentru PCV2; judeţul Bistriţa Năsăud cu un număr de 10 (100%) probe din care 3 (30%) pozitive pentru PCV2; judeţul Arad cu un număr de 18 (100%) probe din care 1 (7.14%) pozitiva pentru PCV2; judeţul Bihor cu un număr de 29 (100%) probe din care 5 (17.24%) pozitive pentru PCV2; judeţul Sălaj cu un număr de 3 (100%) probe din care 0 (0 %) pozitive pentru PCV2; judeţul Timiş cu un număr de 6 (100%) probe din care 0 (0 %) pozitive pentru PCV2.

Prevalenţa infecţiei cu PCV2 înregistrată în populaţiile de mistreţi a fost de 13.46% ce prezintă o diferenţă semnificativă comparativ cu alte investigaţii moleculare efectuate, cum ar fi cele din Slovenia unde s-a înregistrat o prevalenţă de 25% (Toplak şi col., 2004). Având în vedere faptul că studiul nostru a fost efectuat pe un număr de 469 de probe care reprezintă 1.08% din totalul populaţiilor de mistreţi din Transilvania (n=43321), prevalenţa poate fi mai ridicată. Este aproape de realitate studiul efectuat de Cságola şi col. (2005) care au testat 307 probe de mistreţi dintr-un lot de 2000 probe provenind din diferite regiuni ale Ungariei recoltate între anii 2002–2003. În urma analizei PCR s-a observat că 35.5% din probe au fost pozitive pentru PCV, din care 25% pentru prezenţa PCV2 ceea ce este mult superioară celor semnalate de noi.

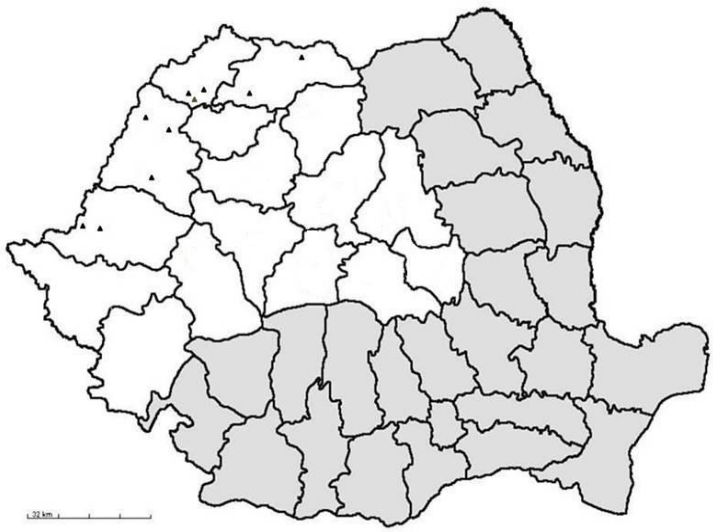


Figura 3. *Reprezentarea geografică a judeţelor si fondurilor de vânătoare (triunghiuri) de unde provin probele pozitive.*

Rezultatele noastre (prevalenţa de 13.46%) comparativ cu cele obţinute din vestul Europei (Spania 49.9%, Franţa 81.8%, Slovenia 25%, Ungaria 25%) denotă faptul că infecţia cu PCV2 a populaţiilor de mistreţi este în continuă creştere cuprinzând în mare parte populaţiile din ţările vestice cu extindere lentă dar sigură spre tările estice. Care este prevalenţa infecţiei cu PCV2 în celelalte tări estice momentan nu este cunoscută. Dar putem afirma că infecţia cu PCV2 se extinde spre est. Pentru a proteja populaţiile de mistreţi din aceste zone încă indemne vor trebui luate în viitor măsuri de protecţie şi de ce nu vaccinarea preventivă ale acestor animale

BIBLIOGRAFIE

1. Cságola A., Kecskeméti S., Kardos G., Kiss I., and Tuboly T. (2006). Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. Arch Virol. Mar;151(3):495-507.
2. Ellis J., Spinato M., Yong C., West K., McNeilly F., Meehan B., Kennedy S., Clark E., Krakowka S., Allan G. (2003). Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar.J Vet Diagn Invest Jul;15(4):364-8.
3. Sanchez, R., Nauwynck, H., Pensaert, M. (2001). Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. Proc. ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates. St. Malo (France), 122.
4. Segalés J., Domingo M. (2002). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review.Vet Quarterly 24:109-124.
5. Tischer I., Mields W., Wolff D., Vagt M., Greim W. (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. Archives of Virology 91, 271–276
6. Toplak I., Grom J., Hostnik P., Barlic-Maganja D. (2004). Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. Vet Rec. Aug 7;155(6):178-80.
7. Vicente J., Segalés J., Hofle U., Balasch M., Plana-Duran J., Domingo M., Gortazar C. (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (Sus scrofa).Vet Res. Mar-Apr;35(2):243-53.

REZISTENTA LA ANTIBIOTICE A TULPINILOR APEC

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF APEC STRAINS

N. CATANA [1], V. HERMAN [1], IONICA FODOR [1] VIRGILIA POPA [2]
[1] Faculty of Veterinary Medicine Timisoara
[2] S. N. Institute Pasteur S. A. Bucharest
epirovet_tm@yahoo.com

Research has been performed on a number of 121 E. coli strains genotypically and phenotypically classified in the APEC pathotype.

In the investigations were pursued resistotypes in 121 APEC strains isolated from broilers of different ages, in intensive growth system.

The obtained results show that in these strains was revealed the phenomenon of resistance to one or more of the antibiotics used.

Analyzing these results is observed that against to 9 antibiotics, the strains tested were resistant ranged between 61,98% and 100%.

Only 12,40% of isolates tested were resistant to amoxyclave and the phenomenon of resistance have not be observed to florfenicol.

Key words: E. coli, APEC strains, antibioresistance

Colibaciloza aviară este produsă de tulpini de E. coli încadrate în patotipul APEC (Avian Pathogenic E. coli), având punctul de declanşare la nivel respirator. Factorii iniţiatori pot fi infecţii virale, micoplasmice sau factori de micromediu, care produc imunodepresie şi deciliază epiteliul căilor respiratorii (2,3).

Tulpinile APEC au ca situsuri de penetrare zonele de schimb gazos (saci aerieni şi pulmoni), iar prin factorii de virulenţă, reprezentaţi de adezine, siderofori, proteinele de membrană externă şi rezistenţa la complement, învinge forţele de apărare ale păsărilor producând septicemie şi infecţii localizate (2, 3).

O caracteristică importantă a acestor tulpini o reprezintă rezistotipurile determinate de ambele tipuri de determinanţi ai rezintenţei la antibiotice respectiv plasmidici şi cromosomali (1,4).

Cercetările efectuate au urmărit identificarea unor rezistotipuri la tupinile APEC, izolate de la pui şi tineret.

MATERIALE ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate pe un număr de 121 tulpini de E. coli încadrate genotipic şi fenotipic în patotipul APEC.

Profilul rezistenţei la antibiotice a fost determinat prin metoda difuzimetrică (5), folosind mediul MUELLER-HINTON şi biodiscuri cu 11 antibiotice furnizate de firmele producătoare. Interpretarea rezultatelor a fost făcută în funcţie diametrul zonei de inhibiţie, iar datele au fost prelucrate şi redate în tabel şi pe grafic.

REZULTATELE OBȚINUTE

Tulpinile de E. coli neexpuse la presiunea de antibiotice sunt sensibile la aceste substanţe, în schimb, tulpinile de E. coli izolate de la păsări şi mamifere, din creşterea intensivă, supuse presiunii la antibiotice, prezintă fenomenul de rezistenţă multiplă ca urmare a expunerii frecvente la antibiotice.

În cadrul cercetărilor efectuate au fost urmărite rezistotipurile la 121 de tulpini APEC, izolate de la pui de carne şi tineret crescute în sistem intensiv.

Rezultatele obţinute relevă faptul că la aceste tulpini a fost evidenţiat fenomenul de rezistenţă faţă de unul sau mai multe dintre antibioticele utilizate.

Tabelul 1 - Rezultatele antibiogramei

Nr. Crt.	Antibioticul	S		I		R		Total
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	
1.	Amoxiclav	89	13,6	17	14,05	15	12,40	121
2.	Doxicilină	-	-	11	9,1	110	90,91	121
3.	Tetraciclină	-	-	6	4,96	115	95,04	121
4.	Eritromicină	-	-	-	-	121	100	121
5.	Neomicină	3	2,48	6	4,96	112	92,56	121
6.	Spectinomicină	13	10,74	29	23,97	79	65,29	121
7.	Enrofloxacin	18	14,88	16	13,22	87	71,90	121
8.	Norfloxacin	14	11,57	11	9,09	96	79,34	121
9.	Ciprofloxacin	28	23,14	18	14,88	75	61,98	121
10.	Florfenicol	116	95,88	5	4,13	-	-	-
11.	Cosumix	-	-	-	-	121	100	121

Analizând aceste rezultate se observă că faţă de 9 antibiotice, tulpinile testate au avut o rezistenţă cuprinsă între 61,98% şi 100%.

Rezistenţa maximă a fost faţă de Eritromicină şi Cosumix (100%), fiind urmată de rezintenţa la tetracicline, aminoglicozide şi quinolone.

Faţă de amoxiclav au fost rezistente doar 12,40% din tulpinile testate, iar faţă de Florfenicol nu a fost semnalat fenomenul de rezistenţă.

Rezistotipurile identificate, la tulpinile testate, sunt asemănătoare cu rezistotipurile menţionate, de către alţi autori, la tulpinile APEC (1, 3, 4).

Dezvoltarea rezistenţei faţă de antibioticele utilizate, în terapia unor boli infecţioase la păsări, are la bază determinanţii genetici de tip plasmidic şi cromozomal. Aceşti determinanţi guvernează sinteza beta-lactamazelor, cu spectru larg, care induc rezistenţa la peniciline şi cefalosporine. Pentru a elimina acest efect unele beta-lactamine sunt asociate cu acidul clavulanic. Astfel, faţă de amoxiclav tulpinile testate au fost rezistente numai în proporţie de 12,40%, deoarece amoxicilina este asociată cu acidul clavulanic.

Mecanisme asemănătoare, de tip plasmidic şi cromozomal, există şi în cazul rezistenţei la aminoglicozide, prezenţa lor fiind demonstrată de rezistotipurile depistate. Tulpinile APEC posedă o genă situată cromozomal sau plasmidic responsabilă de sinteza aminoglicozidacetiltransferazei, enzimă care induce rezistenţa la aminoglicozide.

Rezistenţa la quinolone este consecinţa o două mecanisme, unul reprezentat de sinteza unei ADNgiraze, iar altul de reducerea numărului de porine urmat de diminuarea permeabilităţii membranei externe a bacteriilor. La tulpinile testate au fost depistate rezistotipuri faţă de cele 3 quinolone, în proporţii variabile.

A fost depistat şi un rezistotip, faţă de Cosumix (Sulfonamida şi Trimetroprin), guvernat tot prin mecanism genetic, a cărui frecvenţă a fost de 100%.

Rezistența la tetracicline şi eritromicină are, de asemenea, suport genetic de tip plasmidic, dar şi cromosomal, acest fenomen fiind foarte frecvent şi dovedit de frecvența mare a rezistotipurilor depistate față de aceste antibiotice.

Rezistotipurile la tulpinile APEC, sunt considerate markeri epidemiologici, care trebuie monitorizate pentru a supraveghea circulația tulpinilor APEC în efectivele de păsări.

CONCLUZII

1. Profilul de rezistență multiplă la antibiotice, a fost semnalat, în proporții variabile la tulpinile APEC supuse testării.
2. Rezistotipurile identificate, determinate genetic, corespund antibioticelor utilizate frecvent în terapia unor boli infecțioase la păsări.
3. Frecvența mare a acestor rezistotipuri impune monitorizarea şi utilizarea lor ca markeri epidemiologici asociați cu alte caractere fenotipice şi genotipice ale tulpinilor APEC.

BIBLIOGRAFIE

1. BARDOŇ, J., KOLÁŘ, M. – 2005, *Resistance of bacteria to antibiotics at livestock farms*, Veterinářství, 55, (1), 23-25.
2. CĂTANĂ, N., POPA, VIRGILIA, HERMAN, V., FODOR, IONICA – 2008, *Phenotypical and genotypical characteristics of E. coli strains isolated from avian colibacillosis outbreaks*, Lucr. Şt. Med. Vet. Timişoara, XXXXI, 340-343.
3. EWERS, CHRISTA, JANßEN, TRAUTE, WIELER, L. H. – 2003, *Aviäre pathogene Escherichia coli (APEC)*, Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 116, 381-395.
4. KHOSHKHOO, P. H., PEIGHAMBARI, S. M. – 2005, *Drug resistance patterns and plasmid profiles of Escherichia coli isolated from cases of avian colibacillosis*, Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, 60, (2), 97-105.
5. NEGUȚ, M. – 2008, *Identificarea genului Escherichia-Shigella*. În: *Tratat de microbiologie clinică*, sub redacția BUIUC, D., NEGUȚ, M., Ed. Medicală, Bucureşti, 709-722.

UTILIZAREA ROŞULUI DE CONGO CA MARKER FENOTIPIC DE IDENTIFICARE A TULPINILOR APEC

USE OF CONGO RED AS A MARKER FOR IDENTIFYING PHENOTYPICALLY APEC STRAINS

N. CATANA[1], VIRGILIA POPA[2], V. HERMAN[1], IONICA FODOR[1]
[1] Faculty of Veterinary Medicine Timisoara
[2] S. N. Institute Pasteur S. A. Bucharest
epirovet_tm@yahoo.com

Research has been performed on a total of 121 E. coli strains isolated from broilers corpses of different ages with lesions of colisepticaemia. Classification of strains in APEC pathotype was realized by identifying genes OmpA, iss and fimH by the multiplex PCR technique. The binding of Congo Red was tested on TSA agar.

The epidemiological marker followed, respectively the binding of Congo Red, was present in 112 strains, respectively 92,56% of the strains tested.

Multiplex PCR technique has allowed detection of the genes OmpA, iss and fimH, which generates the synthesis of some virulence factors specific to APEC strains, in 118 of the strains tested, respectively 97,52%.

Keyword: Congo red, APEC strains

Patotipul APEC (Aviar Pathogenic Escherichia coli) include tulpini patogene pentru păsări, care produc infecţii extraintestinale, de tip septicemic, având ca poartă de intrare mucoasa respiratorie. Tulpinile încadrate în acest patotip aparţin, în marea lor majoritate, serogrupului O78, iar fixarea Roşului de Congo este un marker epidemiologic care poate fi utilizat în discriminarea tulpinilor patogene de cele comensale , mai ales, în cadrul serogrupului O78.

MATERIALE ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate pe un număr de 121 tulpini de E. coli izolate de tulpini de la cadavre de pui şi tineret cu leziuni de colisepticemie. Identificarea tulpinilor şi încadrarea lor în specia E. coli a fost făcută pe baza caracterelor culturale, morfologice, tinctoriale şi biochimice. Ulterior, a fost testată activitatea hemolitică (1, 2) şi a fost stabilit profilul de rezistenţă faţă de 10 antibiotice utilizate, mai frecvent, în tratamentul colibacilozei aviare (3).

Încadrarea tulpinilor în patotipul APEC a fost stabilită prin identificarea genelor *Omp A, iss* şi *fim H* prin tehnica multiplex PCR (4).

Legarea Roşului de Congo a fost testată pe agar TSA (Trypticase Soy Agar) cu adaus de 0,15 % săruri biliare şi 0,03 % colorant, însămânţările fiind efectuate prin epuizare, cu ansa bacteriologică, pentru obţinerea coloniilor izolate (1, 3).

REZULTATELE OBŢINUTE

La cele 121 de tulpini izolate, din focare de colibaciloză aviară, caracterele culturale, morfologice, tinctoriale şi biochimice au fost caracteristice, cofirmându – se astfel, apartenenţa lor în cadrul speciei de E. coli.

Tehnica multiplex PCR a permis detecţia genelor *Omp A, iss* şi *fim H*, care generează sinteza unor factori de virulenţă, caracteristice tulpinilor APEC, la un număr de 118 tulpini, respectiv 97,52 %. Aceste gene au fost singure sau asociate, cele mai multe tulpini (61,15 %) având concomitent toate cele 3 gene. Gena *Omp A* a fost prezentă la 54,55 % din tulpini, gena *fim H* a fost prezentă tot la 54,55 % din tulpini, iar gena *iss* a fost prezentă la 63,64 % din tulpinile testate.

Markerul epidemiologic urmărit, respectiv legarea Roşului de Congo, a fost prezent la 112 tulpini, respectiv 92,56 % din tulpinile testate. Acest caracter fenotipic este asociat cu prezența genelor amintite şi cu fenomenul de rezistență multiplă la antibiotice, însă nu este corelat cu activitatea hemolitică.

Analizând rezultatele obținute se observă că legarea Roşului de Congo este un caracter fenotipic prezent la majoritatea tulpinilor testate, diferența între tulpinile APEC, la care acest marker este prezent şi tulpinile APEC caracterizate genotipic fiind extrem de mică (6 tulpini).

Aceste rezultate sunt asemănătoare cu datele din literatură (1, 2) şi confirmă faptul că identificarea tulpinilor APEC, pe baza acestui caracter fenotipic, reprezintă un procedeu ieftin şi rapid, care poate fi utilizat în laboratoarele de diagnostic în cadrul cercetărilor privind circuitul acestor tulpini în efectivele de păsări iar, ulterior, încadrarea definitivă poate fi făcută prin metode de biologie moleculară.

O altă caracteristică a tulpinilor APEC, semnalată frecvent, o reprezintă rezistența multiplă la antibiotice, transmisă intraspecific şi interspecific prin intermediul plasmidului R. Antibiorezistența a fost semnalată în proporție de 80 – 100 % față de doxicilină, tetracilină, neomicină şi eritromicină, iar față de ciprofloxacină, streptinomicină, norfloxacină şi enrofloxacină în proporție de 60 – 70 %. Numai față de florfenicol tulpinile studiate au fost sensibile.

Frecvența mare a focarelor de colibaciloză aviară asociată cu pierderile mari, prin mortalitate şi reducerea producției de carne şi ouă impune monitorizarea tulpinilor de E. coli izolate, iar testarea fixării Roşului de Congo permite o încadrare suficient de corectă a acestor tulpini în patotipul APEC.

CONCLUZII

Capacitatea de legare a Roşului de Congo reprezintă un caracter fenotipic de discriminare a tulpinilor APEC, printr – o tehnică bacteriologică simplă şi rapidă.

Prezența acestui marker este corelată, în mod constant, cu prezența genelor care generează principalii factori de patogenitate ai acestor tulpini.

Acest marker este asociat cu rezistența multiplă la antibiotice, dar nu este asociat cu activitatea hemolitică la tulpinile APEC.

BIBLIOGRAFIE

1. EWERS, CHRISTA, JANßEN, TRAUTE, WIELER, L. H. – 2003, *Aviäre pathogene Escherichia coli (APEC)*, Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 116, 381-395
2. McPEAKE, S. J. W., SMYTH, J. A., BALL, H. J. – 2005, *Characterisation of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds*, Veterinary Microbiology, 110, (3/4), 245-253.
3. POPA, VIRGILIA, STĂNICĂ, ANDREEA, BOTUŞ, DANIELA, MIHĂILESCU, RAMONA – 2004, *Detecția genelor iss, ompA şi fimH prin multiplex PCR la tulpini de Escherichia coli de origine aviară*, Lucr. Şt. Med. Vet. Timişoara, XXXVII, 522-528.
4. NEGUȚ, M. – 2008, *Identificarea genului Escherichia-Shigella*. În: *Tratat de microbiologie clinică*, sub redacția BUIUC, D., NEGUȚ, M., Ed II, Ed. Medicală, Bucureşti, 709-722.

THE DETERMINATION OF MIDGUT AND RECTUM MICROORGANISMS ON HONEYBEES (*APIS MELLIFERA*)

CEAUSI C., TOGOE I., TUDOR L., ILIE L. I.
Faculty of Veterinary Medicine Bucharest

The digestive tract of honeybees represents one of the primary sources of honey contamination with microorganisms. The purpose of our research was to determine the groups of microorganisms from the midgut and rectum of honeybees (Apis mellifera) and to estimate the number in which they present themselves. Worker honeybees from 4 hives belonging the same apiary were used. The honeybees were gathered before the spring cleansing flight. Different species of aerobic and anaerobic bacteria were isolated, and also coliform bacteria, staphylococci, lactobacilli, Bacillus spp. and yeasts. There were no species of moulds isolated.

Key words: honeybees, microorganisms, midgut, rectum.

The digestive tract of honeybees is composed from a series of organs which form a continuous tube from the mouth to the anus. It comprises three regions: the anterior one (consisting of the mouth, pharynx, oesophagus and crop), middle (proventriculus and stomach or ventriculus) and posterior (consisting of the small intestine or anterior intestine, rectum or posterior intestine and anal orifice). The food digestion takes place under the presence of glandular secretions, enzymes and bacteria.

The primary sources of microbial honey contamination include pollen, digestive tract of honeybees, dust, air, soil and flower nectar.

A balanced association of microbial species including a large number of symbiotic and competitive interactions, known as indigenous gastrointestinal microbial flora, constitutes a part of each healthy organism. The symbiotic microbial flora of the digestive tract of adult honeybees comprises Gram-negative, Gram-positive and Gram-variable bacteria, moulds and yeasts. This is a result of pollen and other food sources consumption, and also of bees contact inside the beehive. The intestinal microbial flora of the honeybees is sensitive to various chemotherapeutics, and its composition in microorganisms is variable considering the season.

The purpose of our research was to evaluate the specific groups of microorganisms from the midgut and the rectum of honeybees after hibernation and to estimate the germs' number from each group.

MATERIALS AND METHOD

In order to perform our research there have been used working honeybees sampled from 4 beehives of the same private apiary, situated in a locality near Bucharest. The working bees specimen were sampled from combs before spring cleansing flight.

The head of the honeybees was removed and there have been collected midgut and rectum in order to obtain 1 gram of study material. The samples were brought in the microbiology laboratory and were processed taking into account the microbiological standards STAS, and the standard methods ISO. The study was realized in spring 2008.

In order to determine the total number of mesophilic and aerobic germs, there have been performed ten-fold dilutions in peptonated water, and from each dilution were distributed through sterile pipettes quantities of 1 ml in 2 Petri plates. Each Petri plate was filled with melted agar, afterwards cooled at 40-45 °C, homogenized and incubated for 24 hours at 37 ^{o}C. There was determined the average number of colonies per g of biological product.

The determination of sulphite reducing bacteria was effected on sodium sulphite and iron citrate medium, melted and cooled at 45 °C, on which there have been inoculated with 1 ml from ten-fold dilutions. The media were incubated in anaerobiosis at 37 °C for 24-48 hours, afterwards the black colonies were counted.

In order to determine the probable number of coliform bacteria, ten-fold dilutions were obtained, from each one a quantity of 1 ml being introduced in 3 test tubes containing BBLV medium (biliar salts-lactose-brilliant green broth) and a Durham tube. The incubation took place at 37 °C for 24-48 hours. The interpretation was realized after gas production and the calculation of the average number of 3 ciphers (considering the note received by the 3 test tubes containing BBLV medium), the average number obtained being interpreted with the help of Mac Grady table. In parallel, the method to determine the coliform bacteria number by counting the colonies (ISO 4832) was also used.

The staphylococci number determination was realized through the application of a technique similar to the one used to determine total plate count, using as a Chapman solid medium and Baird Parker agar.

The yeasts determination was made taking into consideration the standard SR ISO 7954/2001, using the technique of colony count at 25 °C.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The analysis of the laboratory determinations reveals the presence of a total microbial load relatively high, with a very large number of spore-forming or non-spore-forming bacteria, and also with a specially high loading of yeasts (see the next table). Knowing the particular way of digestion at hymenopters, the majority of the microorganisms surely come from honey sources processed by the honeybees.

Tabel nr. 1
The number of microorganisms from the midgut and rectum of the honeybees

Microorganism group	Midgut				Rectum			
	Hive 1	Hive 2	Hive 3	Hive 4	Hive 1	Hive 2	Hive 3	Hive 4
Aerobic microorganisms	$3x10^5$	$2x10^6$	$7x10^5$	$6x10^5$	$3x10^4$	$8x10^4$	$3x10^5$	$8x10^4$
Anaerobic microorganisms	$5x10^8$	$9x10^8$	$3x10^9$	$2x10^9$	$7x10^8$	$4x10^9$	$5x10^8$	$9x10^8$
Anaerobic Gram-positive acido-resistants rods	$2x10^8$	$3x10^8$	$2x10^9$	$1x10^9$	$4x10^8$	$2x10^9$	$2x10^8$	$5x10^8$
Coliforms	$5x10^2$	$2x10^3$	$8x10^2$	$3x10^2$	$7x10^3$	$3x10^4$	$2x10^4$	$5x10^3$
Staphylococci	$2x10^3$	$8x10^3$	$3x10^4$	$7x10^3$	$4x10^4$	$2x10^4$	$9x10^3$	$2x10^3$
Lactobacilli	$8x10^7$	$5x10^8$	$2x10^8$	$9x10^7$	$2x10^9$	$8x10^8$	$4x10^9$	$5x10^8$
Bacillus spp.	$2x10^3$	$6x10^2$	$3x10^3$	$9x10^2$	$8x10^3$	$3x10^4$	$2x10^4$	$6x10^3$
Yeasts	$3x10^6$	$5x10^6$	$9x10^5$	$7x10^5$	$3x10^4$	$8x10^3$	$4x10^3$	$2x10^4$

The number of aerobic microorganisms was obviously lower than the one of anaerobic microorganisms (10^5-10^6 aerobic germs/gram of midgut content, 10^4-10^5 aerobic germs/gram of rectum content respectively, in comparison with 10^8-10^9 anerobic germs/gram of both midgut and rectum content). Almost all the anaerobic bacteria were Gram-positive acidoresistant rods, these forming the main group of microorganisms from the digestive tract of the honeybees (10^9/gram).

A larger number of coliforms (10^3-10^4 cfu/g), lactobacilli (10^8-10^9 cfu/g) and *Bacillus* spp. (10^3-10^4 cfu/g) was found in the rectum, in comparison with the midgut (10^2-10^3 coliforms/g, 10^7-10^8 lactobacilli/g and 10^2-10^3 *Bacillus* spp./g), meanwhile the yeasts' number was lower (10^3-10^4 cfu/g in the rectum in comparison with the midgut, 10^5-10^6 cfu/g), and the staphylococci number was similar in both midgut and the rectum (10^3-10^4 cfu/g).

CONCLUSIONS

1. The microbiology analysis of the honeybees' samples revealed a very high total microbial load. A higher number of anaerobic microorganisms was counted (between 5×10^8 and 4×10^9), in comparison with aerobic microorganisms (between 3×10^4 and 2×10^6).

2. From the total number of anaerobic bacteria, the majority was anaerobic Gram-positive acidoresistant rods (between 2×10^8 and 2×10^9).

3. A high number of lactobacilli was found, both in midgut and rectum; this type of bacteria is probably involved in processing the honey sources.

4. The yeasts were isolated in a relative high percentage, between 4×10^3 and 5×10^6.

BIBLIOGRAPHY

1. El-Leithy M. A., El-Sibaei K. B. – External and internal microflora of the honey bees (Apis mellifera L.), Egypt. J. Microbiology , 7: 79-87, 1972.
2. García García D., Rojas Mogollón M.A., Sánchez Nieves Jimena (2006) – Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) [Cultured Microbiological Content of the Intestinal Tract and Stored Pollen of Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae)], Acta Biológica Colombiana, 11(1): 123 – 129.
3. Gilliam M. – Identification and roles of non pathogenic microflora associated with honey bees, FEMS. Microbiol. Lett., 155: 1-10, 1997.
4. Kačániová M., Sudzina M., Sudzinová J., Fikselová M., Čuboň J., Haščík P. (2007) – Microbiological and physico-chemical quality of honey collected from different Slovak habitats, Slovak Journal of Animal Science, 40(1): 38-43.
5. Mărghitaş L.A. (1997) – Albinele şi produsele lor, Ed. Ceres, Bucureşti.
6. Olaitan P.B., Adeleke O.E., Ola I.O. (2007) – Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes, African Health Sciences, 7(3): 159-165.
7. Piccini Claudia, Antúnez Karina, Zunino P. (2004) – An approach to the characterization of the honey bee hive bacterial flora, Journal of Apicultural Research, 43(3): 101–104.
8. Rada V., Máchová M., Huk J., Marounek M., Dušková D. (1997) – Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs, Apidologie, 28(6): 357-365.
9. Sandhu D.K., Waraich M.K. (1985) – Yeasts associated with pollinating bees and flower nectar, Microbial Ecology, 11(1): 51-58.
10. Snowdon J.A., Cliver D.O. – Microorganisms in honey, International Journal of Food Microbiology, 31 (1-3): 1-26 , 1996.

THE DETERMINATION OF YEASTS AND MOULDS IN HONEYS DESTINED TO MERCHANDISING IN BUCHAREST

CEAUSI C., TOGOE I., TUDOR L., ILIE L. I.
Faculty of Veterinary Medicine Bucharest

Due to its particular composition, honey has the ability to inhibit or even destroy microorganisms. Nevertheless, some types of microorganisms persist in this product, usually in dormant form, and some species of yeasts, owing to the fact that they have a pronounced osmophilic character, they have the ability to multiply and to produce the fermentation of the product, making it inadequate for human consumption.

In 2007 and 2008, a total number of 144 samples from 3 types (black locust honey, lime honey and polyfloral honey) were prelevated and examined. The aim of the lab analysis was to determine the total plate counts of yeasts and moulds, using the colony numbering technique (cfu/g).

It was observed that the examined honey samples had a low level contamination, therefore, none of them overcame the maximum accepted level of yeasts and moulds (100 cfu/g). The type of honey with the highest number of fungi was the polyfloral honey.

Keywords: microorganisms, yeasts, moulds, honey.

In comparison with other food products, honey does not represent a favorable substrate for survival and multiplication of microorganisms; due to its particular composition, honey has the ability to inhibit and even destroy them. This was the reason that the microbiological examination of honey was not a main preoccupation for the specialists in the domain.

The ability of honey of inhibiting or even destroy microorganisms is due to a complex of factors, from which the main are: the high content of sugar and the low content of free water, 2 facts that determine dehydration, cell water loss and the death of the microbial cells; acidity (pH ≤ 4,5); glucose oxidation system, which determines the formation of hydrogen peroxide (a toxic product for some microorganisms), well-known long time before the identification under the name of "inhibin"; the very small content of proteins and the high C/N ratio; the lack of oxygen, atmospheric oxygen not being able to penetrate the honey due to its viscosity (the majority of contaminant microorganisms need oxygen to develop); the presence in honey of several chemicals and enzymes with unfavorable role in microorganisms growth (pinocembrin, lysozyme, phenolic acids, terpenes, benzyl alcohols, different volatile substances); the unfavorable electric status created by the reductive saccharides from honey, which inhibit the mould and aerobic bacteria multiplication.

Nevertheless, rare types of microorganisms do persist in honey, usually in dormant form, but some yeast species have the ability to multiply and modify the product, transforming it into an improper one for human consumption. This was the reason why the producers and the specialists from food industry field to become interested more and more on the microbiological quality of honey and also to impose its microbiological examination before introducing it to market.

The microorganism contamination of honey takes place in the beehive, through the bees, during sampling and sedimentation of nectar, and also after harvesting and primary processing of honey. The contamination during sampling and primary processing of honey has the most important hygienic and sanitary signification, because it includes many times also the pathogenic or potentially pathogenic microorganisms from individuals which perform these operations. This is determined by the non-hygienic work conditions and the inadequate microbiological quality of the used water. Thus, the inadequate microbiological quality of the water used by the bees can contribute and also to the contamination during harvesting and sedimentation in combs. Taking into account the daily data, the primary processing and the industrial one can also increase or decrease the total number of microorganisms in honey. The dominant yeasts found in fermented honey are species included in the

following genres: *Debaryomyces* and *Saccharomyces*, but also from: *Ascosphaera*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Nematospora*, *Oosporium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Schwaniomyces*, *Trichosporon*, *Torula*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces* and others. Referring to moulds, the species often encountered are included in following genres: *Aspergillus*, *Atrichia*, *Bettsia*, *Cephalosporium*, *Chetonium*, *Coniothecium*, *Hormiscium*, *Penicillium*, *Triposporium*, *Uredinaceae*, *Ustilaginaceae*.

MATERIALS AND METHODS

The research were performed between January 2007 and December 2008, at the Faculty of Veterinary Medicine of Bucharest. A total number of 144 honey samples from 3 sorts (black locust honey, lime honey and polyfloral honey) were analyzed. Their distribution is presented in Table no. 1.

Table no. 1

The situation of the honey samples prelevated for the research

Samples	Period		Total
	2007	2008	
Black locust honey	*16*	*20*	36
Lime honey	*18*	*23*	41
Polyfloral honey	*31*	*36*	67
Total samples	65	79	144

The samples analyzed were destined to introduction on the market in Bucharest and their producers' origin were different localities from the southern and south-eastern regions of the country. The harvesting was realized by beekeepers, which were instructed on the sampling methods and the identification and transportation conditions, and the samples were introduced in sterile vials which were constructed with tightness closing systems. The determination of yeasts and moulds number was realized following the specifications included in the standard SR ISO 7954/2001, through the technique of colonies numbering technique at 25^{o}C.

The work technique: 10 g honey were dissolved in 90 ml physiological solution respecting the asepsis rules during the manipulation, afterwards performing successive decimal dilutions. In 2 Petri plates were transferred 1 ml of each dilution of the analyzed ones. On the YDCA (yeast-dextrose-cloramphenicole-agar) medium were poured approximately 15 ml of the dilutions, melted before and maintained at 45 ^{o}C ± 1 ^{o}C on a water bath, in each Petri plate. The inoculum was attentively mixed with the medium, afterwards being let to solidify, positioning the plates on a horizontal cool surface. In parallel, there has been a witness-box, in order to verify the sterility. The inoculated Petri plates were incubated at 25 ^{o}C ± 1 ^{o}C, placing them in the incubator with the lid down.

After 3 to 5 days of incubation were numbered the colonies of each Petri plate and were retained those boxes which contained under 150 colonies. Ulterior, the number of microorganisms on each gram of product was calculated with a calculation formula, the results being transformed into two significant digits. As a result, there has been noted the number of microorganisms on each gram of product, expressed through a number between 1,0 and 9,9 multiplied with 10^{x}, x being the power correspondent to 10.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The investigations performed on the honey samples from the southern and south-eastern regions of the country revealed a reduced degree of contamination with yeasts and moulds. The distribution and analysis of results is included in table no. 2.

Table no. 2
The investigations' results considering the presence of yeasts and mould in honey samples

Number cfu/g	Black locust honey		Lime honey		Polyfloral honey		Total samples
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	
0-10	1	-	2	-	1	1	5
11-20	-	2	2	-	-	-	4
21-30	3	-	-	4	-	4	11
31-40	-	3	-	2	7	-	12
41-50	2	2	4	5	2	9	24
51-60	3	3	1	-	4	6	17
61-70	-	5	2	5	1	1	14
71-80	4	-	3	4	6	5	22
81-90	2	3	4	-	7	6	22
91-100	1	2	-	3	4	3	13
Total samples	16	20	18	23	32	35	144

In 2007 and 2008, a total number of 144 samples (65 in 2007 and 79 in 2008) from 3 types of honey were prelevated and examined: black locust honey, lime honey and polyfloral honey (see table no. 1).

The lab analyzes had the purpose of determination the total number of yeasts and moulds, using the colonies numbering technique (cfu/g).

The examined honey samples had a low contamination level, thus none exceeded the maximum accepted level in Health Ministry Order no. 975/1998, videlicet 100 cfu/g of yeasts and moulds.

The type with the highest number of fungi was the polyfloral honey, followed by the balck locust honey and lime honey.

The highest number of samples (16,66 %) presented 41-50 cfu/g, followed by the results of 71-80 cfu/g and 81-90 cfu/g (each with 15,27 %), and in less number (2,77 %) between 11-20 cfu/g, followed by 0-10 cfu/g (3,47 %).

CONCLUSIONS

1. The special chemical composition of honey limits the growth and multiplication of microorganisms or even it has a microbicide effect.
2. None of the analyzed samples exceeded the maximum accepted number of yeasts and moulds.
3. The highest number of samples (24, namely 16,66 %) presented 41-50 cfu/g yeasts and moulds.
4. The highest contamination level was observed in samples prelevated from polyfloral honey, followed by the black locust honey and lime honey.

BIBLIOGRAPHY

1. Bartoli M. – Microbiological Researches on Honey Produced in Home Industry. (Indagini Microbiologiche Sul Miele Prodotto Artigianalmente). Industrie Alimentari-XXXII 32 (316): 636-637, 1993.
2. Bărzoi D. – Microbiologia produselor alimentare de origine animală, Ed. Ceres, Bucureşti, 1985.
3. Bărzoi D., Apostu S. – Microbiologia produselor alimentare, Ed. RISOPRINT, Cluj-Napoca, 2002.
4. Bonvehi J. S., Jorda R. E. – The Microbiological Quality of Honey as Determined by Aerobic Colony Counts, Journal of Food Protection, 56 (4): 336-337, 1993.
5. Efem S.E.E., Udoh K.T., Iwara C.I. – The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance, Infection, 20: 51-3, 1992.
6. El-Leithy M. A., El-Sibaei K. B. – External and internal microflora of the honey bees (Apis mellifera L.), Egypt. J. Microbiology , 7: 79-87, 1972.
7. Gilliam M. – Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts, Apidologie 10(3): 143-153, 1979.
8. Gilliam M., Prest D. B., Lorenz B. J. – Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds, Apidologie, 20: 53-68, 1989.
9. Gilliam M. – Identification and roles of non pathogenic microflora associated with honey bees, FEMS. Microbiol. Lett., 155: 1-10, 1997.
10. Jiménez Misericordia, Mateo J. J., Huerta T., Mateo R. – Influence of the Storage Conditions on Some Physicochemical and Mycological Parameters of Honey, Journal of the Science of Food and Agriculture, 64 (1): 67-74, 1994.
11. Mărghitaş L.A. – Albinele şi produsele lor, Ed. Ceres, Bucureşti, 1997.
12. Mundo A. Melissa, Padilla-Zakour I. Olga, Worobo W. Randy – Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys, International Journal of Food Microbiology, (97) 1: 1-8, 2004.
13. Popescu N., Meica S. – Bazele controlului sanitar veterinar al produselor de origine animală, Ed. Diacon Coresi, Bucureşti, 1995.
14. Ruiz-Argueso T., Rodriguez-Navarro A. – Microbiology of Ripening Honey, Applied Microbiology, 30, 6, dec. 1975, pag. 893-896.
15. Snowdon J.A., Cliver D.O. – Microorganisms in honey, International Journal of Food Microbiology, 31 (1-3): 1-26 , 1996.
16. Tysset C., Haas P. et al. – Survival of Some Mycobacteria in Honey Stored at Room Temperature. (De la survie de quelques mycobacteries dans les miels du commerce conserves - la temperature ambiante), Bull. Acad. Vet. de France, 52: 447-452, 1979.
17. Tysset C., Rousseau M., Duran C. – Microbism and wholesomeness of commercial honey, Apiacta, 15: 51-60, 1980.

SINERGISMUL SULFAMETOXIDIAZINĂ-TILOZINĂ ÎN CAZUL GENULUI *PASTEURELLA*

SYNERGISM OF SULFAMETHOXIDIAZINE AND TYLOSINE AGAINST PASTEURELLA PATHOGENS

CHEREJI ANCA[1], RAPUNTEAN GH.[1], CHEREJI R.[2], OROS N. A.[1], CERNEA M.[1]
[1]Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca
[2]Biovet Serv. S.R.L.

Bacterial strains from Pasteurella genus were isolated and identified from internal organs and corpses of catlle, sheep, horses, pigs, dogs, cats and poultry.

Broth dilution method was carried out to determine the susceptibility of bacteria to antibiotics. The MIC's of the tested antibiotics were determined and interpreted according to The National Committee for Clinical Laboratory Standard.

The combination between antibiotics from the groups of sulfonamides and macrolides was tested, in comparison with the antibiotics alone. Synergy studies were interpreted by fractional inhibitory concentration index (FIC).

The results according to the FIC formula showed that combination sulfamethoxidiazine-tylosin was synergic in 2 strains and additive also in 2 strains, meaning a 28,57 % percentage synergism and 28,57 % addition. It was observed the phenomenon of indiference in 3 strains - 42,86 %.

Taking into account the percentage of 57,14 % synergism and addition, we can recommend the association of sulfamethoxidiazine and tylosin because of the higher efficiency of this combination in the therapy against Pasteurella pathogens.

Key words: Pasteurella, sulfamethoxidiazine, tylosine

Prin definiţie, bacteriile sunt selectate pentru rezistenţă atunci când sunt supuse acţiunii unui antibiotic. Acest proces biologic natural, care duce la supravieţuirea celor mai rezistente tulpini bacteriene, a fost observat înaintea descoperirii penicilinei, punând în evidentă faptul că rezistenţa este un fenomen natural care a fost întotdeauna prezent alături de noi (FEDESA, 2000).

Unele bacterii sunt rezistente natural la anumite antibiotice, altele au dezvoltat rezistenţă în timp. Rezistenţa bacteriană poate apărea ca o consecinţă a folosirii antibioticelor atât la animale, cât şi la om. Utilizarea greşită a antibioticelor poate facilita acest proces, iar folosirea prudentă a acestor produse valoroase, în concordanţă cu condiţiile de autorizaţie şi recomandările producătorilor, este esenţială (MĂRCULESCU ANCA, 2007).

Creşterea incredibilă a patogenilor rezistenţi faţă de antibiotice este una dintre problemele cu care se confruntă astăzi medicina şi ştiinţa. În acelaşi timp, industria farmaceutică a ajuns la un „platou" în ceea ce priveşte dezvoltarea agenţilor antimicrobieni şi cele mai multe eforturi în dezvoltarea antibioticelor se referă la regimul dozelor, tolerabilitate şi dezvoltarea eficacităţii claselor de antibiotice care există deja. Prin urmare, este vital să înţelegem mecanismele rezistenţei bacteriene, să optimizăm folosirea antibioticelor actuale şi să formulăm strategii pentru minimalizarea rezistenţei faţă de antibiotice (GOOSSENS HERMAN, 2006).

Combinaţiile de antibiotice pot fi utilizate ca o strategie împotriva bacteriilor care şi-au redus sensibilitatea faţă de un singur antibiotic (HOLLANDER J.G., 1998).

În prezentul studiu s-a testat sensibilitatea germenilor genului *Pasteurella* faţă de sulfametoxidiazină şi tilozină, în vederea identificării unui efect mai intens al combinaţiei de antibiotice comparativ cu antibioticele utilizate singure.

MATERIAL ŞI METODĂ

Tulpinile de *Pasteurella* au fost izolate din organe cu leziuni şi cadavre de bovine, ovine, cabaline, porcine, păsări, câini şi pisici.

Au fost efectuate examene bacteriologice şi bacterioscopice în vederea identificării şi izolării germenilor patogeni, pentru acest lucru fiind folosite medii uzuale de cultură, îmbogăţite cu ser, glucoză sau sânge (RĂPUNTEAN GH. şi BOLDIZSAR E., 2001).

În vederea testării sensibilităţii bacteriene la antibiotice s-a realizat metoda diluţiilor în bulion, determinându-se concentraţia minimă inhibitorie (CMI) în cazul antibioticelor folosite (DIGHE A. şi col., 2001; BOLDIZSAR E. şi col., 2002).

Prin această metodă au fost testate antibiotice din grupa sulfonamidelor (sulfametoxidiazina) şi grupa macrolidelor (tilozina), atât singure cât şi în combinaţie.

La ora actuală, una dintre cele mai bune metode pentru aprecierea interacţiunii dintre două antibiotice este reprezentată de calcularea concentraţiei inhibitorii fracţionate şi este 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).

În cadrul tehnicii de lucru, s-au făcut mai multe serii a câte 15 tuburi, în toate tuburile punându-se câte 1 ml de mediu lichid de cultură. În primul tub din prima serie am introdus 240 µg sulfametoxazol (S); în a doua serie 150 µg tilozină (T); în celelaltă serie de tuburi, am făcut combinaţii ale celor două antibiotice (cu cantităţi înjumătăţite faţă de tuburile necombinate): S+T.

După omogenizare se trece din primul tub 1 ml în tubul al doilea, din al doilea în al treilea etc. până la ultimul tub din care se elimină 1 ml. Se obţine astfel o scară de diluţii aproximative. Toate tuburile cu antibiotic se însămânţează cu o cantitate fixă de germeni (câte o picătură cultură din bulion de 18-24 ore). După însămânţare, tuburile sunt incubate la termostat la 37º C timp de 18-24 ore.

Concentraţia minimă inhibitorie (CMI) este dată de cea mai mică diluţie de antibiotic care a inhibat dezvoltarea culturii (mediul rămâne limpede). CMI a fost urmărită pentru fiecare din tulpinile testate, notând cantitatea exactă de antibiotic la care s-a produs inhibarea. Având în vedere diluţiile realizate în fiecare tub, s-a putut calcula cantitatea exactă de antibiotic existentă în fiecare tub, atât pentru antibioticele singure, cât şi pentru asocierile acestora, urmărindu-se CMI pentru tulpinile testate.

Indicele care reprezintă concentraţia inhibitorie fracţionată (CIF) a fost calculat pentru antibioticele utilizate şi pentru combinaţia acestora, pe baza CMI (BOUANCHAUD D.H., 1992).

Totuşi, unii cercetătorii au contestat această metodă (RAND K.H. şi col., 1993). De aceea, în cadrul acestui studiu, am încercat să urmărim dacă activitatea combinaţiei de antibiotice este relevantă pentru aprecierea sinergismului dintre antibiotice.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Această lucrare a testat eficacitatea combinaţiei sulfametoxidiazină-tilozină asupra a 7 tulpini bacteriene aparţinând genului *Pasteurella*, în comparaţie cu eficacitatea sulfametoxidiazinei şi tilozinei utilizate singure.

CMI a antibioticelor testate au fost determinate şi interpretate în conformitate cu standardele internaţionale (NCCLS, M31-A, 1999; NCCLS, M31-T, 1999).

Sinergismul dintre antibiotice a fost interpretat prin calcularea concentraţiei inhibitorii fracţionate (CIF), conform studiilor CF Referral Center for Susceptibility & Synergy (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

Combinaţia sulfametoxidiazină-tilozină (S-T) a fost apreciată ca indiferentă, în cazul tulpinii nr. 1, datorită valorii concentraţiei inhibitorii fracţionate (CIF) – 1,125. Pentru acestă combinaţie, CMI a fost evidenţiată la nivelul tubului 9, la cantitatea de 0,46875 µg pentru S şi 0,2929687 µg pentru T. CMI ale antibioticelor folosite singure au fost: 3,75 µg pentru S (tubul 7) şi 0,2929687 µg pentru T (tubul 10).

În cazul tulpinii nr. 2, CMI a S a fost de 1,875 µg, evidenţiată la nivelul tubului 8, în timp ce pentru T, CMI a fost observată la nivelul tubului 11, unde antibioticul a fost prezent în cantitate de 0,1464843 µg. Combinaţia S-T a produs inhibarea pasteurelelor la nivelul tubului 12, CMI fiind de 0,0585937 µg pentru S şi 0,036621 µg pentru T. Calcularea CIF (0,2812493) a evidenţiat fenomenul de sinergism între cele două antibiotice.

CMI a sulfametoxidiazinei (S) pentru tulpina nr. 3 a fost 1,875 µg, evidenţiată la nivelul tubului 8. În cazul tilozinei (T), CMI s-a realizat în tubul 10, la cantitatea de 0,2929687 µg. Pentru combinaţia S-T, CMI a fost observată în tubul 8, la cantitatea de 0,9375 µg pentru S şi 0,5859375 µg pentru T. CIF, în cazul tulpinii nr. 3, a fost de 2,500003, interpretându-se valoarea acesteia ca indiferenţă.

Tot indiferenţă între cele două antibiotice a fost constatată şi în cazul tulpinii nr. 4, apreciată după calcularea CIF (2,1250006). Acest indice a fost obţinut după înregistrarea valorilor CMI atât pentru antibioticele singure, cât şi în combinaţie: pentru S – 3,75 µg (tubul 7), pentru T – 0,1464843 µg (tubul 11), şi pentru asocierea antibioticelor – S, la cantitatea de 0,46875 µg, iar T, la cantitatea de 0,2929687 µg (tubul 9).

Tulpina nr. 5 a avut CMI la cantitatea de 0,46875 µg pentru S, la nivelul tubului 10 şi 0,2929687 µg pentru T, tot în tubul 10. Prin asocierea S-T, CMI a fost evidenţiată, la cantitatea de 0,234375 µg pentru S şi 0,1464843 µg pentru T, la nivelul aceluiaşi număr 10 al tuburilor seriei combinaţiei de antibiotice. CIF în valoare de 0,9999998 a prezentat asocierea ca fiind aditivă (tabel 2).

CMI a S, pentru tulpina nr. 6, a fost de 3,75 µg, la nivelul tubului 7, în timp ce pentru T a fost de 0,2929687 µg, observată la nivelul tubului 10. Tubul 11 a evidenţiat CMI a combinaţiei, la cantitatea de 0,1171875 µg pentru S şi 0,0732421 µg pentru T, iar valoarea CIF de 0,2812497 a indicat sinergism între antibioticele utilizate.

În cazul tulpinii nr. 7, în urma combinării celor două antibiotice, s-a observat fenomenul de adiţie, la o valoare a CIF de 0,6249998. Tubul 10 a fost cel în care s-a notat CMI a combinaţiei: cantitatea de 0,234375 µg S şi 0,1464843 µg T. La utilizarea S, inhibarea germenilor s-a produs la cantitatea de 1,875 µg, în tubul 8, iar în cazul T la cantitatea de 0,2929687 µg, la nivelul tubului 10.

Prin urmare, în cazul asocierii sulfametoxidiazinei cu tilozina, pentru germenii din genul *Pasteurella,* s-a observat apariţia în procent destul de mare (42,86 %) a fenomenului de indiferenţă, iar fenomenul de adiţie şi sinergism într-un procent mai mic, de 28,57 % din tulpini, pentru fiecare fenomen în parte (grafic 1).

Tabel 2 Valorile CIF pentru asocierea sulfametoxidiazină-tilozină – tulpini genul Pasteurella

Tulpina nr.	CIF	Interpretare
1	1,125	Indiferență
2	0,2812493	Sinergism
3	2,5000003	Indiferență
4	2,1250006	Indiferență
5	0,9999998	Adiție
6	0,2812497	Sinergism
7	0,6249998	Adiție

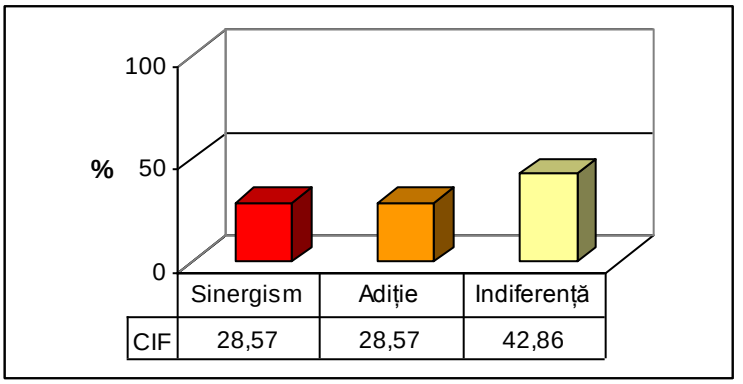


Fig. 1. Aprecierea asocierii sulfametoxidiazină-tilozină în cazul tulpinilor din genul Pasteurella

CONCLUZII

- Antibiotice din grupa sulfonamidelor şi grupa macrolidelor, au fost testate singure şi în combinaţie asupra a 7 tulpini bacteriene ale genului *Pasteurella;*
- Concentraţia minimă inhibitorie a fost determinată prin metoda diluţiilor, interpretarea realizându-se conform standardelor NCCLS
- Indicele concentraţiei inhibitorii fracţionate a fost calculat în cazul acestei combinaţii de antibiotice pentru toate tulpinile
- Asocierea dintre sulfametoxidiazină şi tilozină a determinat fenomene de sinergism, adiţie, dar şi indiferenţă al unui antibiotic faţă de celălalt
- Fenomenul de sinergism a fost notat în acelaşi procent ca şi adiţia - 28,57 %
- Indiferenţă în procent destul de mare - 42,86 % - a fost constatat în cazul combinaţiei sulfametoxidiazină-tilozină
- Având în vedere faptul că sinergismul şi adiţia au fost observate în procent de 57,14 %, se poate recomanda asocierea antibioticelor din aceste grupe, în scopul unei eficienţe crescute în terapie

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 Americam Journal of Gastroenterology Vol. 92, No.4: 659-662;
2. Boldizsar E., Răpuntean S., Fiț N. – Microbiologie Generală. Practicum, Editura Genesis Tipo, Cluj-Napoca, 2002;
3. Bouanchaud D.H. (1992) – In vitro and in vivo synergic activity and fractional inhibitory concentration (FIC) of the components of a semisynthetic streptogramin, RP 59500, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol.30 SUPA, 95-99;
4. Cappelletty M. Diane, M.J. Rybak (1996) – Comparasion of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of Pseudomonas aeruginosa, Antimicrobial Agents and Chemoterapy, 677-683;
5. CF Referral Center for Susceptibility & Synergy – CF Referral Center for Susceptibility & Synergy Studies, Columbia University, New York, 2003
6. Dighe Anand, Jean B.S. Spargo, Mary Jane Ferraro (2001) – Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical Laboratory Reviews, Vol. 9, No. 1;
7. FEDESA (2000) – Antibiotice for animals. A FEDESA perspective on antibiotics, Animal Health and the Resistance Debate, vol. February: 6;
8. Goossens Herman (2006) – Antibiotic Resistance: Highlights of the 16th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 16th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 1 - 4, Nice, France
9. 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;
10. 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;
11. 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;
12. Mărculescu Anca, 2007 – Teză de doctorat: Studiu privind evoluția fenomenului de antibiorezistență şi posibilitatea diminuării acestuia prin asocierea de antibiotice, pe baza relațiilor de sinergism, Universitatea de Ştiințe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, 2007
13. NCCLS, M31-A (1999) – Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, vol.19, No. 11;
14. NCCLS, M31-T (1999) – Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, vol.17, No. 11;
15. 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;
16. Răpuntean Gh., Boldizsar E. – Practicum de Bacteriologie Specială, Ed. AcademicPres, Cluj-Napoca, 2001;
17. Renneberg J. (1988) – Definitions of antibacterial interactions in animal infection models, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 30, Suppl D: 176-75;

CÂTEVA OBSERVAŢII PRIVIND COMPOZIŢIA FIZICO-CHIMICĂ A CĂRNII MELCULUI COMESTIBIL *HELIX POMATIA*

OBSERVATIONS REGARDING THE PHYSICAL AND CHEMICAL COMPOSITION OF THE MEAT FROM THE *HELIX POMATIA* SNAIL

Andreeea-Flavia CÎRLAN, Eusebie ŞINDILAR
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară "Ion Ionescu De La Brad" Iaşi,
Facultatea de Medicină Veterinară, Aleea M. Sadoveanu Nr. 8, Iaşi 700489,
e-mail: flavia_cirlan@yahoo.com

Vineyard snails (H. pomatia) meat has always been highly valued for its dietetic and nutritive properties. The aim of the present research was to study the chemical composititon of the snails growing in natural conditions. We have sampled meat from 30 snails Helix pomatia: 15 were collected from a garden in the city and 15 were collected from the Bucium wood. The assessment of meat chemical properties was carried out according to the standard methods: meat dessication for the moisture level, the Soxhlet method for raw fat, the Kjeldahl method for raw protein and meat calcination for total ash. The values we have obtained are similar to the ones described in the literature. The study also reveals that there are no important differences between the chemical composition of the garden snails and the chemical composition of the wood snails, except for the raw protein level.

Key Words: *Helix pomatia*, snails, chemical composition.

Moluştele, atât cele de apă cât şi cele de uscat, au fost utilizate în alimentaţia omului din cele mai vechi timpuri. Faptul că melcii au făcut parte din hrana omului încă din preistorie, este confirmat de cochiliile descoperite în grote, alături de oase umane. Prima civilizaţie care s-a ocupat cu creşterea melcilor a fost cea a vechilor romani; aceştia îi hrăneau cu plante de tei pentru a le aromatiza carnea. Carnea melcilor este dietetică, fiind săracă în calorii (60-80 cal/100g) şi în lipide (0,5-0,8%), dar bogată în proteine cu înaltă valoare biologică (12-16%), în substanţe minerale şi în azot (2,5%). (Bud I., Oroian Elvira, 2004) Proteinele din compoziţie conţin 9 din cei 10 aminoacizi de care omul are nevoie. Carnea de melc este foarte uşor de asimilat, este hrănitoare şi foarte benefică pentru sănătatea omului: datorită conţinutului de lipide, poate fi utilizată în hrana persoanelor cu regim alimentar dietetic; este indicată în combaterea rahitismului, datorită conţinutului în calciu; aminoacizii din compoziţie contribuie la reconstituirea completă a ţesutului gastric şi deci la vindecarea ulcerului; tot aminoacizii contribuie şi la vindecarea bolilor pulmonare, celor ale bronhiilor şi ale gâtului; complexul glucoprotidic numit helicină combate tusea convulsivă; prin bogăţia de acizi graşi polisaturaţi, combate acumulaea de colesterol; este foarte utilă în timpul sarcinii şi alăptării, datorită conţinutului ridicat în săruri minerale şi fier. (Bud I., Oroian Elvira, 2004) În România, melcul de grădină a început să fie consumat în secolul XIX şi mai ales după primul război mondial. În exportul cărnii de melc, ţara noastră are o tradiţie de peste 50 de ani. Înainte de 1990, din România se exportau 150-250 t carne de melc pe an către Franţa şi Italia. În prezent, melcii au început să fie consumaţi tot mai mult şi la noi şi foarte mult recoltaţi şi valorificaţi la export. În acest scop trebuie îndeplinite o serie de criterii privind igiena şi calitatea cărnii de melci.

MATERIAL ŞI METODĂ

În scopul realizării prezentului studiu, au fost urmate trei etape:

1. Recoltarea materialului biologic

Pentru examinările noastre, am utilizat carnea de la 30 de melci comestibili din specia Helix pomatia. Cincisprezece melci au fost recoltaţi dintr-o grădină, iar cincisprezece din zona de pădure Bucium. Toate exemplarele erau în fază activă.

2. Pregătirea mostrelor de analizat

Pentru a evita alterarea compoziţiei fizico-chimice a cărnii, mostrele au fost prelevate imediat după recoltare, prin detaşarea piciorului de restul corpului. Piciorul melcului este partea utilizată în mod obişnuit în alimentaţie.

3. Analiza chimică a cărnii de melc

Pentru a determina conţinutul în apă al cărnii, am folosit metoda clasică de uscare la etuvă. Prin diferenţa întregreutatea iniţială a produsului analitic şi greutatea după uscare se poate stabili cantitatea de apă conţinută. Mostrele au fost încălzite pînă la temperatura de 103˚C, operaţiune repetată până la obţinerea unei mase constante.

Procentul de apă a fost calculat după formula:

$$\%\ apă\ = \frac{G1 - G2 \times 100}{G}$$

G1 = greutatea în grame a capsulei cu capac + greutatea baghetei + greutatea nisispului şi a produsului înainte de uscare

G2 = greutatea în grame a capsulei cu capac + greutatea baghetei + greutatea nisipului şi a baghetei după uscare

G = greutatea produsului luat în analiză, în grame

Determinarea substanţelor proteice s-a făcut în mod indirect, prin dozarea azotului total după metoda Kjeldahl. Cantitatea de azot găsită s-a înmulţit cu coeficientul 6.25, rezultând cantitatea de substanţe proteice.

Metoda presupune parcurgerea mai multor etape: mineralizarea în balonul Kjeldahl, distilarea, titrarea cu hidroxid de sodiu şi calcularea azotului total după formula:

$$\%\ N\ total\ = \frac{(V \times f - V1 \times f1) \times 0{,}0014 \times 100}{G}$$

Pentru determinarea grăsimilor am utilizat metoda Soxhlet, care presupune extracţia grăsimilor cu ajutorul unui solvent adecvat, într-un sistem închis, prin sifonări repetate, îndepărtarea solventului prin uscare la etuvă şi dozarea grăsimilor extrase prin cântărire.

Calculul conţinutului de grăsime se face după relaţia:

$$Grăsime\ \%\ = \frac{m \times 100}{ml}$$

m = cantitatea de grăsime extrasă, exprimată în grame

m1 = cantitatea de produs luată în lucru, exprimată în grame

Determinarea sărurilor minerale s-a făcut prin calcinare uscată. Produsul este carbonizat, apoi supus calcinării şi cântăririi la balanţa analitică, operaţiuni care se repetă îână la greutate constantă.

Calculul substanţelor minerale se face după relaţia:

$$Cenuşă\ \%\ = \frac{G1 \times 100}{G}$$

G1 = greutatea cenuşei în grame

G = greutatea probei analitice în grame

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute sunt prezentate în tabelul 1:

Compoziţie Fizico-chimică	Locul recoltării	
	Grădină	Pădure
% Apă	80.93	82.56
% Proteine	15.10	16.43
% Grăsime	1.35	1.14
% Săruri minerale	1.23	1.45

Din tabel se observă că melcii din zona de pădure au un conţinut în apă mai ridicat decât cei din zona de grădină. De asemenea, procentul de proteine precum şi procentul de săruri minerale sunt mai mari în carnea melcilor de pădure. Pe de altă parte, procentul de grăsime este mai scăzut în carnea melcilor de pădure faţă de melcii din grădină.

Diferenţele de compoziţie a cărnii melcilor proveniţi din cele două zone diferite se pot datora plantelor cu care ei se hrănesc, precum şi tratamentelor chimice aplicate solului, în cazul celor proveniţi din grădini. Aceştia au un conţinut mai scăzut de proteine şi săruri minerale. În acelaşi timp, procentul de grăsime din carnea lor este mai ridicat. Aceasta s-ar putea datora faptului că melcii din grădini se deplasează mai puţin în căutarea hranei spre deosebire de melcii din păduri, care trebuie să parcurgă trasee mai mari în scopul găsirii plantelor adecvate pentru hrănire.

CONCLUZII

1. Nu s-au observat diferenţe semnificative între principalii componenţi ai cărnii faţă de datele din literatură.
2. Carnea melcilor comestibili are un conţinut ridicat de proteine şi săruri minerale şi un conţinut redus de grăsimi.
3. Observăm lipsa unor diferenţe importante între compoziţia melcilor de grădină şi a celor de pădure, cu toate că procentul de proteine apare mai crescut la carnea melcilor de pădure.

BIBLIOGRAFIE

1. **Balzan S., Buoso M.C., Ceccato D., De Poli M., Giaccone V., Moschini G., Novelli E.** – Investigation on Micronutrient Elements Composition of Terrestrial Snails belonging to the Genus *Helix*, LNL Annual Report, 2001;
2. **Nica D., Bura M., Adela Marc** – Studiu privind influenţa stării metabolice asupra zonei de proveniență asupra proprietăţilor chimice ale cărnii la specia de melc terestru *Helix pomatia*, Simpozion USAMV Iaşi 2005
3. **Ozogul Y., Ozogul F., Olgunoglu A.I.** (2005) – Fatty acid profile and mineral content of the wild snail from the region of the south of Turkey. European Food Research and Technology. 221: 547-549.
4. **Zymantiene J., Zelvyte R., Jukna C., Jukna V., Jonaitis E., Sederevicius A., Mazeikiene Z., Pampariene I., Zinkeviciene J.** (2006) – Selected features of vineyard snails shell, their movement and physico-chemical composition of foot meat. Biotechnology & Biotechnological Equipment. Vol. 20.

CERCETĂRI PRIVIND FRECVENŢA SPECIILOR DE STAPHYLOCOCCUS ÎN LAPTELE CRUD MATERIE PRIMĂ

RESEARCH ON THE FREQUENCY OF STAPHYLOCOCCUS SPECIES IN MILK AS RAW MATERIAL

Constantin CIOTĂU[1], Ionel BONDOC[2], Eusebie ŞINDILAR[2], Eusebie Viorel ŞINDILAR[2]
[1]Direcţia Sanitar Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor Suceava
[2]Facultatea de Medicină Veterinară Iaşi
constantinciotau@yahoo.com

The microbiological quality of whole raw milk for processing purposes is a goal that concerns both producers and processors. Microbiological studies performed by the authors showed the contamination with microorganisms belonging to the Staphylococcus species to be an important one, ranging between 12,98% and 17,19%. Among the Staphylococcus species identified from the samples, first three places by frequency belong to Staphylococcus aureus, Staphylococcus hominis and Staphylococcus sciuri.

Key words*:* raw milk, Staphylococcus, microbiological quality

Stafilococii sunt bacterii de formă cocoidă, Gram-pozitive, dispuse în ciorchine, care se dezvoltă relativ bine pe medii uzuale şi clorurate. Genul *Staphylococcus* aparţine familiei *Micrococcaceae*, care cuprinde alte trei genuri: *Micrococcus, Planococcus* şi *Stomatococcus* (1, 2, 5, 8, 13).

Genul *Staphylococcus* include în prezent câteva zeci de specii, împărţite în două mari grupe, în funcţie de capacitatea lor de a coagula plasma de iepure. Cel mai numeros grup este cel al stafilococilor coagulază-negativi (3, 4, 8, 9, 11, 12). Dintre stafilococii coagulază-pozitivi se disting speciile *Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius* şi *Staphylococcus hyicus*. Stafilococii coagulază-pozitivi sunt bacterii care pe mediile de cultură selective formează colonii tipice şi produc coagulază. Principalul stafilococ coagulază-pozitiv responsabil de toxiinfecţii alimentare colective (T.I.A.C.) la om este *Staphylococcus aureus (S. aureus).* În controlul microbiologic al alimentelor se acordă o mare importanţă stafilococilor coagulază-pozitivi, deoarece se pleacă de la premisa că producerea de coagulază constituie unul din criteriile principale pentru aprecierea indirectă a enterotoxicităţii (5, 6).

Cu toate că între producerea de coagulază şi enterotoxine nu există o relaţie directă absolută, totuşi, pe baza experienţei, dar şi din cauza greutăţilor tehnice şi economice pe care le implică identificarea şi determinarea enterotoxinelor în alimente, se admite prezumţia enterotoxicităţii la stafilococii coagulază-pozitivi. Dealtfel, încă din 1984, DEVRIES şi col. (citat de CHABEAU-DUFOUR C., 1992) arăta că, dacă pe plan taxonomic *Staphylococcus aureus* este omogen, se poate totuşi separa în biotipuri specifice şi nespecifice. Aptitudinea de a produce enterotoxine pare să varieze după biotip. El consideră că produc enterotoxină 30-60% din suşele biotipului uman, cca 10% din suşele biotipului bovin şi 80% din suşele biotipului ovin. Aşa cum s-a putut constata din numeroasele episoade de T.I.A.C. înregistrate până în prezent, în producerea lor, cel mai frecvent incriminat este *Staphylococus aureus* ce aparţine biotipului uman, fiind citate chiar cazuri de toxiinfecţie alimentară de origine endogenă (7).

Frecvenţa contaminării alimentelor cu *Staphylococcus aureus* este variabilă, în funcţie de produs (de la 1% până la peste 80%), nivelul contaminării fiind în general relativ scăzut (9, 10, 12, 13).

Determinarea numărului de stafilococi coagulază-pozitivi se poate face prin *tehnici directe, fără îmbogăţirea inoculului* sau prin *tehnici de lucru cu îmbogăţirea inoculului* (1, 2, 3). În ceea ce priveşte izolarea, există numeroase medii selective, fie că este vorba despre medii solide de izolare sau medii lichide utilizate pentru îmbogăţire.

Dată fiind importanţa bacteriilor din acest gen pentru sănătatea publică, în prezenta lucrare ne-am propus atingerea a două obiective: evaluarea prezenţei bacteriilor din genul *Staphylococcus* în laptele crud materie primă destinat procesării industriale şi evidenţierea prin metode moderne a speciilor de *Staphylococcus* prezente în laptele crud.

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul de lucru a fost reprezentat de 259 probe de lapte crud integral. Probele au fost recoltate din tancurile de refrigerare ale unor unităţi de procesare industrială, din zona de nord a Moldovei.

Determinarea prezenţei şi a numărului de bacterii din specia *Staphylococcus aureus* coagulază pozitiv (c.p.) în laptele crud integral destinat procesării s-a realizat în conformitate cu o metodă standard: SR ISO 6888-1/2002. Identificarea speciilor prezente în laptele crud integral s-a realizat cu analizorul API, pe baza testelor de identificare biochimică incluse în galeriile specifice genului (ID 32 STAPH).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Studiile efectuate au demonstrat că din totalul de 259 probe analizate, 207 probe, reprezentând 79,92% nu au fost contaminate cu bacterii din genul *Staphylococcus* (conform datelor din **tabelul nr. 1**).

Tabelul nr. 1
Situaţia probelor de lapte crud integral supuse examenului microbiologic pentru stabilirea prezenţei/absenţei stafilococilor

Ruta	Nr. probe	Frecvenţa *Staphylococcus spp.* în probele examinate							
		Probe conforme (negative)		Probe pozitive (+), din care:					
				Probe + *Staphylococcus spp.*		Probe + *Staphylococcus aureus*		Probe + Alţi stafilococi	
		A	**R**	**A**	**R**	**A**	**R**	**A**	**R**
I. Vatra Dornei	128	99	77,34	29	22,66	7	5,47	22	17,19
II. Câmpulung	131	108	82,44	23	17,56	6	4,58	17	12,98
Total	259	207	79,92	52	20,08	13	5,02	39	15,06

A = frecvenţa absolută; R = frecvenţa relativă

Proporţia probelor contaminate cu bacterii din genul *Staphylococcus* a fost de 20,08%, înregistrându-se un număr total de 52 probe pozitive.

Dintre cele 52 de probe pozitive, în 13 a fost pus în evidenţă *Staphylococcus aureus,* iar în restul de 39 au fost puşi în evidenţă alţi stafilococi.

Pe baza datelor rezultate, se poate aprecia că în cadrul probelor pozitive, raportul între cele contaminate cu *Staphylococcus aureus* şi cele contaminate cu alte specii de stafilococi a fost de 1:3.

Testele biochimice de diferenţiere au permis stabilirea cu exactitate a speciilor de stafilococi din probele pozitive. Rezultatele acestor teste sunt prezentate în **tabelul nr. 2.**

Rezultatele obţinute demonstrează că, exceptând specia *Staphylococcus aureus,* din probele pozitive, au mai fost evidenţiate încă 10 specii de stafilococi.

Cu toate acestea, rata medie a izolării lui *Staphylococcus aureus* este cea mai ridicată (5,02%), fiind urmată în ordine descrescătoare de *Staphylococcus hominis* (3,09%) şi *Staphylococcus sciuri* (2,70%).

Tabelul nr. 2

Rata izolării speciilor aparţinând genului Staphylococcus din laptele crud integral

Specia de *Staphylococcus* identificată	Incidenţa speciilor de *Staphylococcus* (*S.*) în probele pozitive					
	Ruta I - Vatra Dornei		Ruta II - Câmpulung		Total rute	
	A	**R**	**A**	**R**	**A**	**R**
S. aureus, c.p.	7	5,46	6	4,58	13	5,02
S. sciuri	5	3,90	2	1,53	7	2,70
S. hominis	4	3,12	4	3,05	8	3,09
S. xylosus	3	2,34	0	0	3	1,16
S. epidermidis	3	2,34	3	2,29	6	2,32
S. haemolyticus	2	1,56	1	0,76	3	1,16
S. saprophyticus	2	1,56	2	1,53	4	1,54
S. klosii	1	0,78	2	1,53	3	1,16
S. simulans	1	0,78	1	0,76	2	0,77
S. chromogenes	1	0,78	1	0,76	2	0,77
S. lentus	0	0	1	0,76	1	0,39
Total	**29**	**22,66**	**23**	**17,56**	**52**	**20,08**

A = frecvenţa absolută; R = frecvenţa relativă

CONCLUZII

În condiţiile socio-economice din ţara noastră, bacteriile genului *Staphylococcus* reprezintă încă un pericol biologic important pentru laptele crud integral destinat procesării industriale. Studiile noastre au demonstrat prezenţa acestor bacterii în 20,08% din probele examinate.

Din probele pozitive au fost izolate şi identificate 11 specii de stafilococi, care se diferenţiază între ele pe baza anumitor caracteristici şi a căror semnificaţie igienică şi epidemiologică este diferită.

Staphylococcus aureus reprezintă principala specie a genului izolată din probele pozitive. Rata medie a izolării acestei specii a fost de 5,02%. Specia cu cea mai redusă rată a izolării a fost *Staphylococcus lentus* (0,39%).

Dintre cele 11 specii de stafilococi izolate, cel puţin 7 pot fi apreciate ca potenţial patogene, evaluate prin prisma producţiei de enterotoxine.

Având în vedere rezultatele obţinute se impune implementarea în cel mai scurt timp a bunelor practici de producţie şi a bunelor practici de igienă de-a lungul filierei laptelui, dar în principal la nivelul producţiei primare, astfel încât pericolul reprezentat de prezenţa acestor bacterii în laptele crud integral destinat procesării, să fie redus corespunzător.

BIBLIOGRAFIE

1. **BĂRZOI D., MEICA S., NEGUŢ M., 1999 –** *Toxiinfecţiile alimentare.* Ed. Diacon Coresi, Bucureşti.
2. **BĂRZOI D., APOSTU S., 2002 –** *Microbiologia produselor alimentare.* Ed. RISOPRINT, Cluj-Napoca.
3. **BONDOC I., ŞINDILAR E. V., 2002 –** *Controlul sanitar veterinar al calităţii şi salubrităţii alimentelor. Vol. I.* Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
4. **BONDOC I., 2007 –** *Tehnologia şi controlul calităţii laptelui şi produselor lactate. Vol. I.* Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
5. **CHABEAU-DUFOUR C., 1992 –** *Toxi-infections alimentaires d'origine staphylococcique.* Point Vét., 24, 148, 505-512.
6. **COLOMBARI VIVIANE, MAYER D.B. MARIANA, LAICINI M. ZAIRA, MAMIZUKA ELZA, FRANCO D.G.M. BERNADETTE, DESTRO MARIA TERESA, LANDGRAF MARIZA, 2007 –** *Foodborne outbreak caused by Staphylococcus aureus: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources.* J. Food Prot., 70, 2, 489-493.
7. **DAVOUST B., BAUER M.C., MORILLON M., PUBERT D., GUIARD-MARIGNY O., 1994** – *Un cas d'intoxication alimentaire a staphylocoques d'origine endogène.* Revue Méd. Vét., 145, 12, 941-944.
8. **EUZEBY J.P., 1998** – *Les taxons bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 1997. Revue bibliographique.* Revue Méd. Vét., 149, 1, 15-46.
9. **MEYRAND A., VERNOZY-ROZAND C., 1999 –** *Croissance et entérotoxinogenese de Staphylococcus aureus dans différents fromages.* Revue Méd. Vét., 150, 7, 601-616.
10. **NAKANO S., KOBAYASHI T., FUNABIKI K., MATSUMURA A., NAGAO Y., YAMADA T., 2004 –** *PCR detection of Bacillus and Staphylococcus in various foods.* J. Food Prot., 67, 6, 1271-1277.
11. **REYNAUD A., GIRAUDON N., DUGOUR L., ATRACHE V., SAULNIER M., 1997** – *Comparaison de deux milieux de culture pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (SCP) et mise en évidence de l'entérotoxine H dans quatre fromages français contaminés par des SCP.* Revue Méd. Vét., 148, 8-9, 705-712.
12. **SANDEL M.K., MCKILLIP J.P., 2002 –** *Virulence and recovery of Staphylococcus aureus relevant to the food industry using improvements on traditional approaches.* Food Control, 15, 1, 5-10.
13. **SUTRA L., 1998 –** *Staphylococcus aureus.* In: *Manuel de bactériologie alimentaire* (**SUTRA L., FEDERIGHI M., JOUVE J.L. – coord.**), pag. 53-80. Polytechnica, Paris.

CERCETĂRI PRIVIND SEMNIFICAŢIA DOZĂRII GAMAINTERFERONULUI ÎN DIAGNOSTICUL TUBERCULOZEI BOVINE

RESEARCHES REGARDING THE INTERFERON GAMMA (IFN-Γ) DOSAGE IN BOVINE TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

Chirilă COVALIU[1], Tudor PERIANU[2]
[1] DSVSA Iaşi
[2] FMV Iaşi

The sandwich enzyme immunoassay (EIAs.) used to detect blood interferon gamma (IFN-γ) is a quick investigation test of cell mediated immunity in the diagnosis of bovine tuberculosis and is common with the tuberculin skin-test that is based on stimulating T lymphocytes sensitizing M.bovis previously, but is different of tuberculin skin-test, expressed exclusively local because is done "in vitro".

In order to determine the significance of IFN-γ dosage and correlating it with other diagnostic tests applied, we have sampled cattle from households, traditionally grown in the extensive system. The cattle are grown on pastures during the summer and kept in stabulation on winter. Investigations were conducted on a batch of 67 cattle, of which 29 undergo the comparative tuberculin test and 25 tested by the TT. In all, 67 cattle, E.I.As test was applied for the IFN-γ detection.

Values obtained from IFN-γ dosage from different categories of cattle (classified according to the skin test), are generally higher on TT (tuberculin test) and CTT (comparative tuberculin test) categories positive then the other categories (recontrol). Also, there is a more intense response to stimulation with bovine PPD compared with stimulation using avian PPD, in the same categories, with a inversion of the situation where TT dubious categories and CTT recontrol, in which the response to stimulation with avian PPD is slightly more intense than the one with bovine PPD. We have observed also an approximately equal response to both tuberculin in the negative CTT category.

Key words : tuberculosis, bovine, bovigam, interferon gamma (IFN-γ)

Testul imunoenzimatic (E.I.As.) pentru detectarea gamainterferonului din sânge este o metodă rapidă de investigare a imunităţii mediate celular în diagnosticul tuberculozei bovine.

În general, limfocitele circulante ale animalelor infectate cu Mycobcterium bovis pot să recunoască antigenele specifice prezente în derivatele proteice purificate (PPD). Acest mecanism stă la baza testului E.I.As. de detectare a gammainterferonului. În contact cu antigenele tuberculinice, limfocitele T din cultura de sânge integral sunt stimulate şi secretă gammainterferonul, care este detectat prin utilizarea anticorpilor monoclonali de captură şi de detecţie într-un test imunoenzimatic prin procedeul sandwich (Zarnea C., 1980).

Testul imunoenzimatic are ca element comun cu testul tuberculinic faptul că se bazează pe stimularea limfocitelor T sensibilizate anterior de M.bovis, dar diferă de IDR (intradermoreacţia), exprimată exclusiv local prin aceea că se realizează şi se evidenţiază “in vitro”. Pe de altă parte posibilităţile de comparare distinctă a răspunsurilor în gammainterferon ale unui animal la ambele tuberculine elimină răspunsurile fals pozitive (heteroalergice).

Investigaţiile efectuate în Australia pe aproximativ 13.000 de bovine au demonstrat că testul E.I.As. practicat cu kitul BOVIGAM-TM este mai sensibil decât IDR pentru diagnosticul tuberculozei bovine. Se pot astfel detecta bovine infectate într-un stadiu incipient, tehnica putând fi executată ori de câte ori este necesar, în timp ce testul alergic necesită minim 45 de zile pentru repetare. Avantajul major al metodei este acela că, animalele cu reacţie dubioasă sau cele cu reacţii pozitive la testul intradermic unic, pot fi retestate prin E.I.As. la intervale de 7-10 zile de la testul intradermic. Testul

este mai rapid (rezultatele se obţin în 24 de ore) şi mai sensibil, constituind o alternativă cu largi aplicaţii în studiul imunităţii mediate celular.

Ca orice test biologic, acesta poate furniza rezultate fals-pozitive sau fals-negative în funcţie de condiţiile locale. Parturiţia poate influenţa răspunsul în gammainterferon la antigenele micobacteriene prin depresarea acestuia (Robinson D.S. şi col.,1994). Animalele care au fătat cu cel mult patru săptămâni în urmă trebuie să fie retestate pentru a reduce posibilitatea de apariţie a rezultatelor fals-negative. Testul trebuie interpretat în contextul obţinerii informaţiilor clinice, anamnetice şi epidemiologice asupra animalelor supuse testării.

MATERIAL ŞI METODE

In scopul determinării semnificaţiei dozării gammainterferonului în diagnosticul tuberculozei şi a corelării acestui test cu alte teste aplicate, s-au luat în studiu 67 bovine din gospodăriile populaţiei din mai multe sate ale judeţului crescute în sistem tradiţional extensiv, cu scoatere la păşune în sezonul estival şi menţinere în stabulaţie în sezonul hibernal.

Din cele 67 bovine, 38 au fost testate TU (tuberculinarea intradertmică), iar 29 prin testul comparativ simultan (TCS). Animalele reagente (pozitive şi/sau dubioase) la cele două teste de tuberculinare au fost recontrolate după 15-30 de zile prin metoda imunoenzimatică de detecţie a gamma-interferonului, procedeul sandwich (EIAs- γIFS), folosind trusa ELISA omologată şi comercializată sub denumirea "BOVIGAM-Kit-ELISA", după recomandările producătorului. De la bovinele reagente s-au recltat probe de sânge care au fost heparinizate (heparină litată – Hep-Li) şi procesate în laborator prin stimulare simultană cu aproximativ 33 µg/0,1 ml PPD bovin şi respectiv PPD aviar. În paralel, pentru fiecare probă s-a realizat câte un martor de control, nestimulat (N), prin adăugarea unei cantităţi egale de soluţie fiziologică tamponată (TFS) la pH 7,2. După incubarea culturilor de sânge integral la 37^{o} C, timp de 16-24 ore, s-a recoltat plasma, care a fost analizată imunoenzimatic pentru detecţia gammainterferonului eliberat de limfocite stimulate separat cu PPD bovin (B), cu PPD aviar (A) şi respectiv proba nestimulată (N) Valoarea gammainterferonului a fost determinată spectrofotometric în densitate optică (DO_{450nm}). Dintre acestea, 24 bovine au reacţionat pozitiv şi recontrol la TCS, iar 25 au reacţionat la TU. La toate s-a aplicat testul E.I.As. de detectare a gammainteferonului.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma efecuării testului de dozare a gammainterferonului la 67 de bovine aparţinând lotului de bovine, s-au obţinut rezultatele ilustrate în tabelele 1-7.

Datele au fost încadrate în mai multe categorii în funcţie de testul intradermic aplicat (TCS sau TU) şi de rezultatul testului de dozare a gammainterferonlui.

Tabelul 1.

Rezultatele obţinute prin aplicarea testului Bovigam la probele (9) provenite de la animalele TCS pozitive, Bovigam pozitive (UDO).

Nr.probă	Nestimulat	Aviar	Bovin
1	0.118	0.133	0.186
2	0.118	0.156	0.292
3	0.149	0.189	0.275
4	0.186	0.259	1.27
5	0.157	0.125	0.247
6	0.146	0.179	0.203
8	0.083	0.101	0.133
9	0.337	0.429	0.48
10	0.101	0.108	0.173
Media	0.155	0.186556	0.362111
Dev. standard	0.075037	0.103182	0.355053
Varianţa	0.005631	0.010647	0.126063

Tabelul 2.

Rezultatele aplicării testului Bovigam la probele provenite de la animalele TCS pozitive, Bovigam pozitive (UDO)

Nr. probă	Nestimulat	Aviar	Bovin
14	0.121	0.113	0.114
15	0.072	0.079	0.077
16	0.084	0.081	0.089
18	0.15	0.124	0.181
23	0.112	0.112	0.114
24	0.129	0.12	0.148
25	0.132	0.109	0.11
26	0.119	0.108	0.129
27	0.115	0.132	0.101
28	0.108	0.108	0.128
29	0.155	0.143	0.145
Media	0.117909	0.111727	0.121455
Dev.Standard	0.024773	0.019132	0.029317
Varianța	0.000614	0.000366	0.000859

Tabelul 3.

Rezultatele obținute prin aplicarea testului Bovigam la probele provenite de la animalele TCS recontrol, Bovigam negative (UDO)

Nr. probă	Nestimulat	Aviar	Bovin
11	0,124	0,109	0,099
12	0,256	0,255	0,217
13	0,162	0,148	0,134
Media	0,180667	0,170667	0,15
Dev. standard	0,067951	0,075593	0,060605
Varianța	0,004617	0,005714	0,003673

Tabelul 4.

Rezultatele obținute prin aplicarea testului Bovigam la probele provenite de la animalele TCS negative, Bovigam negative (UDO)

Nr. probă	Nestimulat	Aviar	Bovin
17	0,113	0,119	0,155
19	0,133	0,115	0,116
20	0,123	0,113	0,121
21	0,111	0,147	0,132
22	0,145	0,144	0,111
Media	0,125	0,1276	0,127
Dev. standard	0,014213	0,016517	0,017479
Varianța	0,000202	0,000273	0,000306

Astfel, la categoria TCS pozitive –Bovigam pozitive, valorile obținute la stimularea cu PPD aviar au fost cuprinse între 0,101 UDO şi 0,429 UDO, cu o medie de 0,186 UDO, o deviație standard de 0,103 UDO şi o variantă de 0,01, iar la stimularea cu PPD bovin valorile sunt situate între 0,133 UDO şi 1,270 UDO, o deviație standard de 0,029 UDO şi o varianță de 0,0008.

La categoria TCS recontrol-Bovigam pozitive, este încadrat un singur caz, ale cărui valori sunt la stimularea cu PPD aviar 0,115 UDO, iar la stimularea cu PPD bovin 0,190 UDO.

La categoria TCS recontrol-Bovigam negative valorile obținute la stimularea cu PPD aviar sunt situate între 0,109 UDO şi 0,255 UDO, cu o medie de 0,170 UDO, o deviație standard de 0,075 şi o

varianță d 0,005, iar la stimularea cu PPD bovin valorile sunt cuprinse între 0,099 UDO şi 0,217 UDO, cu o medie de 0,150 UDO, o deviație standard de 0,06 UDO şi o varianță de 0,003.

La categoria TCS negative-Bovigam pozitiv nu s-a încadrat nici o probă.

La categoria TCS negative-Bovigam negative rezultatele obținute la stimularea cu PPD aviar se încadrează între limite de 0,113 UDO şi 0,147 UDO, cu o medie de 0,127 UDO, o deviație standard de 0,016 UDO şi o varianță de 0,0002, iar la stimularea cu PPD bovin s-au obținut valori aflate între 0,111 UDO şi 0,155 UDO, cu o medie de 0,127 UDO, o deviație standard de 0,017 Udo şi o varianță de 0,0003.

Tabelul 5.

Rezultatele obținte prin testul Bovigam la animalele reacţonate pozitiv la TU, Bovigam negative (UDO)

Nr. probă	Nestimulat	Aviar	Bovin
10	0.135	0.073	0.101
36	0.073	0.086	0.082
Media	0.104	0.0795	0.0915
Dev. standard	0.043841	0.009192	0.013435
Varianța	0.001922	0.00008	0.000181

Tabelul 6.

Rezultatele obținute prin testul Bovigam la animalele reacționate dubios la TU, Bovigam pozitive (UDO).

Nr. probă	Nestimulat	Aviar	Bovin
1	0.059	0.059	0.131
3	0.073	0.085	0.134
Media	0.066	0.072	0.1325
Dev. standard	0.009899	0.018385	0.002121
Varianța	0.000098	0.000338	0.000005

La categoria TU pozitive-Bovigam pozitive este încadrată o singură probă la care s-a obținut 0,068 UDO la stimularea cu PPD aviar şi 0,298 UDO la stimularea cu PPD bovin.

La categoria TU pozitive-Bovigam negative valorile obținute la stimularea cu PPD aviar sunt de 0,073 UDO şi 0,086 UDO, cu o medie ede 0,079 UDO, o deviație standard de 0,09 UDO şim o varianță de 0,00008, iar la stimularea cu PPD bovin s-au obținut rezultatele 0,082 UDO şi 0,101 UDO, cu o medie de 0,091 UDO, o deviație standard de 0,013 UDO şi o varianță de 0,0001.

La categoria TU dubios-bovigam pozitive, valorile obținute la stimularea cu PPD aviar se găsesc între 0,059 UDO, cu o medie de 0,072 UDO, o deviație standard de 0,018 UDO şi o varianță de 0,0003, iar la stimularea cu PPD bovin valorile sunt cuprinse între 0,131 UDO şi 0,134 UDO, cu o medie de 0,1325 UDO, o deviație standard de 0,002 UDO şi o varianță de 0,000005.

La categoria TU dubios-Bovigam negative în urma stimulării cu PPD aviar amplitudinea valorilor este cuprinsă între 0,059 UDO şi 0,223 UDO, cu o medie de 0,078 UDO, o deviație standard de 0,028 UDO şi o varianță de 0,0008, iar la stimularea cu PPD bovin limitele valorice sunt de 0,063 UDO şi 0,96 UDO, cu o medie de 0,074, o deviație standard de 0,0073 UDO şi o varianță de 0,00005.

Tabelul 7.

Rezultatele obţinute prin testul Bovigam la animalele reacţionate dubios la TU, Bovigam negative (UDO)

Nr. probă	Nestimulat	Aviar	Bovin
4	0.089	0.079	0.077
5	0.071	0.059	0.063
6	0.063	0.072	0.065
7	0.079	0.07	0.066
8	0.063	0.064	0.072
9	0.095	0.113	0.083
11	0.086	0.082	0.068
12	0.072	0.073	0.07
13	0.083	0.066	0.074
14	0.078	0.07	0.069
15	0.062	0.065	0.083
16	0.079	0.071	0.073
17	0.071	0.066	0.074
18	0.078	0.067	0.077
19	0.074	0.066	0.076
20	0.075	0.105	0.068
21	0.091	0.075	0.072
22	0.067	0.064	0.084
23	0.092	0.08	0.083
24	0.072	0.069	0.076
25	0.129	0.069	0.074
26	0.081	0.065	0.069
27	0.08	0.071	0.067
28	0.068	0.068	0.065
29	0.074	0.074	0.066
30	0.081	0.233	0.086
31	0.077	0.069	0.081
32	0.126	0.09	0.096
33	0.087	0.079	0.076
34	0.083	0.07	0.067
35	0.079	0.072	0.08
37	0.081	0.08	0.074
38	0.067	0.072	0.074
Media	0.080394	0.078121	0.074182
Dev. standard	0.014769	0.0028275	0.007376
Varianţa	0.000218	0.000799	0.00005

DISCUŢII

Sub acţiunea unui stimul antigenic de tip viral, celulele sintetizează o moleculă cu efect antiviral, numită interferon (alfa şi beta interferonii). Celulele limfoide activate prin antigen sunt capabile să producă o substanţă cu acţiune biochimică similară interferonului, dar cu o structură chimică şi antigenică distinctă (Moraru, 1984). Aceasta a fost numită interferon imun sau gammainterferon. Principala sursă a gammainterferonului este reprezentată de limfocitul T activat, direct legat de fluxul informaţional antigenic (Pereţianu şi col.,1998).

Proprietatea limfocitelor T sensibilizate de a secreta gammainterferonul şi in vitro a fost exploatată prin elaborarea testului de dozare a gammainterfeonului.

Valorile obţinute în urma dozării gammainterferonului la diferite categorii de bovine (încadrate în funcţie de testul intradermic), sunt în general mai mari la categoriile TU şi TCS pozitive, faţă de celelalte categorii. De asemenea, se observă un răspuns mai intens la stimularea cu PPD bovin

comparativ cu stimularea cu PPD aviar, la aceleaţi categorii, cu o inversare a situaţiei în cazul categoriilor TU dubios şi respectiv TCS recontrol, în care răspunsul la stimularea cu PPD aviar este însă doar ceva mai intens decât la cea cu PPD bovin, şi o aproximativă egalitate a răspunsului la ambele tuberculine în cazul categoriei TCS negative.

Urmărind valorile obţinute se poate constata că diferenţe foarte mari la citirea testului intradermic la tuberculina bovină cum sunt mediile de peste 7 mm pot să fie reflectate sau nu în valorile testului Bovigam. Este desigur posibilă aici intervenţia unor alte cauze care determină asemenea rezultate, cum sunt parazitozele cronice (de ex. Linguatuloza) care nu cedează la tratamentele antiparazitare.

La toate categoriile, altele decât cea pozitivă, se constată că valorile densităţilor optice pentru testul Bovigam se menţin sub 0,150 în medie.

Dacă se examinează valorile individuale şi nu cele medii, se observă că în alte categorii decât cea pozitivă se regăsesc valori peste limita medie menţionată anterior.

Se pare că, din acest motiv, testul Bovigam are mai curând valoare de diagnostic de grup decât de diagnostic individual.

Valorile obţinute în cazul testului unic urmează acelaţi tipic. Cu toate că animalele sunt încadrate în categoria dubios prin TU valorile obţinute pentru Bovigam pozitive sunt mult sub DO 0,150. Rezultă de aici că regula aplicată anterior la TCS nu este utilizabilă în cazul TU.

CONCLUZII

- Testele intradermice au permis ierarhizarea animalelor în categoriile pozitiv şi dubios, respectiv pozitiv şi recontrol din punct de vedere al sensibilităţii tuberculinice, rezultate care nu s-au constant cu cele obţinute cu testul Bovigam.
- Cifra medie de pozitivitate la testul Bovigam este 0,150, iar testul pare să aibă o valoare de diagnostic de grup mai mult decât de diagnostic individual..
- Coeficientul de corelaţie calculaţi pentru perechile de şiruri de valori obţinute prin testele TCS şi Bovigam denotă o dependenţă directă în cazul stimulării cu tuberculină de tip aviar, atât pentru valori pozitive la Bovigam, cât şi pentru cele negative la Bovigam ($r=0,68$, $p<0,001$, respectiv $r=0,65$, $p<0,001$).
- În cazul testului unic, corelaţia este foarte strânsă între cele două şiruri de valori (TU-Bovigam) dar inversă în cazul animalelor TU pozitive.
- Testul EIAs-γIFN, procedeul sandwich utilizând kitl comercial BOVIGAM-Kit-EIA omologat în România este o metodă expeditivă faţă de tuberculinare. Rezultatele se obţin în 24-48 de ore, faţă de 72 de ore, în testele clasice.
- Testul EIAs-γIFN permite analiza separată şi simultană a probei de sânge, utilizând două sau mai multe antigene pentru stimularea diferenţiată a producţiei de gamma-interferon.
- Valoarea de diagnostic, superioară metodelor de tuberculinare, este asigurată prin componentele biologice ale kitului BOVIGAM, care utilizează fracţiuni de anticorpi monoclonali (Fab2 şi Fab9) anti gamma-interferon bovin de captură şi detecţie şi seruri de control pozitive şi negative cu grad înalt de specificitate.

BIBLIOGRAFIE

1. Miciora R. (1996) Surse de eroare în diagnosticul alergic al tuberculozei bovine. Rev. Rom.Med.Vet. vol.6, 1, 39-46.
2. Niţă C. (2004) – Diagnosticul tuberculozei bovine în judeţul Vaslui prin testul imunoenzimatic-procdedeul sandwich pentru detectarea gamma-interferonului. – Rev. RomMed.Vet. vol.14, 3, 149 -154.
3. Opris Anca, Spânu Marina, Brudaşcă Gh. F., Dobrean V. , Sandru Carmen, Olaru I (2001) – Corelaţii ale unor efectori umorali cu nivelele gammainterferonului la bovine tuberculino-reagente. –F.M.V. Bucureşti, Simpozion la 140 de ani"Alma Mater Veterinaria Bucurescensis, Ed.ALL, Bucureşti 2001,pag.269.
4. Popescu Şt. (1999) – Ghid de diagnostic complex al tuberculozei bovine. – Ed.IDSA (uz intern).
5. Rothrl J.S., Jones S.L., Corner L.A., Cox J.C., Wood P.R. (1990) A sandwich immunoassay for bovine imterferon-gamma and its use for detection of tuberculosis in cattle. – Aust. Vet. J., 67, 134-137.
6. Samarineanu M., Miciora R., Popovici V. (1995) – Rezultatele unui test de imunostimulare a limfocitelor (TISL) aplicat în diagnosticul tuberculozei bovinelor. – Rev.Rom.Med.Vet., vol.5, 21-30.

OBSERVAŢII PRIVIND TUBERCULOZA BOVINĂ ÎN JUDEŢUL IAŞI

OBSERVATIONS REGARDING BOVINE TUBERCULOSIS IN IASI COUNTY

COVALIU C..[1], PERIANU T.[2]
[1]DSVSA Iaşi
[2]FMV Iaşi

The surveillance investigations were made during 2000-2008 in a heard of 1203870 cattle, using the tuberculin test, than the simultaneous comparative tuberculin test and the Bovigam test. Following the test, the positive animals have been eliminated step by step and bacteriological exams have been done in order to confirm the presence of alcohol-acid resistant bacteria in the gross lesions observed on the carcases.

After performing the tuberculin test, 2126 (0,18%) bovines were positive and 2997 (0,25%) were retested.

The comparative simultaneous tuberculin test performed on 4914 bovines showed positive reaction in 18(0,36%) bovines, negative reaction in 4840 (98,5%) bovines and 56 (1,14%) were retested.

The serological testing made on 205 samples using the Bovigam test showed positive reaction in 17 (8,26%) bovines, negative reaction in 182 (87,37%) bovines and 9 (4,37%) were retested.

From the 25 bovines slaughtered, the tuberculosis infection was confirmed in 4 (16%), and for the rest of 21 (84%), the results were negative.

Key words: cattle, tuberculin test, comparative simultaneous tuberculin test, Bovigam.

INTRODUCERE

Tuberculoza bovină constituie o piedică serioasă în dezvoltarea creşterii animalelor şi o gravă ameninţare pentru sănătatea publică.

În trecut, datorită extensiei sale în masa populaţiei şi caracterului practic incurabil, tuberculoza a fost considerată secole de-a rândul drept un important pericol social, pentru care nu existau remedii suficiente.

În ultimii 70 de ani, deşi au devenit disponibile mijloace şi strategii de combatere a bolii, tuberculoza continuă să reprezinte, la scară mondială, o problemă gravă de sănătate comunitară. Date recente ale Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii arată că, în prezent, aproximativ o treime din populaţia lumii este infectată cu Mycobacterium tuberculosis şi că anual se înregistrează circa nouă milioane de cazuri noi de îmbolnăvire. Bovinele reprezintă principalul rezervor de Mycobacterium bovis şi pot transmite infecţia la un număr mare de mamifere, printre care şi omul. Acesta contractează infecţa, mai ales, prin consumul de lapte crud şi de produse lactate sau prin inhalaţie.

Având în vedere prezenţa infecţiilor cu Micobacterium bovis, ca şi posibilitatea transmiterii la om prin diferite modalităţi, ne-am propus a investiga prevalenţa tuberculozei la bovinele din judeţul Iaşi.

MATERIALE ŞI METODE

Investigaţiile au fost efectuate în perioada 2000-2008, pe un efective de 1.203.830 bovine din judeţul Iaşi. Animalele testate au aparţinut la diferite categorii de vârstă, majoritatea adulte adulte, vaci pentru lapte, cu starea de întreţinere în general bună.

Investigaţiile s-au efectuat prin testul unic, apoi prin testul comparativ simultan şi prin testul Bovigam. Prin coroborarea rezultatelor obţinute s-a recurs la eliminarea animalelor reacţionate, în diferite etape şi efectuarea de examene bacteriologice (bacterioscopice, bacteriologice şi proba biologică pe cobai), prin care s-a confirmat sau infirmat prezenţa bacteriilor alcoolo-alcalo-acido rezistente în leziunile observate la examenul de abator.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

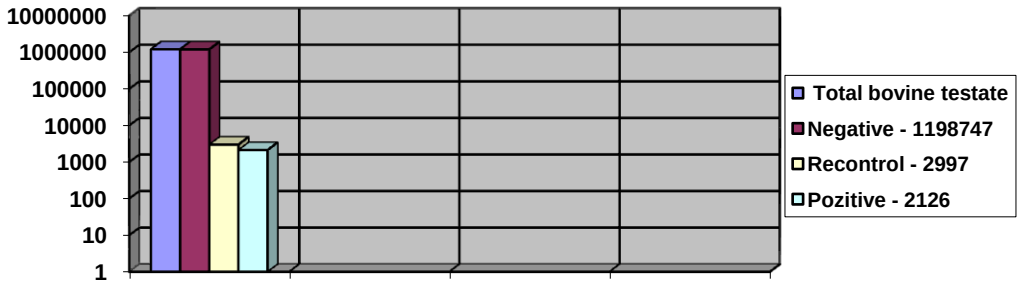
În urma investigaţiilor efectuate în perioada 2000-2008, pe un efectiv de 1.203.830 bovine, prevalenţa tuberculozei, s-au obţinut erezultatele (tabelul 1 şi fig.1).

Tabelul 1 Situaţia supravegherii tuberculozei la bovine în perioada 2000-2008

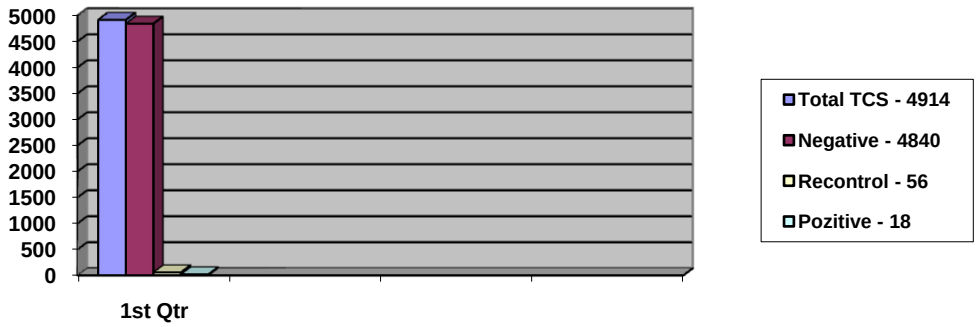
Anul Campania		Nr. bovine	Nr. Bovine Tuberculinabile	Tuber. Test Unic.	Reyultat La T.U.		Bovine Retestate din care		Rezultat La TCS			Rezultat Ex.serologic			Specificare.
					+	+/-	TCS	Ex. Ser.	+	+/-	-	+	+/-	-	
2000	I	91976	70208	69455	145	155	230	66	-	-	230	15	7	48	3 sacri (-)
	II	88186	71909	70945	125	131	250	6	-	4	246	1	-	5	5 sacr. 4(-) şi 1(+)
2001	I	92150	69789	69545	150	152	169	133	-	-	169	2	2	129	-
	II	90502	75203	71226	102	237	339	-	-	-	339	-	-	-	7 sacr. 2 (+)
2002	I	100200	75491	73105	181	228	409	-	9	14	386	-	-	-	-
	II	95750	81495	80137	90	168	258	-	-	-	258	-	-	-	-
2003	I	108474	95885	98379	91	138	229	-	-	-	229	-	-	-	-
	II	99787	91216	88511	49	203	252	-	-	-	252	-	-	-	-
2004	I	108018	95753	94146	204	232	436	-	3	10	423	-	-	-	3 sacr (-)
	II	94428	86667	84654	327	353	680	-	-	28	652	-	-	-	-
2005	I	85850	80988	78853	126	192	318	-	-	-	318	-	-	-	-
	II	55254	54622	53075	85	90	175	-	1	-	174	-	-	-	1 (+)
2006	I	111061	98750	96758	138	207	345	-	-	-	345	-	-	-	-
	II	107615	102700	101324	164	245	409	-	-	-	409	-	-	-	-
2008	I	83443	80110	77667	149	266	415	-	5	-	410	-	-	-	5 sac. (-)
Total		1412694	1230786	1203870	2126	2997	4914	205	18	56	4840	17	9	182	

Notă: în cursul anului 2007, pe teritoriul judeţului Iaşi, nu au fost efectuate acţiuni de tuberculinare, conform prevederilor programului cifric anual al acţiunilor sanitare veterinare.

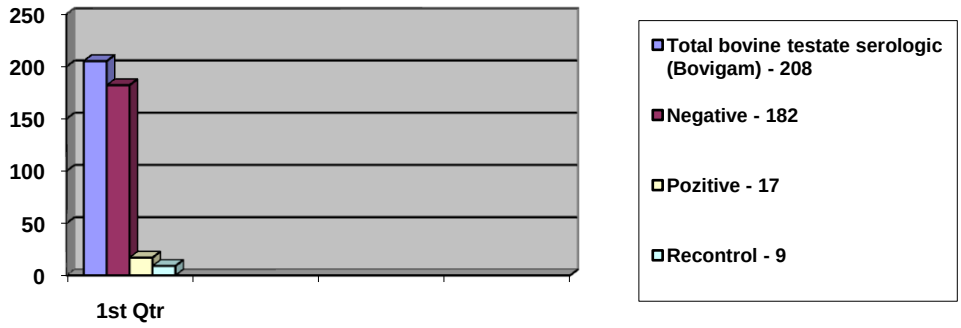
Din analiza rezultatelor obţinute, se observă că din 1.203.870 bovine supuse testului unic de tuberculinare, 1198747 (99,57%) au reacţionat negativ, 2.126 (0,18%) au reacţionat pozitiv, iar 2.997 (0,25%) recontrol.



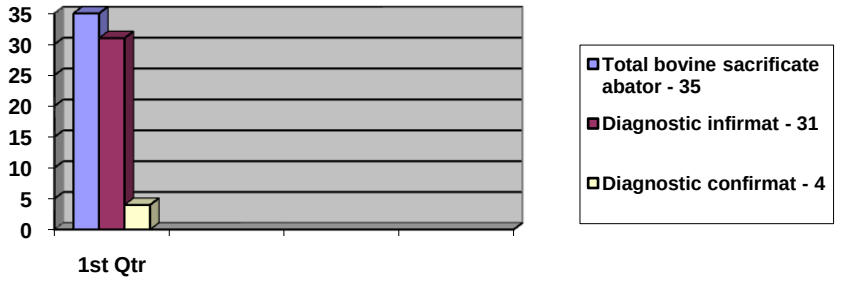
Testul comparativ simultan de tuberculinare (TCS), efectuat la 4.914 (cu reacţii pozitive şi recontrol la testul unic) a evidenţiat reacţii pozitive la 18 (0,36%) bovine, recontrol la 56 (1,14%) şi reacţii negative la 4.840 (98,5%) bovine.



Examenul serologic efectuat la 208 probe prin testul Bovigam, a evidenţiat reacţii pozitive la 17 (8,26%) bovine, recontrol la 9 (4,37%) şi negativ la 182 (87,37%) negativ.



Din cele 35 de bovine cu reacţii pozitive la testul comparativ simultan şi la testul Bovigam, sacrificate în abator, la 4 (11,43%) s-a confirmnat infecţia tuberculoasă, iar la 31 (88,57%) s-a infirmat, examenul de laborator fiind negativ.



CONCLUZII

În urma investigaţiilor privind prevalenţa tubercuozei bovine în judeţul Iaşi, în perioada 2000-2008, se desprind următoarele concluzii:

1. Din 1203870 bovine supuse tuberculinării prin testul unic, un număr de 2126 au reacţionat pozitiv, ceea ce repreintă 0,18%, iar 2997 (0,25%) au fost încadrate în categoria recontrol
2. Din cele 4.914 bovine (cu reacţii pozitive şi recontrol la testul unic) tuberculinate prin testul comparativ simultan (TCS), 18 (0,36%) bovine au reacţionat pozitiv, 56 (1,14%) recontrol şi 4840 (98,5%) au fost negative.
3. Examenul serologic efectuat la 205 probe prin testul Bovigam, a evidenţiat reacţii pozitive la 17 (8,26%) bovine, recontrol la 9 (4,37%) şi negativ la 182 (87,37%) .
4. Din cele 25 de bovine cu reacţii pozitive pozitive la testul comparativ simultan şi la testul Bovigam, sacrificate în abator, la 4 (16%) s-a confirmnat infecţia tuberculoasă, iar la 21 (84%) s-a infirmat, examenul fiind negativ.

BIBLIOGRAFIE

1. Băieş I.(1958) – Tuberculoza animalelor domestice. - Ed.Agrosilvică de Stat, Bucureşti.
2. Bénet J.J. (1988) –La luttre contre la tuberculose bovine en France en 1987. – Epidemiologie et Santé Animale, nr.14, 16 : 53-59, 49-52.
3. Buddle B.M., Aldwell F.E., Pfeffer A., de Lisle W.G., Corner L.A.(1994) – Exprimental Mycobcterium bovis on immune responses and distribution of lesion. – New Zeeland Vet. Journal, 42, 167-172.
4. Collins F.M. (1994) – Immune response to mycobacterial infection: development of new vaccines.Vet. Microbiol., 40: 95-110.
5. Collins F.M. (1996) – Veterinary Microbiology. –Traducere în "Buletin de informare ştiinţifică", 1, 89, LCSVD, Buc.
6. Collins Dessmond M., Radford Anthony J., de Lisle Geoffrey W.,Billman-Jacobe H. (1994) – Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. – Vet. Microbiology, 40: 83-94.
7. Ionică C., Ciortea Gr., Miclea bEug.I. (1973) – Tuberculoza animalelor domestice. –Ed. "Ceres", Bucureşti.
8. Miciora R. (2000) – Aspecte epidemiologice ale infecţiei cu Mycobacterium bovis la om şi animale. – Revista Română de Med. Veterinară, vol.10, nr.4, 355-371.
9. Miciora R. (2001) – Aspecte epidemiologice ale infecţiei cu M.bovis la om şi animale. Re.Românâ de med.vet., Vol.11, nr.1, 19-32.
10. Miciora R.(1999) – Progresele cercetării ştiinţifice în stadiul antigenelor micobacteriene. – Rev. Română de Med.Veterimnară, Vol.,9, nr.2, 121-137.
11. Moga – Mânzat R. (coordonator) s.a. (2001) . Boli infecţioase ale animalelor. –Ed."Brumar", Timişoara..
12. Paul I. (2005) – Etiomorfopatologia bacteriozelor la animale. – Ed."Pim", Iaşi.
13. Perianu T. (2003) – Boli infecţioase ale animalelor. Bacterioze. Vol.I. - Ed. "Venus", Iaşi.
14. Pop M., Vasiu C., Răpuntean Gh.(1981) – Ghid de diagnostic în bolile infecţioase la animale. –Ed."Ceres", Bucureşti
15. Rodostitrs O.M., Gay C.C., Blod D.C., Hinchliff K.W.(2000) – Veterinary Medicine. A text book of the Disease of Cattle, Sheep, Piong, Goats and Horses. –Ninth edition, W.B., Sunders Company Ltd. SUA.
16. Popescu S. (1999) – Ghid de diagnostic complex în tuberculoza bovinelor. – Editat la I.D.S.A., Bucureşti.
17. Simion N. (2003) – Evoluţia incidenţei tuberculozei bovine în România în perioada 1990-2002. – Rev.Română de Medicină Veterinară Vol.13, 3-4, 475.
18. Vasiu Constanin (2005) – Boli infecţioase la animale. Bacterioze. –Editura "Mega", Cluj-Napoca.

ASPECTE PRIVIND DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎNTR-UN FOCAR DE PESTĂ PORCINĂ CLASICĂ DIN PARTEA DE VEST A ROMÂNIEI

ASPECTS OF LABORATORY DIAGNOSIS IN AN OUTBREAK OF CLASSICAL SWINE FEVER IN THE WESTERN PART OF ROMANIA

COMAN M., OLARIU-JURCA I., STANCU A., PETRINA C., COMAN ALINA
FMV TIMIŞOARA
mariancoman44@gmail.com

Histopathological picture of PPC in the present moment identify exsudative predominantly inflammatory processes in various organs and circulatory changes in the spleen marginal red heart.

Inflammatory processes are represented by haemorhagic inflammation in outbreaks in limphonoduri and kidney, inflammation difteroide circumscribed in the intestine and diffuse inflammation limphomonocitare in encephalon.

Results for bacteriological pathogens were negative, while virological examination and PCR test were positive in all 14 cases investigated.

Anatomico- and histopathological exams are insufficient to put a PPC diagnostic.

At present methods of laboratory aims prominences of viruses and/or antibodies are required to establish a clear diagnosis in PPC.

Key words: classical swine fever, histopathological, bacteriological, virusological

Caracterele epidemiologice, aspectele clinice şi tabloul morfopatologic în forma acută-subacută pot să conducă deseori la suspiciunea de pestă porcină clasică (PPC). Dar, având în vedere că tabloul clinic este foarte variat, utilizarea metodelor de laborator pentru un diagnostic cert este esențială în toate cazurile (2, 4, 8, 9, 10, 11).

Scopul lucrării de față a urmărit: evaluarea leziunilor organice în vederea stabilirii diagnosticului nosologic, de a preciza formele histopatologice cele mai frecvente, de a decide ponderea diagnosticului bolii prin diferite metode: anatomopatologice, histopatologice şi de laborator, pentru a stabili tabloul lezional cel mai caracteristic al PPC în perioada actuală.

MATERIALE ŞI METODE

Materialul prezentei lucrări l-a constituit 188 porcine neimunizate contra PPC (13 purcei de 7 săptămâni, 115 capete tineret cu vârsta între 2,5 şi 3,5 luni, 4 scrofițe de 9 luni, 20 capete scroafe gestante, 32 capete scroafe negestante, 1 vier, 3 capete porci graşi), dintr-o fermă din județul Arad.

S-au recoltat 40 de probe de sânge (20 de probe de la scroafe şi 20 de probe de la tineret suin), s-au prelevat probe de organe de la o scroafă şi de la 14 cadavre de tineret porcin.

Examenele solicitate vizau modificările histopatologice, apoi examenul bacteriologic, virusologic şi testul PCR A 130 pentru confirmarea diagnosticului de PPC.

Pentru examenul histopatologic fragmentele au fost prelevate din limfonoduri, splină, rinichi, intestin şi encefal, au fost fixate în formaldehidă soluție 10%, secționate la 6 µm şi colorate prin diverse metode de laborator (HEA, Giemsa).

REZULTATE ŞI DISCUȚII

Toate cele 188 de capete de suine au fost declarate bolnave de PPC, din care au fost ucise 174 animale, diferența de 14 cadavre au fost trimise pentru examene de laborator.

La examenul ***limfonodurilor mezenterice*** a fost diagnosticată o inflamație hemoragică multifocală (limfonodulită hemoragică în focare). Exsudatul hemoragic este prezent sub formă de pete roşietice, bine circumscrise, în sinusurile perifoliculare dar şi în sinusurile subcapsulare. Acest

aspect microscopic este prezent şi macroscopic imprimând aspectul de „limfonod marmorat sau mozaicat" (fig. 1).

Prezența inflamației hemoragice semnifică alterări severe ale pereților vasculari şi denotă evoluția supraacută sau acută a bolii.

În ***splină*** au fost diagnosticate infarcte roşii marginale. Cu lupa microscopică se evidențiază necroza hemoragică marginală accentuată care se intrică cu teritorii mai deschise la culoare reprezentând țesutul limfoid restant. În structura vaselor de sânge, între intimă şi media, se decelează hialinoza interstițială vasculară manifestată morfologic prin îngroşarea pereților şi obliterarea treptată a lumenului (fig.2). Se consideră infarcte de natură pestoasă numai acelea la care examenul microscopic evidențiază hialinoza pereților vasculari şi chiar tromboză (4, 8, 10, 11).

În ***rinichi***, imaginea structurii microscopice decelează prezența unui exsudat hemoragic interstițial. Acesta este prezent în jurul corpusculilor renali (periglomerular) însă predomină în jurul tubilor uriniferi (peritubular). În unele cazuri exsudatul hemoragic se extinde şi în lumenul nefronilor. Imaginea descrisă corespunde morfopatologic diagnosticului de nefrită interstițială hemoragică (fig.3).

Intestinul din jurul valvulei ileocecale prezintă modificări evidente în mucoasă şi în submucoasă. Mucoasa prezintă necroze de coagulare focale şi depozite fibrinoase, observându-se doar conturul lor fără structuri celulare. Submucoasa este mărită în volum pe seama hiperplaziei foliculilor limfoizi, a proliferării limfohistiocitare difuze, a hialinozei pereților vasculari şi chiar trombi fibrinoşi în vasele limfatice (fig. 4).

În ***encefal*** se identifică encefalită limfohistiocitară (limfomonocitară) manifestată morfologic prin perivascularite şi noduli gliali.

Encefalita limfohistiocitară se constată în jurul vaselor de sânge sub forma unor manşoane celulare stratificate (perivascularite) care determină atrofia țesutului nervos perivascular (fig. 5).

Nodulii gliali se formează fie pe locul neuronilor degenerați, fie pe locul capilarelor distruse. Ei sunt constituiți din gliocitele mici, cantonate în teritoriile rezultate în urma fagocitozei structurilor distruse (fig. 6).

Absența fibroblastelor şi a angioblastelor în focarul inflamator pare să sugereze natura exsudativă a inflamației encefalice (8, 10).

Examenul bacteriologic efectuat din probele recoltate a fost negativ în toate cele 14 probe examinate.

Examenul virusologic: Identificarea virusului PPC s-a făcut prin Imunofluorescență Directă (IFD), pe frotiuri din măduva roşie hematoformatoare din prima sau a doua sternebră. Rezultatele examenelor virusologice pentru PPC (A 130) prin IFD au fost pozitive în toate cele 14 cazuri.

Testul PCR: Diagnosticul PPC prin această metodă vizează identificarea acidului nucleic viral. Probele de organe au fost pozitive pentru genomul specific A 130 (PPC) în 14 din 14 cazuri.

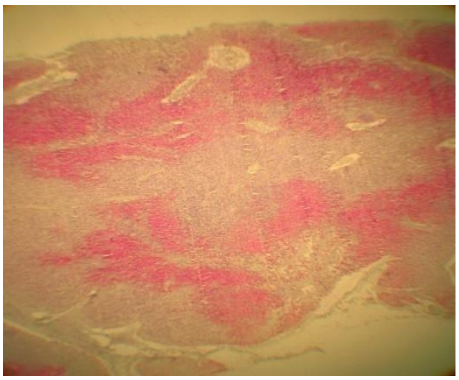


Fig. 1. Limfonodulită hemoragică în focare. Col. HEA, 10X20

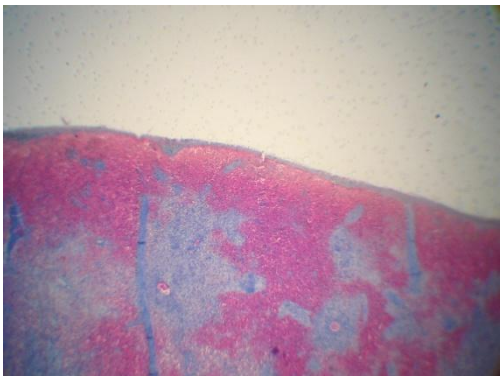


Fig. 2. Infarcte roşii splenice marginale. Col. HEA, 10X20

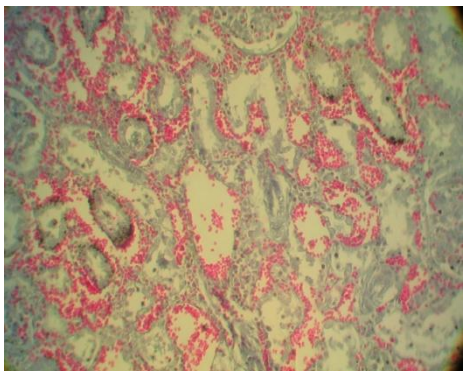


Fig. 3. Nefrită interstiţială hemoragică. Col. HEA, 10X20

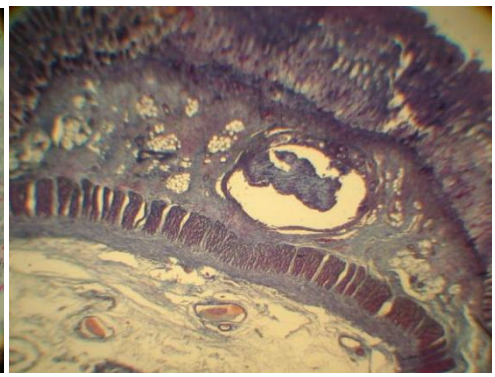


Fig. 4.Colită difteroidă în focare. Col. HEA, 10X10

Fig. 5.Encefalită limfohistiocitară-perivascularită Col. HEA, 10X20

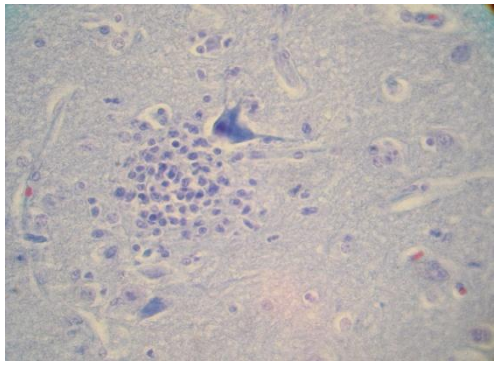


Fig. 6. Encefalită limfohistiocitară-nodul glial . Col. HEA, 10X20

CONCLUZII

Tabloul histopatologic al PPC în etapa actuală identifică procese inflamatorii predominant exsudative în diverse organe, respectiv modificări circulatorii în splină – infarcte roşii marginale.

Procesele inflamatorii sunt reprezentate prin inflamaţii hemoragice în focare, în limfonoduri şi în rinichi, inflamaţii difteroide circumscrise în intestin şi inflamaţii limfomonocitare difuze în encefal.

Rezultatul examenului bacteriologic pentru germenii patogeni specifici a fost **negativ** în toate cele 14 cazuri investigate.

Examenul virusologic este **pozitiv** pentru PPC (A 130), prin imunofluorescenţă directă (IFD) la toate cele 14 cazuri investigate .

La testul PCR, probele de organe sunt **pozitive** pentru genul specific A 130 la 14/14 cazuri.

Examenele anatomo- şi histopatologice nu sunt patognomonice pentru diagnosticul PPC.

În etapa actuală metodele de laborator care vizează decelarea virusurilor şi/sau anticorpilor devin obligatorii pentru stabilirea unui diagnostic cert în PPC.

BIBLIOGRAFIE

1. De Smit A.J., Bouma A., Terpstra C., Van Oirschot J.T. (1999) – Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. Vet Microbiol 67:239-249.
2. Dewulf J, Koenen F, Mintiens K, Denis P, Ribbens S, deKruif A. (2004) – Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. J Virol Methods 119:137-143.
3. Edwards S., Fuchusho A., Lefevre P.C., Lipowski A., Pejsak Z., Roehe P., Westergaard J. (2000) – Classical swine fever: The global situation. Vet Microbiol 73:103-119.
4. Jubb K., Kenedy P.C., Palmer H. (1993) - Pathology of domestic animals-Fourth edition, Academic Press, New York –London.
5. Knoetig S.M., Summerfield A., Spagnuolo-Weaver M., McCullough K.C. (1999) – Immunopathogenesis of classical swine fever: Role of monocytes cell. Immunology 97:359-366.
6. Moennig V., Fioegel Niesmann G., Greiser-Wilke I. (2003) – Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. Vet J 165:11-20.
7. Paton D.J., Greiser-Wilke I. (2003) – Classical swine fever – An update. Res Vet Sci 75:169-178.
8. Paul I. (1996) – Etiomorfopatologia veterinară , Ed. All ,Bucureşti ,
9. R. Moga Mânzat (2005) – Boli virotice şi prionice ale animalelor. Ed. Brumar, Timişoara.
10. Slauson D., Cooper B. (2002) - Mecanisms of Disease, Ed. Mosby, St. Louis, Missouri.
11. Straw E.B., Zimmerman J.J., D`Allaire Taylor D.J. (2006) – Diseases of swine, 9th edition. Ed. Blackwele, 109-219.

CERCETĂRI PRIVIND IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA SPECIEI CAMPYLOBACTER SPP. DIN CECUMURI ŞI DE PE PASĂRILE DESTINATE SACRIFICĂRII

RESEARCHES CONCERNING ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CAMPYLOBACTER SPP FROM POULTRY CECUM AND CARCASSES

CRETU CARMEN, GUGUIANU ELEONORA, RIMBU CRISTINA, HRISCU ELENA, CARP CARARE M.
F.M.V. IAŞI

Thermotolerant Campylobacter, particularly Campylobacter jejuni, is recognized as a common cause of foodborne illness in humans.

The broiller are the main reservoir of Campylobacter involved in foodborne illness. Campylobacter is a regular guest at the digestive tract especially in the terminal parts (ileum, cecum).

The campylobacter status of the poultry at slaughterhouse was determined by culture of cecal contents. Cecal contains examination was perform according to European standard E.N. I.S. O. 10272/ 2007.

Potential for cross-contamination of Campylobacter is very high inside the poultry processing plant.

The carcasses were sampled at various stages throughout processing.

For this research we took 75 samples from cecal contains, and 75 samples carcasses to poultry. The result of the study allowed us identify the Campylobacter at 11 samples for cecal contains, represent 14,6%, and 7samples for carcasses to poultry, represent 9,3%.

Key words: poultry, cecal contains, Campylobacter spp.

Campylobacter jejuni şi *Campylobacter coli* au mare importanţă pentru microbiologia alimentelor, contaminând frecvent carnea de pasăre. Păsările sunt considerate rezervorul cel mai important pentru specia *C.jejuni*. datorită exigenţelor termice (creştere la 42^0C), şi constituie principala cauză a toxiinfecţilor alimentare. *Campylobacter* se întâlneşte în părţile terminale ale tubului digestiv la păsări (cecum). Contaminarea cu *C.jejuni* este posibilă în toate stadiile de prelucrare din abator, în timpul prelucrării cu conţinut intestinal, conţinut biliar, conţinut cecal.

Au fost descrise numeroase episoade de toxiinfecţie campilobacteriană în urma consumului de carne de pasăre, în special, în SUA şi Marea Britanie.

Conform raportului Autorităţii Europene pentru Siguranţa Alimentară (AESA) privind tendinţele şi sursele zoonozei, a agenţilor zoonotici şi a rezistenţei antimicrobiene în cadrul Comunităţii în 2005 , au fost raportate în 22 de state membre un total de 194695 cazuri de campylobacterioză în rândul oamenilor. Carnea de pui broiler este considerată ca fiind cea mai obişnuită sursă de infecţie. Au fost raportate până la 66,4 % eşantioane pozitive de pui broiler. În rândul efectivelor de pui broiler au fost declarate pozitive 0,2 până la 86 % de eşantioane.

Campilobacteriile termofile sunt saprofite pentru păsări şi animale, colonizând intestinul acestora, şi patogene pentru om. Astfel campilobacteriile sunt izolate de la grauri şi vrăbii în 45-80% cazuri, porumbei - 25-40% cazuri, păsări înotătoare – 35%, găini la fabricile avicole 18-33%. *C.jejuni* persistă aproape permanent în tractul digestiv al păsărilor domestice şi sălbatice şi frecvent în intestinul bovinelor şi caprinelor. Intestinul porcinelor este considerat rezervor al *C.coli*, al pescăruşilor – rezervor al *C.lari*,

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a realizat un studiu privind determinarea portajului de *Campylobacter* al puilor de carne destinaţi abatorizării în vederea aprecierii surselor de infecţie cu aceste tipuri de bacterii implicate în cazurile de gastroenterită acută campilobacteriană la om, cu caracter epidemiologic de toxiinfecţie alimentară.

În total au fost examinate un număr de 150 de probe, din care 75 au fost reprezentate de conţinut cecal cu cecumuri şi 75 au fost probe de broleri imediat după sacrificare.

Recoltarea cecumurilor şi a conţinutului cecal s-a făcut imediat după eviscerare. Obiectivul principal a fost de a limita pe cât posibil o contaminare externă prin conţinutul cecal în momentul prelevării acestora. Cea mai adecvată modalitate de a atinge acest obiectiv a fost de a opera cu precauţie o tractare la joncţiunea cu intestinul. Am prelevat un cecum intact de la fiecare pasăre şi am verificat dacă cecumul este plin. Eşantioanele au fost prelevate, aleatoriu din interiorul lotului de păsări

Cecumul de pasăre a fost dezinfectat cu alcool etilic absolut timp de 2-3 minute. Apoi a fost uscat într-o placă Petri. Apoi s-a tăiat vârful apexului, am recoltat din vârful cecului. Însămânţarea s-a făcut pe mediul solid mCCD pentru izolare şi pentru confirmare pe mediul Karmali. Incubarea s-a realizat în mediu cu 10%CO_2, la 41,5^{0}C pentru 48h. Confirmarea biochimică s-a realizat cu ajutorul testelor pentru detectarea oxidazei, pe agar TSI şi acid nalidixic.

Evaluarea s-a făcut conform programelor ANSV: S.R. ISO 10272/2007, pentru carcasele de pasăre. Din proba de analizat am preparat diluţii zecimale până la diluţia 10^{-6}, am transferat folosind o pipetă sterilă 0,1ml din diluţiile 10^{-4} şi 10^{-5}, pe câte două plăci Petri cu agar mCCD, am incubat plăcile la 41,5^{0}C timp de 48h în atmosferă de microaerofilie cu 5% oxigen. Pe mediul mCCD coloniile tipice de *Campylobacter* sunt cenuşii, plate şi umede cu o tendinţă de împrăştiere. Mediul Karmali a fost utilizat ca mediu înalt selectiv pentru izolare.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În ţările din întreaga lume *Campylobacter spp.* a devenit în ultimii ani, una din cele mai frecvente cauze ale bolilor enterice la oameni. Boala apare, în primul rând, datorită consumului de alimente de origine animală provenite de la animale infectate sau purtătoare sau de la alimente contaminate încrucişat în timpul prelucrării şi manipulării şi într-o măsură mult mai redusă, prin alimente manipulate neigienic.(1)

Păsările de fermă sunt purtătoare şi excretoare de *Campylobacter jejuni* în proporţie de 91-100%, de aceea se poate spune că pentru păsări face parte din microflora intestinală, densitatea ei fiind de 10^4- 10^7 celule /g fecale.

Carnea de pasăre este contaminată într-o ăroporţie mult mai mare, datorită procentului foarte mare de purtători intestinali şi procesului de tăiere şi de obţinere a acarcaselor , care determină contaminarea acestora prin fecale. Numărul de celule bacteriene vii de pe suprafaţa caracselor se reduce, dar nu dispare în timpul stocării în condiţii de refrigerare sau congelare.(2)

Consumul de carne de pasăre contaminată se consideră a fi una din cauzele principale ale apariţiei bolii la om. Frecvenţa cu care se izolează bacteria de pe carcasele de pasăre este, de obicei, redusă, dar poate atinge valori alarmante în anumite condiţii. Incidenţa este mai mică pe carcasele congelate în comparaţie cu carcasele refrigerate.

Tabelul nr. 1

Valorile speciei Campylobacter spp. din cecumuri şi din carcasele de pasăre proaspete

Carcase de pasăre	Numărul probelor	Probe pozitive		Probe negative	
		Nr.	%	Nr.	%
Cecumuri	75	11	14,6%	64	85,4%
Proaspete	75	7	9,3%	68	90,7%

Tabel.nr.2

Valorile logaritmice indicatorului Campylobacter/25g.piele de la gât de pe carcasele proaspete şi cecumuri

Proba	*Campylobacter*
Carcase proaspete	3,65± *0,86*
Cecumuri	*3,83*± *0,93*

log UFC/cm^2 ± eroarea standard

Rezultatele obţinute relevă un procent de 14,6% din cecumurile de pasăre ca fiind contaminată cu *Campylobacter spp.,* 9,3% din carcase refrigerate (4^{0}C).

Valorile logaritmice găsite la cecumuri de 3,83 log ufc/cm^2 se reflectă şi la valorile de 3,65 log ufc/cm^2 găsite pe carcasele refrigerate.

CONCLUZII

1. Păsările destinate sacrificării sunt expuse în fermele de creştere acţiunii unei microflore bogate şi diverse care în mare parte poate fi regăsită pe carcasele de pasăre după procesare în abator;
2. Se impune perfecţionarea tehnologiilor de creştere a păsărilor cu accent deosebit pentru reducerea şi chiar eliminarea din efectivele de păsări a purtătorilor de microorganisme enterice patogene pentru om. Acesta se poate realiza prin programe integrate începând de la staţiile de incubat şi continuând până la valorificarea păsărilor, prin controlul tuturor factorilor care pot favoriza creşterea incidenţei microorganismelor periculoase pentru consumator.
3. Pentru prevenire dispersiei campilobacteriilor (intercontaminare) pe toate viitoarele verigi ale fluxului tehnologic de procesare a carnii de pasare, se impun măsuri stricte de igienă si dezinfecţie.
4. 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 atenţie deosebită pentru a reduce gradul de contaminare a carcaselor în abatoare.

BIBLIOGRAFIE

1. Bârzoi D., Maier Natalia, Tuluş L. – Incidenta bacteriei Campylobacter jejuni in unele produse de origine animala. Lucrare stiintifica L.C.C.P.O.A.F., 1985
2. Bărzoi D.,Meica S., Neguț M., (1999) – Toxiinfecțiile alimentare, Ed.Diacon Coresi , Bucureşti
3. Carp-Cărare M., Şindilar E., Guguianu Eleonora, (1991) - Unele aspecte privind portajul cu Yersinia enterocolitică şi Campzlobacter jejuni la găină, Lucrări ştiinţifice Universitatea Agronomică Iaşi, 33 – 34 , 156-159,
4. Carp-Cărare M., - (2001) - Microbiologie veterinară,Casa de editură , Venus, Iaşi
5. Cason, J. A., J.S. Bailey, and col (1997). - Relationship between aerobic bacteria, Salmonellae and Campylobacter on broiler carcasses. Poultry Sci. 76:1037 – 1041.
6. Handan A. Dincer and Taner Baysal (2004) - Decontamination Techniques of Pathogen Bacteria in Meat and Poultry, Critical Reviews in Microbiology, 30:197–204
7. Jorgensen, F., Bailey, and col. - (2002) - Prevalence and numbers of Salmonella and Campylobacter spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbiology 76, 151– 164.
8. Şindilar E., Bondoc I., Moroşan S., Şindilar E.V.,1997 - Unele aspecte privind sursele de poluare microbiană carcaselor de pui broiler I,- Lucrări ştiinţifice USAMV Iaşi, 40; 80 – 93 ,
9. Şindilar E., Bondoc I., Şindilar E.V., 1997 - Unele aspecte privind sursele de poluare microbiană carcvaselor de pui broiller II, Lucrări ştiinţifice USAMV Iaşi, 40; 94-99 ,

INFLUENŢA PH-ULUI ŞI TEMPERATURII ASUPRA SPECIEI *CAMPYLOBACTER SPP*. DE PE CARNEA DE PASĂRE PROASPĂTĂ, REFRIGERATĂ ŞI CONGELATĂ

THE INFLUENCE OF PH AND TEMPERATURE AGAINST *CAMPYLOBACTER SPP.* GROWTH IN FRESH, FROZEN AND FREEZING POULTRY CARCASSES

CRETU CARMEN, GUGUIANU ELEONORA RIMBU CRISTINA, CARP CARARE C., CARP CARARE M.
F.M.V. IAŞI

Capmpylobacter jejuni and C. coli have importance for food microbiology, contaminated frequently the poultry.

Poultry are considered the most important reservoir for the species C.jejuni. due to thermal requirements (growth at 42^0C), and the main cause of foodborne.

Evaluation was done according carcasses programs ANSV SR ISO 10272/2007, of poultry carcasses.

In slaughterhouse were 120 samples examined, the percentage found in the fresh meat was 12%, from chilled meat 10% and the frozen meat we did not find any casings from the total positive samples examined.

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, Capmpylobacter from the surface of the carcass. Following the treatment of poultry carcasses with 1% lactic acid, reducing positive carcasses was significant, this represented a rate of 1.83%

Key words: poultry, decontamination, lactic acid, skin, Campylobacter spp.

Problemele de ordin microbiologic asociate procesării păsărilor în abatoare sunt, în linii mari, similare cu cele asociate procesării mamiferelor dar există unele elemente care le particularizează. În abatoarele de păsări se procesează un număr foarte mare de animale (mii de păsări/oră) cu aceleaşi instalaţii, carcasele rezultate fiind foarte apropiate, contaminarea încrucişată fiind mult mai frecventă.

De asemenea, valorificarea carcaselor întregi presupune extragerea viscerelor printr-un orificiu redus ca dimensiune, fapt care conduce, de multe ori, la ruperea tubului digestiv şi contaminarea carcaselor cu conţinut intestinal. La păsări, de cele mai multe ori pielea rămâne la carcasă, fapt care creşte riscul contaminărilor, microflora pielii fiind bogată şi destul de greu de îndepărtat prin procedeele aplicate în mod curent în abatoare.

Foarte eficientă este decontaminarea cu ajutorul acizilor.

Acidul lactic este cel mai cunoscut acid organic în natură, fiind frecvent în industria de procesare a cărnii, actiunea sa antimicrobiană fiind deosebit de severă la concentraţia de 1%, la bacteriile Gram negative reducţia logaritmică a coborât frecvent în domeniul ce caraterizează efectul sterlizant.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul influenţei pH-ului acid, şi a temperaturii asupra specie *Campylobacter spp.* de pe carcasele de pasăre a fost efectuat în perioada 2008-2009 în cadrul unei unităţi de sacrificare a păsărilor din judeţul Iaşi.

Probele au fost reprezentate de carcasele de pasăre care au fost recoltate în urma mai multor vizite la abatoarele de păsări, prilej cu care câte 4-5 carcase de pasăre au fost recoltate de la cele prezente pe fluxul tehnologic, în tunelul de refrigerare şi de la cele din tunelul de congelare.

În total au fost examinate un număr de 120 carcase de pasăre, respectiv 50 carcase de pui proaspete după răcire şi ambalare, 50 carcase de pui refrigerate, la temperatura de 4^0C şi 20 carcase de pui congelate la temperatura de -18^0C, la care au fost efectuate examene microbiologice de pe 25 g.piele de la gât.

Evaluarea s-a făcut conform programelor ANSV: S.R. ISO 10272/2007, pentru carcasele de pasăre. Din proba de analizat am preparat diluţii zecimale până la diluţia 10^{-6}, am transferat folosind o pipetă sterilă 0,1ml din diluţiile 10^{-4} şi 10^{-5}, pe câte două plăci Petri cu agar mCCD, am incubat plăcile la $41,5^0$C timp de 48h în atmosferă de microaerofilie cu 5% oxigen. Pe mediul mCCD coloniile tipice de *Campylobacter* sunt cenuşii, plate şi umede cu o tendinţă de împrăştiere.Mediul Karmali a fost utilizat ca mediu înalt selectiv pentru izolare.

În acest studiu, s-a urmărit acţiunea acidului lactic soluţie 1% asupra tulpinilor bacteriene. Soluţia decontaminantă a fost preparată prin diluarea a L+ acid lactic 1% în apă. Măsurarea pH-ului s-a realizat cu un pH metru. Eficacitatea lui a fost evaluată folosind articolul 29 din E.C. 178/2002.

Experimental s-a realizat tratarea carcaselor de pasăre după evaluarea indicatorului microbiologic cu acid lactic sol.1%, timp de 20 sec., după tratare nu s-au obsevat modificări majore organoleptice de culoare, gust şi miros. Acest tratament a constat în imersarea carcasei în sol.1% de acid lactic timp de 20 secunde, apoi carcasele au fost supuse refrigerării şi congelării.

După tratarea cu aceste soluţii s-a efectuat o clătire a carcaselor pentru îndepărtarea substaţelor care au folosite la tratarea carcaselor.

Eficacitatea concentraţiei substanţei utilizate şi timpul de contact au fost testate şi pe o tulpină standardizată ATCC(American Type Culture Collection)

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datorită faptului că cel mai frecvent mod de conservare al produselor alimentare este refrigerarea, fiind totodată considerat şi cel mai eficient, păstrându-se astfel însuşirile organoleptice caracteristice alimentelor proaspete, microorganismele psihrotrofe au în prezent semnificaţia cea mai importantă pentru alterarea alimentelor. Însă folosirea unor temperature scăzute, chiar de congelare, nu asigură distrugerea în totalitate a bacteriilor, deoarece, unele dintre acestea, se pot multiplica la temperatura de refrigerare 0°C...6°C şi chiar de congelare, la -5°...-18°C. Ca urmare, în aceste condiţii, microflora dominantă va fi reprezentată de către microorganismele psihrotrofe. Existenţa microorganismelor în carne (riscul microbiologic), are o importanţă deosebită pentru calitatea, salubritatea şi starea ei de prospeţime, deoarece sub influenţa acestora calitatea cărnii poate să scadă, devenind neconsumabilă, această acţiune realizându-se, fie prin acţiunea lor patogenă, fie prin producerea unor produşi metabolici toxici, în urma degradării lor

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.

Acidul lactic este un agent organic folosit frecvent în industria de procesare a cărnii, acţiunea sa antimicrobiană fiind deosebit de severă la concentraţia de 1%.

Decontaminarea carcaselor de pasăre poate ajuta la scăderea numărului de toxiinfecţii alimentare la om. Concentraţiile acceptate de acid lactic sunt cuprinse între 1-2%. Această tehnică poate fi utilizată la orice etapă a procesului tehnologic în abator.

Literatura de specialitate citează grade diferite ale modificării aspectului carcaselor (culoarea) în urma decontaminării cu acid.

Punerea în contact a celor doi reactanţi (microorganism şi agentul chimic) s-a făcut pentru a stabili dacă timpul de contact şi concentraţia soluţiilor folosite sunt eficiente pentru diminuarea încărcăturii microbiene a carcaselor. (Coman I., 1997)

Efectul combinat al temperaturii scăzute (sub 5^0C) şi a acidităţii mediului (pH 2,6), s-a dovedit a fi intens bacteriostatic asupra speciei bacteriene monitorizate de către noi, respectiv *Campylobacter spp.*. .

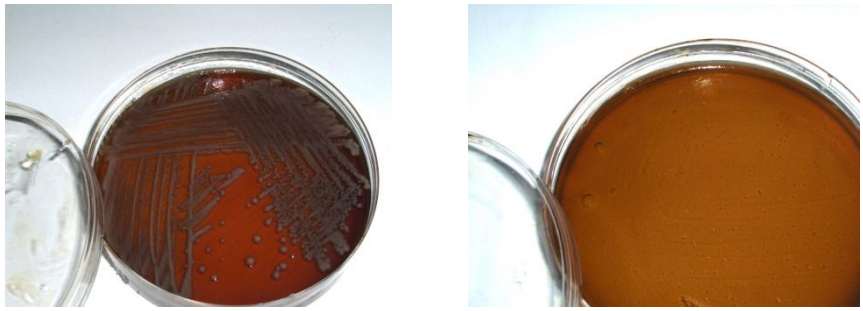


Fig nr.1 Mediul mCCD Izolare a) Campylobacter jejuni b)Campylobacter jejuni şi tratare cu acid lactic sol.1%

Campylobacter jejuni are un ph optim de 6,5-7,5, dar poate creşte şi până la 8,5. În substraturile cu ph mai mic decât 3,5 este inhibată dezvoltarea acestuia.

Atât tulpinele de pe carcasele de pasăre refrigerate cât şi tulpina ATCC la pH 2,6 nu s-au dezvoltat, dealtfel fiind singura specie care a dovedit o sensibilitate crescută la tratarea cu acid.

Cason şi col. realizează un studiu în 1997 pe 210 carcase de pasăre şi acesta relevă un procent de 94% din probele examinate au fost contaminate cu Campylobacter.

În general supravieţuirea microorganismelor din genul *Campylobacter* este mai bună la temperaturi scăzute,dar refrigerarea poate influenţa gradul de contaminare.

Alţi autori au izolat *Campylobacter* de la un număr mare de carcase de pasăre refrigerate şi a indentificat 22% probe positive pentru *Campylobacter jejuni* şi 78% la *Campylobacter coli.* Asta ne arată că C. coli supravieţuieşte mai bine în anumite circumstanţe.

Cu toate că congelarea a redus în mod substanţial numărul de Campylobacter supravieţuirea la – 20^0C este posibilă.

Tabelul nr. 1

Valorile speciei Campylobacter spp. din carcasele proaspete, refrigerate şi congelate

Carcase de pasăre	Numărul probelor	Probe pozitive		Probe negative	
		Nr.	%	Nr.	%
Proaspete	50	6	12%	44	88%
Refrigerate	50	5	10%	45	90%
Congelate	20	-	-	20	100%

Atât tulpinele de pe carcasele de pasăre refrigerate cât şi tulpina ATCC la pH 2,6 nu s-au dezvoltat, dealtfel fiind singura specie care a dovedit o sensibilitate crescută la tratarea cu acid.

Tabel.nr.2

Valorile logaritmice indicatorului Campylobacter/25g.piele de la gât de pe carcasele proaspete, refrigerate şi cu pH modificat

Proba	*Campylobacter* pH 6,7 Temp.4^0C	*Campylobacter* pH 2,6 Temp.4^0C
Carcase proaspete	3,07± *0,43*	1,24± *0,12*
Carcase refrigerate	*2,43*± *0,89*	<1
ATCC 13076	*1,76*± *0,81*	<1

log UFC/cm^2 ± eroarea standard

Din analiza tabelului 2 reiese că atât tulpina ATCC cât şi cele izolate de pe carcase au fost pronunţat sensibile la mediul acid .Nu au fost izolate tulpini de *Campylobacter* de pe carcasele congelate.

CONCLUZII

1.Acidul lactic este frecvent folosit în industria alimentară, datorită efectului său puternic antimicrobian şi lipsei de toxcitate pentru om.

2 Aprobarea de către Comisia Europeană a decontaminării carcaselor de pasăre ar reduce semnificativ riscul apariţiei toxiinfecţiilor alimentare.

3.Tancul de spălare reprezintă o sursă importantă de contaminare.(cross-conatminare)

4. Creşterea *Camylobacter spp.*este redusă prin schimbarea pH-ului apei cu o soluţie de acid lactic 1% la 1,83 log UFC.

BIBLIOGRAFIE

1. Carp-Cărare M., Şindilar E., Guguianu Eleonora, (1991) - Unele aspecte privind portajul cu Yersinia enterocolitică şi Campzlobacter jejuni la găină, Lucrări ştiinţifice Universitatea Agronomică Iaşi, 33 – 34 , 156-159,
2. Coman I., (1997)- Decontaminarea,vol.I. Ed.Satya ,Iaşi
3. Cason, J. A., J.S. Bailey, and col (1997). - Relationship between aerobic bacteria, Salmonellae and Campylobacter on broiler carcasses. Poultry Sci. 76:1037 – 1041.
4. Handan A. Dincer and Taner Baysal (2004) - Decontamination Techniques of Pathogen Bacteria in Meat and Poultry, Critical Reviews in Microbiology, 30:197–204
5. Jorgensen, F., Bailey, and col. - (2002) - Prevalence and numbers of Salmonella and Campylobacter spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbiology 76, 151– 164.
6. Şindilar E., Bondoc I., Moroşan S., Şindilar E.V.,1997 - Unele aspecte privind sursele de poluare microbiană carcaselor de pui broiler I,- Lucrări ştiinţifice USAMV Iaşi, 40; 80 – 93 ,
7. Şindilar E., Bondoc I., Şindilar E.V., 1997 - Unele aspecte privind sursele de poluare microbiană carcvaselor de pui broiller II, Lucrări ştiinţifice USAMV Iaşi, 40; 94-99 ,

THE INCIDENCE OF MYCOTOXINS IN MEAT AND MEAT PRODUCTS IN THE WEST COUNTIES OF ROMANIA IN THE PERIOD 2004-2008

DAMIESCU LACRAMIOARA[2], TRIF ALEXANDRA[1]
[1]USAMVB Timisoara
[2]DSVSA Timis
lala_damiescu@yahoo.com
al_trif@yahoo.com

Between 2004 and 2008 in the mycotoxins laboratory from the Sanitary Veterinary and Food Safety Directorate Timiş, 1823 samples were analyzed for mycotoxins : 180 beef, 341 pork ,371 pork sausages, 103 sheep meat s, 47 horse meat, 255 chicken meat, 155 fish and 371 spices used to prepare pork sausages. The study revealed that: there were no positive samples of meat in 1081 analyzed samples of beef, pork, sheep, horse, chicken or fish; 18.3% of pork sausages were contaminated with AFB_1, 8.4% were contaminated with OTA and 5.6% were contaminated with both AFB_1 and OTA; these samples had a low level of contamination ;in spices used to prepare sausages AFB_1 and OTA were present, especially in paprika, pepper and ginger, being the cause of sausages contamination; the maximum permitted level was surpassed in 39.7% of positive samples for AFB_1, 8.4% for OTA and 5.6% for associated contamination with both AFB_1 and OTA.

Keywords: aflatoxin B_1 (AFB_1), ochratoxin A (OTA), meat, sausages, spices

The FAO/WHO experts discussed a diverse list of hazards that present human health risks, list presented in their Report after the 2007 annual meeting, the main subject being animal feed impact on food safety. (22)

In the last decade, many studies have been conducted on mycotoxins. Most frequently occurring mycotoxins (aflatoxin B_1, ochratoxin A, zearalenone, fumonisin B_1, deoxinivalenol, T-2 and HT-2) are currently considered for their effects on animal health. However, when focusing on how mycotoxins play a role in food safety, attention should be limited to mycotoxins that are known to be transferred from feed to food of animal origin, as this food represents a significant route of exposure for humans. There are well known the transfers from feedstuffs to foodstuffs: in liver is found aflatoxin B_1, in milk aflatoxin M_1, in eggs aflatoxicol, in meat ochratoxin A, in meat DON as DOM1, zearalenon in meat as zeranol. (1, 2, 4, 12, 14, 15, 22)

Aflatoxin contamination is not homogenous and this is the reason of using special methods for selecting the samples. (7, 8, 12, 18). Romanian legislation has adapted these special methods from the European legislation and every detail is described, including the necessary quantities for raw materials and the analytical methods used. (19, 20, 21)

In the 2001-2007 period, studies conducted revealed that the most feedstuffs from the Timis county were contaminated with fungi from Penicillium, Aspergillus and Fusarium species, the main „producers" of aflatoxin B_1 and ochratoxin A. (6, 13)

Raisins, cereals, coffee, wine, beer, grapes juice, spices, vegetables and some animal tissues may be sources of contamination with ochratoxin A in humans. This toxin is not completely destroyed through technological processes or by cooking. Acute toxic risk is low, but the latent toxic risk (the carcinogenetic risk) after eating small amounts of infested food with ochratoxin A is important and needs further studies. (9).

Analyzing samples of spices imported by Germany permitted the detection of aflatoxins in paprika, chili and nutmeg. The values found did not exceed the maximum permitted level. Some types of sausages made from pork had a high level of ochratoxin A. Studies revealed that German consumers are not exposed to risk levels, but baby food needs special attention. (5)

The scope of this research was to evaluate the frequency of mycotoxin contamination of different categories of foodstuffs of animal origins in the West county of Romania, during 2004-2008 period.

The study had as objectives to emphasize:

- The frequency of aflatoxin B_1 (AFB_1) and/or ochratoxin A (OTA) contamination of meat from different species, pork sausages and spices used to prepare these products;
- The contamination levels with AFB_1 and/or OTA.

MATERIALS AND METHODS

In the mycotoxin laboratory, part of Sanitary Veterinary and Food Safety Directorate of Timis county, between 2004-2008 were analyzed 1823 samples for mycotoxin. The samples were collected from the West region – Arad, Bihor, Caras Severin, Mehedinti, Satu Mare and Timis counties: 180 beef, 341 pork, 371 pork sausages, 103 sheep meat, 47 horse meat, 255 chicken meat, 155 fish and 371 spices used to prepare pork sausages.

In the period 2004-2006, for spices, screening was made using thin layer chromatography (AOAC, 1987, 975.37), and after 2007 ELISA kits were used. The used methods are accredited and validated. (16, 17, 18)

For the dosage of aflatoxin B_1 (AFB_1) and ochratoxin A (OTA) in meat, ELISA methods were used. Kits were produced by R-Biopharm or Eurodiagnostica. Methods are accredited and validated. The technicians from the laboratory participated to proficiency tests like FAPAS with satisfactory results.

RESULTS AND DISCUTIONS

Data concerning the frequency of contamination with aflatoxin B_1 and ochratoxin A of meat in six counties from the West region of Romania is presented in Table 1.

No positive samples of meat were detected in the period the study was carried out.

In pork sausages (Table 2), from a total of 371 samples, 68, respectively 18.3%, were found positive for AFB_1. The most frequent positive samples were found in Arad county (24.6%) and Bihor county (21.8%), and the lowest contamination was found in Caraş Severin county (11.7%) and in Mehedinţi county (14.3%). In the Timis and Satu Mare counties, the percentages of positive samples were among media, 18.8%, respectively 16.2%.

Ochratoxin A was found in 31 samples, 8.4%, from a total of 371 analyzed samples. The most frequent positive samples were detected in Mehedinti county 6, 21.4% from 28 analyzed samples, followed by Caraş Severin county 15%, Arad county 11.6% and Timiş county 9.4%.

No positive samples for ochratoxin A were found in Bihor (55 samples) and Satu Mare counties (74 samples).

The mean levels of AFB_1 and OTA and the mixed contamination AFB_1 and OTA is presented in Table 3.

The mean level of mycotoxin contamination was low in the positive samples: AFB_1=1.77 ppb, OTA=1.75 ppb, AFB_1+OTA=1.65 / 1.67 ppb. There are no maximum permitted levels for contamination with AFB_1 or OTA in meat samples or in pork sausages.

The frequency of spices, used in preparing the pork sausages, contaminated with AFB_1 and/or OTA is presented in Table 4.

The hierarchy of spices related to the presence of the studied mycotoxins was: paprika (25/256 – 9.8%), pepper (22/371 – 5.9%), thyme (9/154 – 5.8%), coriander (8/166 – 4.8%), nutmeg (10/223 – 4.5%), garlic powder (16/371 – 4.3%), enibahar (5/133 – 3.8%), ginger (4/107 – 3.7%).

The hierarchy of counties was different, according to the type of spice.

The mean level of AFB_1, OTA and AFB_1 associated with OTA in spices used in preparing the pork sausages is presented in Tables 5, 6, 7.

From 68 positive samples contaminated with AFB_1, in 27 (39.7%) the level for AFB_1 surpassed the maximum permitted level (22) of 5 ppb (µg/kg). The maximum value as well as the minimum value also surpassed the maximum permitted level (16.35, respectively 6.7) From 34 positive samples, 8.4% contained OTA over 1 ppb. The minimum value was 1.57 ppb, the maximum value was 15.92 ppb, the mean value was 7.93 ppb.

There is no maximum permitted level for OTA in spices in the present legislation.

The associated contamination of AFB_1 and OTA was present in 21 samples (5.6%), all samples containing over 5 ppb of AFB_1, respectively over 1 ppb of OTA.

In meat, contamination with mycotoxins is considered to appeare as a result of using fungi contaminated feedstuffs in animals feeding. (1, 10, 14, 23).

In sausages, contamination is considered to appeare because raw materials, and/or the spices or the membranes - natural or artificial - are, maybe, contaminated with mycotoxins. (1).

In Poland the presence of AFB_1 in spices was confirmed by CZERWIECKI et all, (3) during 2004-2005: in 93.3% of paprika samples and 25% of pepper and curry samples, also in 80% of mixed spices, but the levels were smaller (minimum value 2.4 ppb/6.71 ppb, maximum value 8.16 ppb/16.35 ppb in paprika, pepper and curry and 0.81 ppb in mixed spices).

VARGA et all (15) detected AFB_1 in red pepper in limits between 0.14 - 5.7 ppb, and OTA in mixed spices between 0.4-6.62 ppb – these values were lower than those found in the present study for AFB_1 and higher than those found for OTA.

Studies carried out in Portugal pointed out aflatoxins in curry, garlic, nutmeg and white pepper, but only the samples of curry and nutmeg were over the maximum permitted levels. OTA was detected in pepper, paprika, nutmeg, mixed spice for barbecue – sample with 52.8 ppb of OTA.(10)

CONCLUSIONS

The present study, carried out during 2004-2008 period, revealed:

- no positive samples of meat in 1081 analyzed samples of beef, pork, sheep, horse, chicken or fish;
- 18.3% of pork sausages contaminated with AFB_1, 8.4% contaminated with OTA and 5.6% contaminated with both AFB_1 and OTA;
- low level of contamination with the studied mycotoxins in pork sausages;
- presence of AFB_1 and OTA in spices used to prepare sausages, especially in paprika, pepper and ginger;
- surpassing of maximum permitted level in 39.7% of positive samples for AFB_1, 8.4% for OTA and 5.6% for associated contamination with both AFB_1 and OTA.

Table 1 Frequency of meat samples contaminated with AFB_1 and / or OTA

county	Species											
	beef		pork		sheep		chicken		horse		fish	
	Nr of analyzed samples	Nr of positive samples	Nr of analyzed samples	Nr of positive samples	Nr of analyzed samples	Nr of positive samples	Nr of analyzed samples	Nr of positive samples	Nr of analyzed samples	Nr of positive samples	Nr of analyzed samples	Nr of positive samples
AR	**37**	**0**	**75**	**0**	**8**	**0**	**49**	**0**	**7**	**0**	**9**	**0**
BH	**29**	**0**	**67**	**0**	**28**	**0**	**55**	**0**	**6**	**0**	**17**	**0**
CS	**26**	**0**	**40**	**0**	**18**	**0**	**33**	**0**	**10**	**0**	**45**	**0**
MH	**17**	**0**	**25**	**0**	**5**	**0**	**26**	**0**	**2**	**0**	**67**	**0**
SM	**40**	**0**	**59**	**0**	**19**	**0**	**35**	**0**	**7**	**0**	**5**	**0**
TM	**31**	**0**	**75**	**0**	**25**	**0**	**57**	**0**	**15**	**0**	**12**	**0**
Total	180	0	341	0	103	0	255	0	47	0	155	0

Table 2 Frequency of pork sausages samples contaminated with AFB_1 and OTA

County	Pork sausages								
	Aflatoxin B_1			Ochratoxin A			AFB_1 + OTA		
	Analyzed samples	Positive samples		Analyzed samples	Positive samples		Analyzed samples	Positive samples	
		nr	%		nr	%		nr	%
AR	**69**	**17**	**24.6**	**69**	**8**	**11.6**	**69**	**6**	**8.7**
BH	**55**	**12**	**21.8**	**55**	**0**	**0**	**55**	**0**	**0**
CS	**60**	**7**	**11.7**	**60**	**9**	**15**	**60**	**5**	**8.3**
MH	**28**	**4**	**14.3**	**28**	**6**	**21.4**	**28**	**3**	**10.7**
SM	**74**	**12**	**16.2**	**74**	**0**	**0**	**74**	**0**	**0**
TM	**85**	**16**	**18.8**	**85**	**8**	**9.4**	**85**	**7**	**8.2**
Total	371	68	18.3	371	31	8.4	371	21	5.6

Table 3 Mean level of AFB_1, OTA and AFB_1 +OTA in pork sausages

County	Values											
	Minimum			Maximum			Mean			Median		
	AFB1	OTA	AFB1+OTA	AFB1	OTA	AFB1+OTA	AFB1	OTA	AFB1+OTA	AFB1	OTA	AFB1+OTA
AR	**1.1**	**1.1**	**1.25 / 1.3**	**1.7**	**1.84**	**1.7 / 1.8**	**1.65**	**1.4**	**1.5 / 1.4**	**1.55**	**1.36**	**1.45 / 1.36**
BH	**1.3**	**0**	**0**	**1.85**	**0**	**0**	**1.44**	**0**	**0**	**1.61**	**0**	**0**
CS	**1.1**	**1.3**	**1.2 / 1.4**	**1.75**	**1.8**	**1.7 / 1.6**	**1.57**	**1.6**	**1.55 / 1.63**	**1.55**	**1.57**	**1.51 / 1.61**
MH	**1.2**	**1.2**	**1.4 / 1.3**	**1.66**	**1.6**	**1.5 / 1.6**	**1.61**	**1.7**	**1.6 / 1.55**	**1.57**	**1.63**	**1.57 / 1.53**
SM	**1.1**	**0**	**0**	**1.79**	**0**	**0**	**1.54**	**0**	**0**	**1.51**	**0**	**0**
TM	**1.2**	**1.1**	**1.4 / 1.3**	**1.88**	**1.77**	**1.7 / 1.7**	**1.67**	**1.65**	**1.6 / 1.55**	**1.64**	**1.53**	**1.57 / 1.53**
Total	1.16	1.18	1.3 / 1.32	1.77	1.75	1.65 / 1.67	1.58	1.59	1.56 / 1.53	1.57	1.52	1.52 / 1.5

Table 4 Frequency of spice samples used to prepare pork sausages contaminated with AFB_1 and /or OTA

County	Spice																							
	Paprika			Pepper			Coriander			Enibahar			Nutmeg			Garlic powder			Thyme			Ginger		
	Analyzed samples	positive samples		Analyzed samples	positive samples		Analyzed samples	positive samples		Analyzed samples	positive samples		Analyzed samples	positive samples		Analyzed samples	positive samples		Analyzed samples	positive samples		Analyzed samples	positive samples	
		nr	%		nr	%		nr	%		nr	%		nr	%		nr	%		nr	%		nr	%
AR	45	7	15.5	69	4	17.3	27	2	7.4	23	2	8.7	51	3	5.9	69	3	4.3	35	3	8.6	23	1	4.3
BH	41	3	7.3	55	2	3.6	28	1	3.6	23	0	0	31	2	6.5	55	2	3.6	25	2	8.0	19	0	0
CS	35	4	11.4	60	5	8.3	33	1	3.0	27	1	3.7	37	1	2.7	60	3	5.0	19	0	0	17	1	5.9
MH	19	3	15.8	28	3	10.7	12	1	8.3	8	0	0	15	0	0	28	2	7.1	16	1	6.3	9	0	0
SM	44	2	4.5	74	4	5.4	27	0	0	25	1	4.0	31	2	6.5	74	2	2.7	22	1	4.5	18	0	0
TM	72	6	8.3	85	4	4.7	39	3	7.7	27	1	3.7	58	2	3.4	85	4	4.7	37	2	5.4	21	2	9.5
Tot	256	25	9.8	371	22	5.9	166	8	4.8	133	5	3.8	223	10	4.5	371	16	4.3	154	9	5.8	107	4	3.7

Table 5 Mean level of AFB_1 (ppb) in spices used for pork sausages

County	Positive samples		Samples over MPL		Values			
	no	%	no	%	Minimum	Maximum	Mean	Median
AR	**17**	**24.6**	**5**	**29,4**	**6,1**	**20,4**	**13,34**	**15,2**
BH	**12**	**21.8**	**3**	**25,0**	**7,4**	**18,3**	**11,2**	**12,3**
CS	**7**	**11.7**	**3**	**42,8**	**6,2**	**11,5**	**9,13**	**9,7**
MH	**4**	**14.3**	**4**	**100**	**6,9**	**11,3**	**7,92**	**8,7**
SM	**12**	**16.2**	**5**	**41,6**	**6,5**	**15,3**	**9,94**	**8,7**
TM	**16**	**18.8**	**7**	**43,8**	**7,2**	**21,3**	**11,57**	**9,7**
Total	68	18.3	27	39.7	6.71	16.35	10.51	10.71

*Maximum permitted level is 5 ppb

Table 6 Mean level of OTA (ppb) in spices used for pork sausages

County	Positive samples		Samples over MPL		Values			
	no	%	no	%	Minimum	Maximum	Mean	Median
AR	**8**	**11.6**	**8**	**11.6**	1,2	12,5	6,93	7,1
CS	**9**	**15**	**9**	**15**	1,7	15,3	7,36	6,3
MH	**6**	**21.4**	**6**	**21.4**	1,5	16,7	9,31	9,2
TM	**8**	**9.4**	**8**	**9.4**	**1,9**	**19,2**	**8,15**	**7,05**
Total	34	8.4	31.0	8.4	1.57	15.92	7.93	7.41

*Maximum permitted level is 0 ppb

Table 7 Mean levels of AFB_1 (ppb) and OTA (ppb) in spices used for pork sausages

County	Positive samples		Samples over MPL		Values			
	no	%	no	%	Minimum	Maximum	Mean	Median
AR	**6**	**8.7**	**6**	**8.7**	7,6 / 2,3	15,2 / 14,3	10,3 / 7,2	9,45 / 6
CS	**5**	**8,3**	**5**	**8,3**	6,4 / 1,7	11,2 / 6,2	8,48 / 4,26	8,4 / 4,4
MH	**3**	**10,7**	**3**	**10,7**	6,5 / 2,7	8,3 / 4,8	7,36 / 3,66	7,3 / 3,58
TM	**7**	**8,2**	**7**	**8,2**	**5,4 / 1,9**	**15,7 / 14,2**	**9,67 / 7,5**	**8,9 / 6,9**
Total	21	5.6	21	5.6	6.47 / 2.15	12.6 / 9.87	8.95 / 5.65	8.51 / 5.22

*Maximum permitted level is 0 ppb

BIBLIOGRAFIE

1. BĂRZOI, D., MEICA, S., NEGUŢ, M. – Toxiinfecţiile alimentare, 1999, Ed. Diaconu Coresi, Bucureşti
2. CARDWELL, K.F., RICHARD, J.L. et all. - Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems, 2003, Ames, Iowa, Task Force Report no139
3. www.cast.org/mycotoxins/risks (accesat 14.04.2006)
4. CZERWIECKI, L., WILCZYNSKA, G., KWIECIEN, A. – Mycotoxins in foodstuffs in Poland, Mycotoxin Research, 2006, 22, 3, 159-163
5. CURTUI, V., USLEBER, G. E., - Mycopathologia, 1998, 143, 97-103
6. CURTUI, V., SEIDLER, E., SCHNEIDER, E., USLEBER G. E. - Mycotoxins in food in Germany, An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe, 2004, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London
7. DAMIESCU, LĂCRĂMIOARA, TRIF, ALEXANDRA - The incidence of mycotoxins in feed in the Timis county in the period 2004-2007, Lucrări ştiinţifice, 2008, Medicină veterinară, XLI , Timişoara
8. GILBERT, J., - Quality assurance in mycotoxin analysis, 1999, FNA/ANA 23
9. www.fao.org/docrep/annualreport/qualityassurance (accesat 25.09.2006)
10. LOPEZ-GARCIA, R., PARK, D. L., PHILIPS, T.D. - Integrated mycotoxin management systems, 1999, FNA/ANA 23
11. www.fao.org/docrep/x2100T/x2100t07.htm (accesat 21.04.2006)
12. OSTRY, V., RUPRICH, J., SKARKOVA, JARMILA – Raisins, ochratoxin A and human health, Mycotoxin Research, 2002, 18A, 1, 147-152

13. PEITO, A., VENANCIO, A – An Overview of Mycotoxins and Toxigenic Fungi in Portugal, An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe, 2004, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London
14. RAFIK, A. EL KOTRY, HAMED, M.I., DOMA, M.B., HUSSEIN, M.B., AKEL EL GAWAD M. EL SHAWAF – Aflatoxin production of Aspergillus flavus in freshly prepared sausages stored at different temperatures, 1992, 3rd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin, vol 1, 664
15. RANKIN, M., GRAU, C. – Agronomic consideration for molds and mycotoxins in corn, silage and high moisture corn, 2003
16. www.wisc.edu/dysci/uwex/brocheres/brocheres/rankinmold.pdf (accesat 21.04.2006)
17. TRIF, ALEXANDRA, DAMIESCU, LĂCRĂMIOARA, CHETRINESCU, N., MUSELIN, F., POPA, OANA – Mycotic and mycotoxic contamination of feed in the Timis county in the period 2001-2004, Lucrări ştiinţifice, 2005, Medicină veterinară, XXXVIII, Timişoara,677
18. VARGA, J., TOTH, B., MESTERHAZY, A., TEREN, J., FAZEKAS, B. - Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Foods and Feeds in Hungary, An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe, 2004, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London
19. WILM, K. H.,– Our food, Data base of food and related sciences, 2005
20. www.ourfood.com/foodsafety/FoodSafetyandControlSystem15.pdf (accesat 22.03.2006)
21. ***Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition: 970.44- standard preparation.
22. ***Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition: 975.37- identification of aflatoxins through thin layer cromatography.
23. ***Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition: 979.18- Aflatoxins in seeds and peanuts
24. ***Ordinul 294/11.07.2002 pentru aprobare Normei Sanitar Veterinare privind limitele maxime ale unor contaminanți în produsele alimentare
25. ***Ordinul 120/16.11.2005 pentru aprobare Normei Sanitar Veterinare privind limitele maxime ale unor contaminanți în produsele alimentare
26. ***Ordinul 168/16.11.2006 pentru aprobare Normei Sanitar Veterinare privind modul de prelevare al probelor destinate analizării unor contaminanți în produsele alimentare
27. *** Report of the FAO/WHO Expert Meeting), Animal Feed Impact on Food Safety, 2007, FAO Headquarters, Rome
28. http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/publications/agapubs/A1507_Animal-Feed.pdf (accesat 06.03.2008)

ETUDE DE LA CARACTERISATION ET LA TRANSMISION DES GENES DE VIRULENCE D'E .COLI AVIAIRE PAR LA METHODE PCR DANS L'OUEST D'ALGERIE

STUDY AND CHARACTERIZATION OF THE TRANSMISSION OF VIRULENCE GENES OF E. AVIAN-COLI BY PCR METHOD IN THE WEST OF ALGERIA.

HAMMOUDI A/H. , A.MOUATS, M.HALBOUCHE, H.AGGAD, S.A. ABDELHADI
Universite ibn khaldoun ,faculte agro veterinaire TIARET 1400
LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMAL APPLIQUEE UNIVERSITE DE MOSTAGANEM 27000 ALGERIE.

The Escherichia coli infections are responsible for enormous economic losses in the poultry sector and is one of the reasons for entering the most frequent at the slaughterhouse. Despite the increasing incidence of resistance, the antibiotic based on a diagnosis and appropriate as prophylaxis, are the only ways to fight against this disease.

Knowledge of virulence factors and pathogenic mechanisms of Colibacillosis grew significantly through the development of molecular approach to virulence. Our study has also highlighted several potential virulence factors. (IUF, TSh, PAPC, Neu C) by the PCR technique. The characterization of new virulence factors, including the recently undertaken molecular approaches, should allow complete understanding of the disease process but also to improve the diagnosis.

In our study also tracks band of broiler and parents showed a great variability for different serotypes. The findings have actually demonstrated the existence of a genetic similarity to the particular serotype O78 in a single production line that requires a medical and health prophylaxis rigorous on-farm to prevent vertical transmission.

Keywords: colibacillosis, Escherichia coli, serotyping, gene virulence, chicken.

MATERIEL ET METHODE

ANALYSE PCR: (polymerase chaîne reaction). Notre étude a porté sur un échantillon de 27 souches *E. coli* aviaire d'origine Algérienne. L'objectif est de déterminer avec précision la présence ou non des gènes de virulence. Cette étude à été réalisée au niveau du centre de tours **INRA UR 86Bio Agresseur, Santé, Environnement – France.** Ainsi deux bandes du produit final (poussin chair), issu des reproductrices chair, âgées de 27 à 32 semaines ont fait l'objet de contrôles sanitaires en élevages. Des prélèvements d'échantillons (sujets) sont effectués sur des reproductrices ainsi que sur le produit final (poussins) pour examens sérologiques, microbiologiques et enfin les tests génétiques (PCR) lorsqu'il y a suspicion de la maladie point de vue clinique. Les souches de colibacilles utilisées comme souches de référence étaient de deux types: d'une part des souches sauvages d'origine aviaire dont on sait par des tests phénotypiques en laboratoire qu'elles possèdent ou non les facteurs recherchés.Vingt-sept souches ont ainsi été choisies. Les amorces sont des oligonucléotides dont la séquence a été déterminée au laboratoire à partir de la séquence de certains gènes codant les facteurs de virulence recherchés.***(Amorces cap,Amorces iuc,.. Amorces pap)***.

RESULTATS ET DISCUSSION

***Tableau** 1: Résultas PCR*

Isolats	Bande	Type Elevage	Age (Jours)	Organe	Sérotype	API 20 E		IUTA	TSH	NEUC	PAPC
28	1	Chair	2-3	Vitellus	01	514	4572	–	–	–	–
29	1	Chair	25-33	Foie	02	514	4572	–	–	–	–
30	1	Chair	25-33	Cœur	NT	514	4572	+	+	–	–
31	1	Chair	25-33	Foie	02	514	4572	+	+	–	–
32	1	Chair	25-33	Rate	NT	514	4572	+	+	–	+
33	1	Chair	25-33	Foie	02	514	4572	+	+	–	–
35	1	Chair	48-50	Foie	NT	504	4572	+	+	–	–
37	2	Chair	1 jour	Foie	02	514	4572	+	+	–	–
43	2	Chair	1 jour	Vitellus	02	515	4572	+	+	–	–
44	2	Chair	1 jour	Foie	02	505	4550	–	–	–	–
45	2	Chair	1 jour	Vitellus	02	525	4572	–	–	–	–
59	2	Chair	11	Foie	02	505	4572	+	–	–	–
60	2	Chair	11	Vitellus	02	515	4572	+	+	–	+
61	2	Chair	11	Vitellus	01	515	4572	+	+	+	–
62	2	Chair	36-39-43	Foie	02	715	4572	+	+	+	–
63	2	Chair	36-39-43	Foie	078	505	4572	+	+	–	+
64	2	Chair	36-39-	Rate	078	505	4572	+	+	–	+
36	1	Repro	27	Foie	02	514	4572	–	–	–	–
39	1	Repro	27	Foie	01	515	4572	–	–	–	–
40	1	Repro	27	Rate	02	514	4572	–	–	–	–
41	1	Repro	28	Cœur	02	504	4552	–	–	–	–
42	1	Repro	28	Foie	NT	515	4572	+	–	–	–
46	1	Repro	28	Testicule	02	515	4572	–	–	–	–
47	1	Repro	30	Rate	078	505	4572	+	+	–	+
48	2	Repro	30	Cœur	078	504	4572	+	+	–	+
49	2	Repro	32	Foie	078	504	4572	+	+	–	+
50	2	Repro	32	Rate	078	505	4572	+	+	–	+

1- Géne IUTA responsable du système aérobactine (captation fer).

L'aérobactine permet à la bactérie de capter le fer libre ou fixé dans l'organisme hôte. Toutes les souches synthétisant l'aérobactine devraient présenter le fragment attendu.Les résultats décrits dans le tableau N°1 montrent que pour les 27 souches, 18 souches sont positives exprimant le fragment qui représente le gène de virulence IUTA avec un taux de 66%. L'étude fréquentielle des différents gènes basée sur la statistique du KHI2 montre que la pathogenicite des souches isoles et testes dans notre étude ne dépend pas essentiellement de ce gène de virulence (p=0.08).

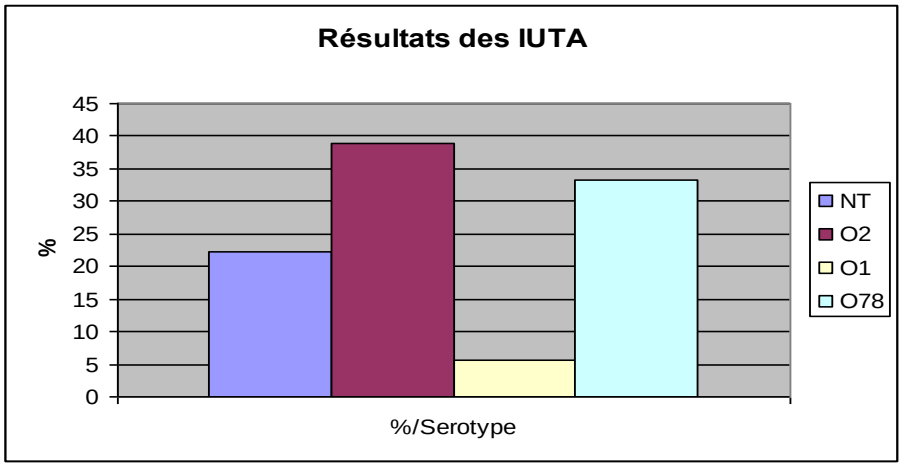


Figure 1 : Résultats (Géne IUTA)

Les isolats qui présentent des fragment d'amorces (k4576 et 7122) sont considères comme positifs et expriment ainsi le gène de virulence IutA (ex:59,60,61,42,47,49,31,33,35,43),tandis que les autres isolats (ex:28,29,44,45, 40,41,46) n'exprime pas le fragment considères comme négatifs.

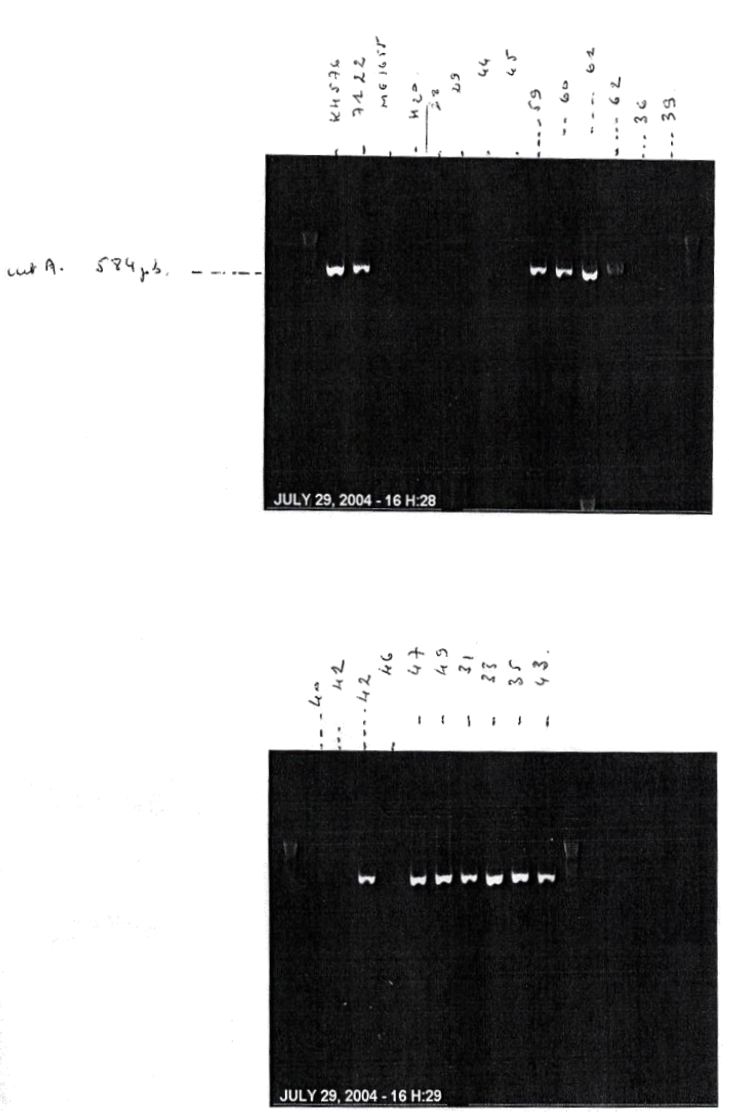


Figure N°02 *Double gel d'electrophorese de la PCR du gène IUTA*
2- Géne TSH *protéine responsable d'activité Hémagglutinine.*

Toutes les souches synthétisant l'antigène k devraient présenter le fragment attendu après lecture du gel d'electophorese. Les résultats décrits dans le tableau montre que sur les 27 souches analysées, 16 souches expriment le gène de virulence TSH représentant ainsi un taux de 59 %. L'analyse statistique du KHI2 montre une différence non significatif dans l' expression de ce gène chez tout les serotypes. **(p=0.3).**

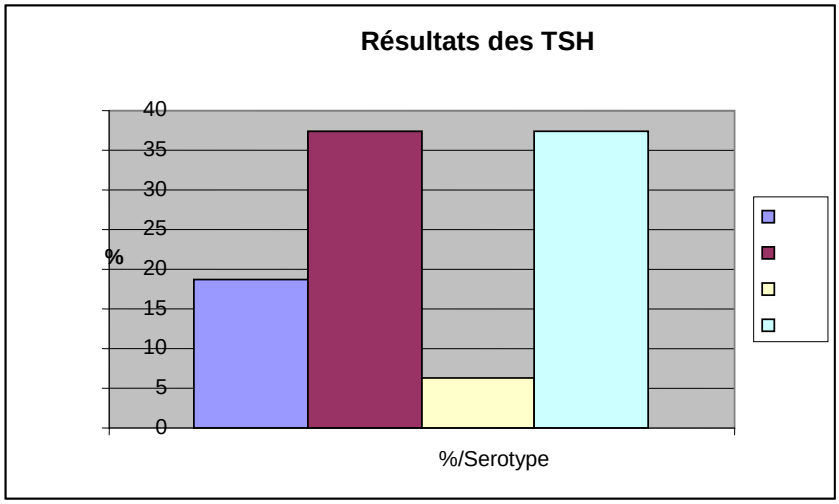


Figure N° 03 : *Résultats (Géne TSH)*

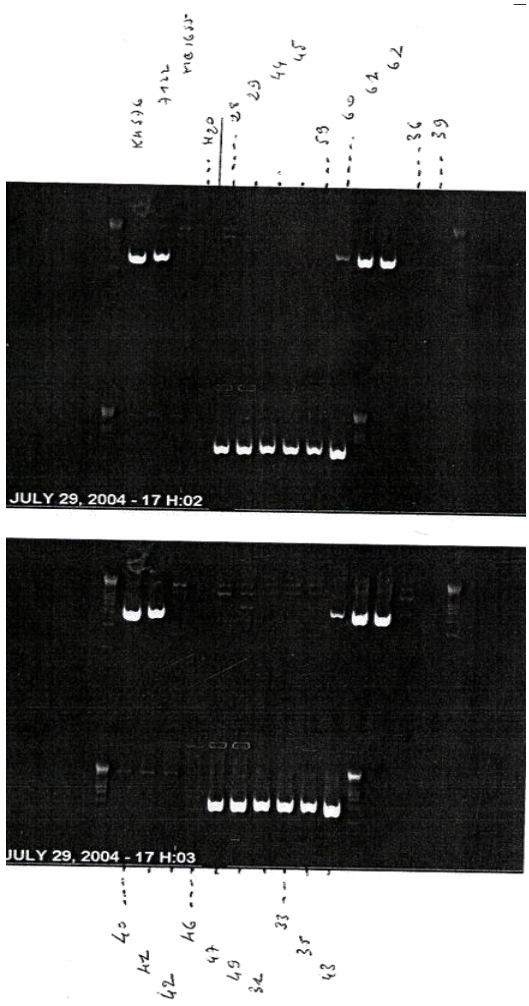


figure N°04 : *Double gel d'electrophorese de la PCR du gene TSH*

3- Géne NEUC Gène responsable de la synthèse l'antigène k1et du transport du polymère sialique. Ce dernier représente un taux de 7,40 % L'étude fréquentielle de l'expression du gène **NEUC** basée sur la statistique du KHI2 est hautement significatif (p=0).

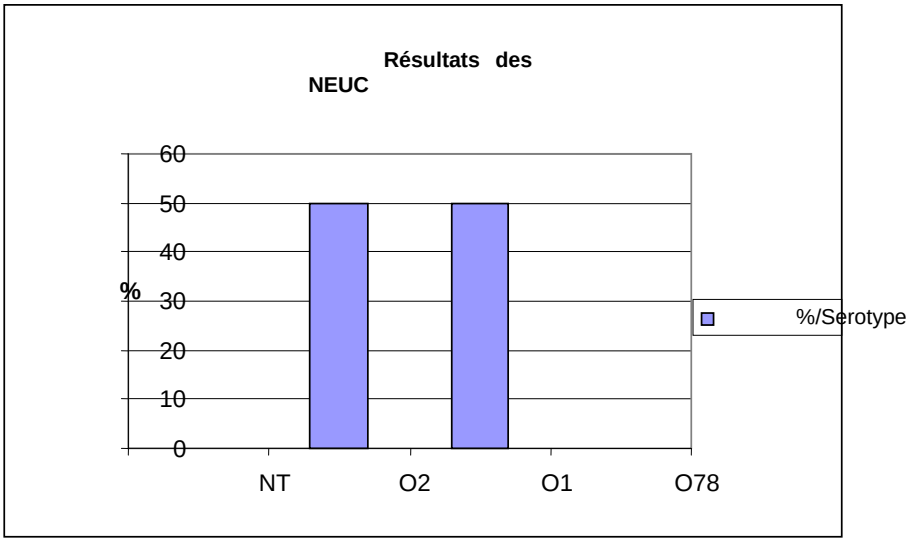


Figure N°05/ Résultats NEUC

4-PAPC responsable de la synthèse des fimbries P est chromosomique. Toutes les souches possédant des fimbriae P devraient être positives pour cette amorce.

Les résultats décrits dans le tableau N° 11 montre que seulement 08 souches sur 27 souches, exprime le gène PAPC qui représente un taux de 29,6 %.

L'étude fréquentielle de l'expression du gène PAPC basée sur la statistique du KHI2 montre une différence hautement significatif p=0.03.

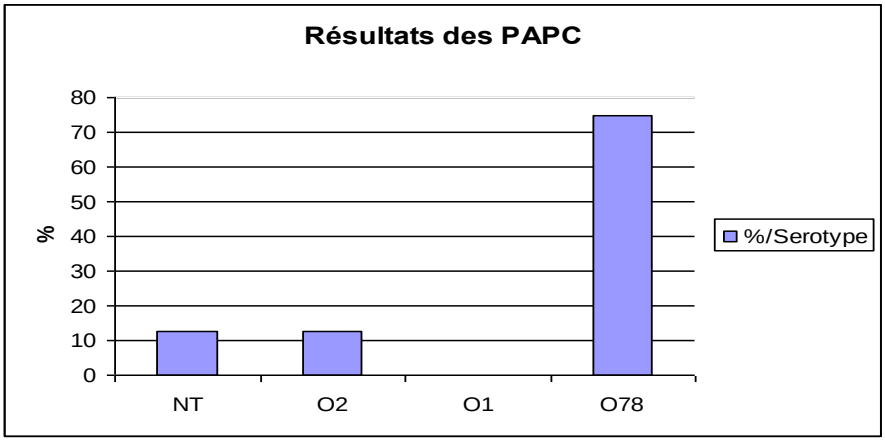


Figure N° 06/ résultats PAPC

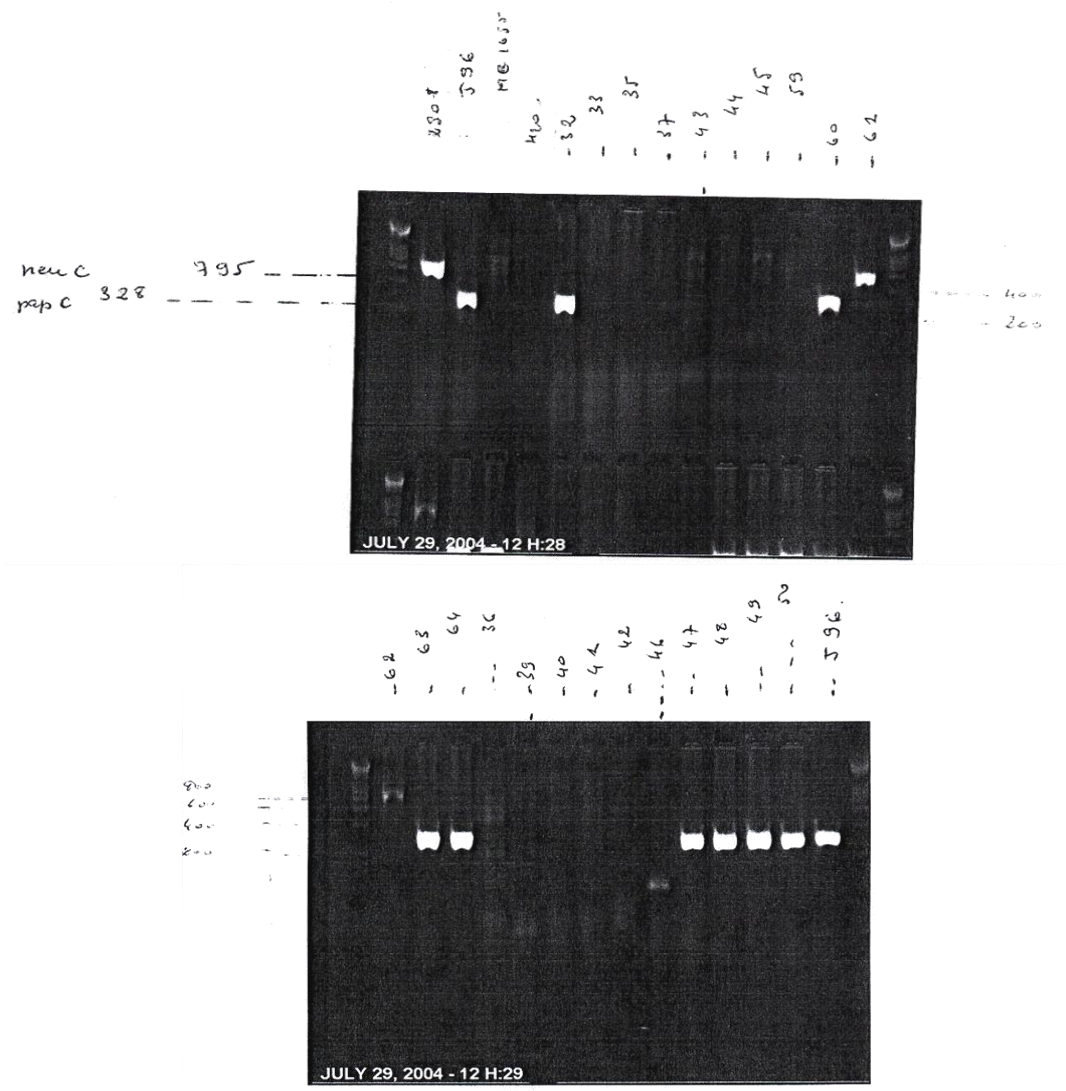


Figure N07: *Double gel d'electrophorese de la PCRdes gènes NEUC et PAPC.*

DISCUSSION

Géne IUTA : Les résultats obtenus montrent clairement le rôle très important dans la virulence du gène IUTA qui s'exprime dans 18% des souches isolés des différents sérotypées même non typables qui est de l'ordre de 22.22%.

Chez les E. Coli aviaire l'expression de l'aérobactine puissant Chélateur du fer est Corrélé à la virulence des souches évaluées par le test de létalité sur poussin d'un jour. Lafont et al (2001) ont démontres que près de 100% des souches *d'E- Coli* appartenant au serogroupes majoritaire O_1, O_2, O_{78} et produisant de l'aérobactine sont pathogènes, parmi les souches d'autre sérotype produisant l'aérobactines 83 % sont des pathogènes**.** L'observation de la forte corrélation entre virulence et synthèse d'aérobactine à récemment conduit à la mise au point d'un test de diagnostique des *E-Coli* aviaires basés sur cette propriété. Selon DHO MOULIN et al, (1990) la recherche des systèmes aérobactine de captation de fer, bien correlé à la virulence des souches E- Coli aviaires permet de caractériser les souches n'appartenant pas au 3 sérogroupes majoritaires (O_2, O_1, O_{78}).Nos résultats

confirmes les études des DHO MOULIN puisque 22.22% des souches non typables exprime les gènes de captations du fer et démontre que nos souches Algériennes sont hautement pathogènes.

2.Géne TSh Les résultats obtenus montrent que sur les 27 souches 16ont exprimée le gène TSH responsable d'une activité hémaagglutinante exprimé à basse température mise en évidence par PROVENCE ET CURTISS III, (1994) chez une souche aviaire O_{78}.Des études de corrélation avec la virulence ont établi que cette protéine pourrait jouer un rôle dans le pouvoir pathogène. Maurer et all ont montrés que le gène TSH était présent chez 46% des souches E- Coli aviaire d'origine pathologique .Par ailleurs dans une étude portant sur 300 souches E- Coli aviaire isolés en France et au Québec DHO MOULIN et al ont démontré que parmi les souches pathogènes 90,6% expriment le gène TSH qui reste beaucoup plus élevée que celle des souches non pathogène (DHO-MOULIN et al.1999).Nos résultats rejoint ceux de provence et Curtiss III puisque 06 souches sur les 16 positives sont des sérotypes O_{78}. Cela démontre une autre fois que les souches Algériennes de sérotypes 0_{78} sont hautement pathogènes.

.3.Géne NEUC Les résultats obtenus montrent que sur 27 souches 02souches seulement ont exprimées le gène d'antigène capsulaire k, des sérotypes O_2 et O_1.Selon JAHNN. V la capsule k1 est relativement fréquente chez les E- Coli pathogènes aviaires et associé dans près de 100% des cas aux sérogroupes O_1 et O_2. Elle est également moins fréquemment chez les E- Coli pathogènes aviaires d'autre sérogroupes (JANBEN et al. 2001).Dans notre étude Sur 13 souches de sérogroupes O_2 O_1 deux (02) souches expriment le gène NEUC. Cela peut être expliquer par le faite du nombre des souches E- Coli 27 étudie ou probablement du à la spécificité des souches Algériennes qui nécessite une étude approfondie en matière de biologie moléculaire.

.4. Géne PAPC Les résultats obtenus montrent que 08 souches sur 27 ont exprimée le gène PAPC (soit 27%).Les études Dozois et al ont montré que chez les E- Coli aviaires les fimbries P n'ont été détectés que chez les souches pathogènes (DOZOIS et al.2000). Les études sont divergentes quant à leurs fréquences entre 30 et 45 % des souches posséderait des fimbries P mais seul 10% des souches seraient capables de l'exprimé phénotypiquement. DHO MOULIN et al, (1990) expliquent que Leur rôle dans les interactions avec les défenses immunitaire est actuellement à l'étude. Récemment, STORDEUR, (2002) ont montrés que 76% des souches de E. Coli septicémique ont été négatifs pour la présence Pap gène au niveau de la grappe **(**GIOVANARDI et al.2005).Nos résultats rejoint l'étude de celle décrite par DHO MOULIN et al et démontrent que les souches Algériennes sont hautement pathogènes et nécessitent des études plus approfondies**.**

2^{éme} Axe: L'hypothèse posée dans notre étude est de déterminer réellement l'existence d'une relation entre l'infection de la maladie chez les parentaux et la descendance. Le suivie de deux bandes de poulet de chair ont montrées une grande variabilité pour les différents sérotypes. Pour les sérotypes O_2 les parentaux n'expriment aucun gène de virulence sauf pour le IUTA une seul fois seulement. Par contre au niveau du poulet de chair les sérotypes O_2 expriment presque tous les gènes de virulence a des pourcentages différents. Pour le sérotypes O_1 et NT on constate qu'il n y a pas une relation étroite par contre pour le sérotype O_{78} on a remarqué que les mêmes résultats sont exprimés au niveau de la bande N°02. Les gènes de virulence exprimés chez les reproductrices sont les mêmes exprimés au niveau des sérotypes O_{78} du poulet de chair. Selon. Giovanardi .D dans une étude récente de deux troupeaux élevages de poulet de chair A et B, l'ADN polymorphe amplifié aléatoirement effectuées sur l'APEC a révélé une similitude génétique; le groupe étudier comportait quelques APEC O_{78}.Les résultats montrent que la transmission de l'APEC souches provenant d'adultes A et B à leur progéniture Pourrait se produire. Dans l'étude, il était pertinent que la majorité des souches de l'APEC des Poussins ont été isolés à partir des sacs vitellins (45.2 % des poussins présentant des omphalites) qui ont été déjà observé dans les poussins d'un jour, d'où une infection septicémique. Ces constatations, et le fait que l'auteur a trouvé une similitude génétique entre les clones de l'APEC au sein d'une unique chaîne de production des éleveurs de poulets, soutiennent l'hypothèse que peut-être a colibacillose (omphalite) provenait d'une infection APEC embryon avant l'éclosion. Le moment de l'infection reflète le modèle de mortalité des poulets avec une infection

bactérienne acquise après l'éclosion, la mortalité commence après plus de 20h **(**GIOVANARDI et al.2005).Selon l'étude de HORROX N. (2000) un embryon infecté, la mortalité débute à l'éclosion**.** Selon DA SILVEIRA et al, (2003) l'absence d'isolement de l'APEC au niveau du sac vitellin, pourrait expliquer le fait que pour cette infection, les souches des E. Coli ne doivent pas nécessairement avoir les facteurs de virulence nécessaire pour coloniser les voies respiratoires résultant Dans a septicémie

CONCLUSION

Le problème des résistances aux antibiotiques d' E. Coli aviaire est d'une importance particulière en Algérie, car il existe un risque élevé de contamination humaine en raison de l'abattage manuel d'animaux. Les résistances aux antibiotiques sont souvent codées par conjugaison plasmides ou transposons donc les E. Coli d'origine aviaire pourrait agir comme une source possible pour le transfert de la résistance aux antibiotiques à d'autres espèces de bactéries, y compris des agents pathogènes ainsi, de plus en plus dans le réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques ils existent des souches qui pourraient fortement compromettre le traitement des maladies aviaires. La caractérisation moléculaire des mécanismes de résistance aux antibiotiques a mis en évidence l'existence de structures génétiques mobiles qui jouent un rôle très important dans la dissémination des résistances: les plasmides, les intégrons et les transposons. Dans ce contexte, il serait intéressant d'initier des recherches portant sur un nombre d'échantillons élevé et représentatif, de faire l'étude sur le plan régional voire national et de pratiquer la méthode de PCR afin de pouvoir identifier les facteurs de virulence et les mécanismes de résistance. L'identification des facteurs de virulence des E. Coli pathogènes aviaires, et l'étude de leur rôle dans la colibacillose ont nettement progressé ces dernières années. La caractérisation de nouveaux facteurs de virulence, notamment par les approches moléculaires récemment entreprises, devrait permettre de compléter la compréhension du processus pathogénique mais aussi d'améliorer le diagnostic en définissant de façon plus précise des associations de facteurs de virulence corrélées au pouvoir pathogène des E. Coli aviaires. Les recherches actuelles permettant de définir les facteurs de virulence communs au plus grand nombre de souches APEC, de les caractériser et de comprendre leurs mécanismes de fonctionnement, devraient permettre dans un avenir proche de définir des tests de diagnostic et d'améliorer la prévention.

Remerciment: DHO MOULIN MARYVONE INRA DE TOURS FRANCE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

1. DA SILVEIRA W.D., LANCELLOTTI, M., FERRIERA, A., SOLFERINI, V.N., DE CASTRO, A.F.P, STEHLING, E.G. & BROCCHI, M. 2003. Determination of the clonal structure of avian Escherichia coli strains by isoenzyme and ribotyping. Journal of Veterinary Medicine Series B, 50, 63-69.
2. DHO MOULIN Maryvonne, et FAIRBROTHER J.M. 1999. aviaire pathogène d'Escherichia coli (APEC). Vet. Res., 30, 299-316.
3. DHO-MOULIN Maryvonne, VAN DEN BOSCH J.F., GIRARDEAU J.P., BREE A., BARAT T., LAFONT J.P. 1990. Surface antigens from Escherichia coli O2 and O78 strain s of avian origin. Infect. Immun. 58, 740-745.
4. DOZOIS C.M., DHO-MOULIN Maryvonne, BREE A., FAIRBROTHER J.M., DESAUTELS C., CURTIS III R. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian Escherichia coli and localization and analysis of the tsh genetic region. Infect. Immun. 68, 4145-4154.
5. GIOVANARDI E., CAMPAGNARI L., SPERATI RUFFONI, ORTALI. G. 2005. Avian Pathology. 34(4), 313-318.
6. HORROX .N. 2000. Controlling yolk sac infection. International Hatchery Practice, 14, 27- 28.
7. JAN. VANDENHURK. BRENDA J., ALLAN. RIDDELL C., TRENT WATTS., and POTTER AA. 1994. Effect of infection with hemorrhagic enteritis virus on susceptibility of turkeys of Escherichia Coli. Avian dis., 38, 708-716.
8. JANN K. 1985. Isolation and characterization of fimbrioe from E.Coli. In, Sussmou Med. The virulence of *E.coli,* London academic press; 381–388.
9. LAFONT J.P., DHO M, D'HAUTEVILLE H.M, BREE A, SANSONETTI P.J. 2001. Presence and expression of aerobactin genes in virulent strains of Escherichia coli. Infect. Immun., 55, 193-197.
10. PROVENCE D.L., CURTISS III. R. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic Escherichia coli strain. Infect. Immun. 62, 1369-1380.11)
11. STORDEUR P., MAINIL, J. 2002. La colibacillose aviaire. Annales de Médecine Vétérinaire. 146, 11

OBSERVAŢII PRIVIND EVALUAREA STATUSULUI IMUNITAR PRIN IFI LA CÂINII SUSPECŢI DE BOALA CARRÉ

OBSERVATIONS REGARDING THE EVALUATION OF THE IMMUNE STATUS IN DOGS SUSPECTED FOR CANINE DISTEMPER

MIHALACHI (DIMITRIU) SIMONA, SCAGLIARINI ALESSANDRA, PERIANU T.
UŞAMV Iaşi, Facultatea de Medicină Veterinară,
diplush@yahoo.com

Canine distemper virus (CDV), belonging to the genus Morbillivirus of the Paramyxoviridae family causes a contagious systemic viral infection, accompanied by multifocal demyelinating lesions in the central nervous system of dogs and other carnivores. CDV causes massive immune suppression. Lately, canine distemper occurs also in vaccinated dogs. Therefore, the immune status of 11 dogs suspected of being infected with CDV has been evaluated using the indirect immunofluorescence antibody test. 6 dogs of 11 tested were previously vaccinated against CDV.

Key words:canine distemper virus, IFI, immune status, specific antibodies

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost realizate pe un număr de 11 câini (5 masculi şi 6 femele), 7 (64%) de rasă pură şi 4 (36%) metişi, cu vârste cuprinse între 2 luni şi 11 ani, cu manifestări respiratorii, digestive, nervoase şi cutanate. Din cei 11 câini testaţi, 6 (55%) fuseseră vaccinaţi împotriva bolii Carré. De la cei 11 câini s-au recoltat probe de sânge, în vacutainere cu activator de ser. După centrifugare s-au prelevat serurile ce au fost utilizate la testul de imunofluorescenţă indirectă.

Imunofluorescenţa indirectă sau metoda „sandwich" presupune utilizarea anticorpilor specifici neconjugaţi. Cuplarea lor cu antigenul este relevată prin adăugarea succesivă de anti-gamaglobuline conjugate. În acest caz are loc o cuplare iniţială a antigenului cu anticorpii specifici, ultimii funcţionând la rândul lor ca antigeni faţă de anti-gamaglobuline, de care se vor lega.

Titrul seric de IgM este crescut la câinii care supravieţuiesc infecţiei acute. Stabilirea titrului de IgM permite identificarea unei infecţii recente. Creşterea titrului de IgG are, în schimb, o valoare orientativă, deoarece se poate datora unei infecţii recent depăşite, precedente sau în curs şi, de asemenea, depinde de statusul vaccinal al individului.

Pentru pregătirea lamelor, au fost preparate 6 recipiente de 75 cm2 (Flasks Corning) în care au fost cultivate monostraturi de celule VERO, la termostat, la 37°C, cu 5% CO2, până când au devenit confluente. Monostraturile celulare au fost apoi detaşate cu ajutorul unei soluţii de tripsină, concentraţie 5% (DIFCO). Celulele au fost apoi resuspendate în 30 ml de E-MEM (Sigma) 10% SFB, şi infectate cu 2 ml de soluţie virală stock 10(5) TCDI 50 de Eagle-MEM CDV/Ond. Au fost pregătite apoi lame cu 16 godeuri (Lab-Tek Chamber Slide, Nunc). În fiecare godeu au fost puşi 100µl de celule VERO, infectate în prealabil cu o concentraţie cu indice de replicare 2x. Din fiecare sticlă au fost preparate 20 de lame, care au fost puse apoi la termostat la 37°C, cu 5% CO_2. Când efectul citopatic a devenit 50%, a fost îndepărtată soluţia infectantă, iar monostraturile au fost fixate în acetonă rece 80%, timp de 30 de minute.

După fixare, lamele au fost păstrate la -20°C până în momentul utilizării. Toate probele de ser au fost diluate prin dublare în soluţie-tampon fosfat salin steril 1x (PBS, Phosphate Buffered Saline) la pH 7,4, plecând de la diluţia 1:10, până la 1:1280. Din fiecare diluţie s-au prelevat câte 30µl care au fost puşi în godeuri şi lăsaţi la termostat în atmosferă umedă, 30 de minute, la 37°C. Pentru a îndepărta de pe lame anticorpii serici care nu s-au legat de antigene, au fost efectuate 3 spălări de câte 10 minute fiecare, cu PBS, la agitator. Apoi au fost diluaţi, în raport de 1:50 anticorpi de capră anti-IgG de câine şi anti-IgM de câine, conjugaţi cu izotiocianat de fluoresceină într-o soluţie de

albastru de Evans (Sigma), utilizat ca şi colorant de contrast pentru evidenţierea probelor de ser negative. Apoi, câte 30µl de conjugat anti-IgG au fost adăugaţi în cele 8 godeuri din partea superioară a lamei, iar câte 30µl de conjugat anti-IgM au fost distribuiţi în partea inferioară a lamei. Lama a fost lăsată la termostat timp de 30 de minute, la 37°C. După termostatare, pentru a îndepărta conjugatul în exces, lama a fost supusă la 3 spălări succesive, fiecare de câte 10 minute, cu PBS, la agitator. Lama a fost uscată şi, după îndepărtarea matriţei de silicon care delimitează godeurile, s-a adăugat o picătură de Fluoprep (Biomerieux) pe fiecare godeu. Lama a fost examinată la microscopul cu UV.

Titrul de anticorpi al fiecărei probe de ser a fost considerat ca diluţia maximă la care se mai putea observa fluorescenţa specifică. Dincolo de această diluţie, monostratul infectat capătă o culoare roşie uniformă.

Cei 11 câini suspecţi de boala Carré au fost diagnosticaţi cert prin reacţia de polimerizare în lanţ (PCR).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din cei 11 câini testaţi, 8 (73%) câini aveau titruri de IgG ≤ 1:80, 2 (18%) câini, titruri de IgG 1:320-640 şi 1 (9%) câine, titrul de Ig G 1:1280.

Datele obţinute la imunofluorescenţa indirectă relevă faptul că 5 (83%) din cei 6 câini vaccinaţi contra bolii Carré prezentau un titru de IgG ≤ 1:80, titru considerat insuficient pentru a proteja câinii de infecţie (Tabel nr.1).

Absenţa unui răspuns imunitar satisfăcător la aceşti indivizi s-ar putea datora fie vaccinării la o vârstă prea fragedă (< 2 luni), când anticorpii maternali ar putea interfera reacţia imunitară, fie aplicării vaccinului într-o perioadă de imunodepresie consecutivă administrării de antiinflamatorii steroidiene, fie utilizării de vaccinuri care nu au fost corect condiţionate termic, antigenul fiind sensibil la temperaturi > 4°C.

Tabel nr.1

Nr. crt.	Rasă	Sex	Vârstă	Vaccinare anti-CDV	Semne clinice	IFI	RT-PCR
1	Ciobănesc German	F	2luni	DA	Forma nervoasă	Ig G 1:40 Ig M 1:80	+
2	Yorkshire Terrier	M	8a11luni	DA	Forma nervoasă	Ig G 1:80 IgM negativ	+
3	Alano	M	3a5luni	DA	Forma nervoasă	Ig G 1:80 Ig M negativ	+
4	Husky Siberian	F	7a9luni	DA	Forma nervoasă	negativ	+
5	Corso	F	1a3luni	-	Forma nervoasă şi digestivă	Ig G 1:320-640 IgM 1:160-320	+
6	Boxer	F	2a4luni	-	Forma respiratorie	Ig G 1:80 IgM 1:80	+
7	Corso	F	1a3luni	DA	Forma respiratorie, digestivă, cutanată	Ig G 1:320-640 Ig M 1:160-320	+
8	metis	M	2luni	DA	Forma nervoasă	IgG 1:40	+
9	metis	M	10a9luni	-	Forma nevoasă	Ig G 1:1280 Ig M negativ	+
10	metis	M	3a4luni	-	Forma respiratorie	Ig G 1:40 IgM 1:20	+
11	metis	F	8ani	-	Forma respiratorie	Ig G 1:80 IgM 1:20	+

Titrurile ridicate de IgM relevă contactul relativ recent al animalului cu virusul CDV, caracterizând fazele acute ale bolii. Astfel, 4 (36%) din câinii testaţi prezentau titruri de IgM ≥ 1:80, 3 (28%), titruri de IgM < 1:80, în timp ce 4 (36%) câini au fost negativi pentru IgM, fapt ce indică o evoluţie relativ lungă a bolii.

CONCLUZII

În urma utilizării testului de imunofluorescenţă indirectă pe serurile a 11 câini bolnavi de boala Carré, confirmaţi de testul RT-PCR, am desprins următoarele concluzii:

1. Din cei 11 câini testaţi, 8 (73%) au prezentat titruri de IgG ≤ 1:80, iar 3 (27%) titruri de IgG > 1:80.
2. Doar 1 (33%) din cei 6 câini ce fuseseră anterior vaccinaţi contra bolii Carré, prezenta un titru de IgG suficient (> 1:160) pentru a fi protejaţi de infecţie.

BIBLIOGRAFIE

1. BRAUND K.G. (2001), Clinical Neurology in Small Animals – Localization, Diagnosis and Treatment,Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca, New Zork, USA
2. CLEAVELAND, S., APPEL, M.G.J., CHALMERS, W.S.K., CHILLINGWORTH, C., KAARE, M. , DYE, C., (2000) - Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife, Veterinary Microbiology 72, 217±227
3. HORZINEK M.C., (2006) – Vaccine use and disease prevalence in dogs and cats, Veterinary Microbiology 117, 2-8
4. PERIANU T., (2005), Boli Infecţioase ale animalelor. Viroze, Vol II, Editura Universitas XXI, Iaşi
5. SCAGLIARINI, A., BALDUCCI, F., DI FRANCESCO, A., OSTANELLO, F., PROSPERI, S., MORGANTI, L., (1999) - Cimurro del cane: valutazione dei titoli anticorpali in soggetti con diversa anamnesi clinica e vaccinale, Veterinaria, Anno 13, n.1
6. SCHULTZ R.D. (2006) – Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review, Veterinary Microbiology 117, 75-79
7. TWARK, L., DODDS, W.J., (2000), - Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs, JAVMA, Vol 217, No. 7
8. 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
9. VELESCU ELENA, (2001) – Diagnosticul bolilor infecţioase. Manual Practic, Ediţia a II-a. Ed. Vasiliana´98, Iaşi.
10. VON MESSLING V., HARDER T.C., MOENNIG V., RAUTENBERG P., NOLTE I., HAAS L., (1999) - Rapid and Sensitive Detection of Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies against Canine Distemper Virus by a New Recombinant Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Journal of Clinical Microbiology, Apr., p. 1049–1056
11. WANER, T., NOAM, J. MAZAR, S. (1998) - Post-vaccination evaluation of the immunization status of puppies for canine parvo- and distemper viruses using an in-clinic elisa test

UTILIZAREA METODEI RT-PCR ÎN DIAGNOSTICUL BOLII CARRÉ LA CÂINE

THE DETECTION OF CANINE DISTEMPER VIRUS BY REVERSE TRANSCRIPTION-PCR

MIHALACHI (DIMITRIU) SIMONA, SCAGLIARINI ALESSANDRA, PERIANU T.
UŞAMV Iaşi, Facultatea de Medicină Veterinară,
diplush@yahoo.com

The wide spectrum of the clinical signs (respiratory, gastrointestinal and nervous involvment) in canine distemper makes sometimes the intravitam diagnosis very difficult. In order to confirm distemper in living infected dogs, reverse transcription-PCR (RT-PCR) was used to detect canine distemper virus (CDV) nucleoprotein (NP), using RNA extracted from skin samples obtained by skin biopsy from the pads. 21 dogs presenting one, two or all the specific clinical syndroms were tested. The detection of CDV by RT-PCR from skin samples confirmed distemper in 13 out of 21 dogs tested, regardless of the clinical involvment.

Key words: canine distemper virus, RT-PCR, NP RNA

MATERIAL ŞI METODE

De la 21 de câini suspecţi de boala Carré, pe baza semnelor clinice, s-au recoltat prin biopsie cutanată de la nivelul cuzineţilor plantari, probe de piele cu diametrul de 6 mm. Probele au fost supuse unor congelări şi decongelări repetate în vederea eliberării virusului din ţesuturi. Pentru extracţia ARN-ului viral s-a utilizat kitul NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) şi s-a respectat protocolul recomandat de producător. Probele de ARN au fost păstrate la -80°C până la utilizare.

Pentru retro-transcripţia ARN-ului viral în ADN complementar s-a utilizat kitul GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems).

Mixul a fost preparat din: 4µl BFR 5x, 2 µl $MgCl_2$, 2 µl dNTPs, 0,5 µl hexameri aleatori, 3,7 µl H_2O, 0,5 µl RN-ază, 0,3 µl RT-ază şi 5 µl ARN de analizat.

Probele de ADNc rezultate în urma retro-transcripţiei au fost păstrate la 4°C până la utilizare.

Prin reacţia de polimerizare în lanţ s-a urmărit amplificarea secvenţei cu lungimea de 287 perechi de baze, ce corespunde poziţiei 769-1055 din tulpina vaccinală de referinţă Onderstepoort. Secvenţa de interes face parte din structura nucleoproteinei virale (NP), reprezentând un fragment foarte bine conservat structural în cadrul diverselor tulpini izolate.

Primerii utilizaţi în reacţia de polimerizare au fost reprezentaţi de:

NP1: ACAGGATTGCTGAGGACCTAT

NP2: AGCACCGTACATGGTTATCTTG

Pentru amplificare s-a utilizat kitul Taq DNA Polymerase, (Qiagen). Mixul a fost preparat din: 5 µl BFR5X, 4 µl dNTPs, 1 µl NP1, 1 µl NP2, 10 µl Sol Q, 0,25 µl Taq Polymerase, 23,75 µl H_2O şi 5 µl ADNc de analizat.

Mixul a fost apoi supus următorului ciclu la termocicler: 94°C (denaturare), 58°C, (annealing) şi 72°C, (extensia finală).

Detectarea produşilor de amplificare s-a realizat prin electroforeză în gel de agaroză 2%. S-au adăugat 1µl de albastru de bromfenol, la 5µl din fiecare produs amplificat, soluţia astfel obţinută fiind încărcată în gel alături de un control pozitiv şi unul negativ. Controlul pozitiv a fost reprezentat de tulpina vaccinală Onderstepoort, iar controlul negativ, de o probă blanc.

Benzile colorate au fost evidenţiate cu analizatorul de imagini Fluor-S Multimager (Bio-Rad).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Secvenţa genică aleasă pentru amplificare asigură stabilirea unui diagnostic cert în boala Carré, având în vedere că rămâne constantă din punct de vedere structural, de la o tulpină la alta.

Alegerea biopsiei cutanate ca metodă de prelevare a probelor se justifică prin tropismul virusului şi pentru epitelii. Indiferent de forma clinică evolutivă, ARN-ul viral poate fi extras din probele de piele, apoi supus retro-transcripţiei şi amplificării, permiţând astfel identificarea indivizilor pozitivi pentru CDV (Canine Distemper Virus).

Cei 21 de câini testaţi prezentau simptomatologie nervoasă, digestivă sau respiratorie sau diverse combinaţii de sindroame, după cum rezultă din datele prezentate în tabelul nr.1.

Tabel nr.1

Nr. crt.	Rasă	Sex	Vârstă	Vacc. anti-CDV	Semne clinice	RT-PCR
1	Ciobănesc German	F	2luni	DA	F. nervoase	+
2	Yorkshire Terrier	M	9 ani	DA	F. nervoase	-
3	Alano	M	3a5luni	DA	F. nervoase	_
4	Husky Siberian	F	7a9luni	DA	F. nervoase	+
5	Corso	F	1a3luni	NU	Forma nervoasă şi digestivă	+
6	Boxer	F	2a4luni	NU	Semne respiratorii	-
7	Ciobănesc german	M	1a5luni	NU	Fenomene respiratorii	-
8	Boxer	M	3a3luni	NU	F. nervoase	+
9	Boxer	M	2a	NU	Fenomene respiratorii	-
10	Barbone Nano	M	6luni	DA	Semne respiratorii	-
11	Corso	F	1a3luni	DA	F. nervoase	+
12	metis	M	3luni	DA	F. nervoase	+
13	metis	M	10a9luni	NU	Forma nervoasă	+
14	metis	M	3a4luni	NU	Semne respiratorii	-
15	metis	F	6 luni	DA	Forma respiratorie şi nervoasă	+
16	Ciobănesc German	F	3luni	DA	F. respiratorie, digestivă, nervoasă	+
17	metis	M	7a	DA	F. nervoase	+
18	metis	M	10a8luni	DA	F. nervoase	+
19	Cavalier King	F	4luni	NU	Forma respiratorie şi nervoasă	+
20	metis	F	8ani	NU	Semne respiratorii	-
21	Boxer	F	2luni	NU	Forma respiratorie şi nervoasă	+

În urma reacţiei de polimerizare în lanţ, au fost evidenţiate 13 (62%) probe pozitive şi 8 (38%) probe negative.

Din cei 13 câini depistaţi pozitivi, 8 (61,5%) fuseseră imunizaţi contra virusului CDV. Prin investigaţii serologice s-au pus în evidenţă, la majoritatea cazurilor, titruri de anticorpi specifici în

cantitate insuficientă pentru a asigura protecţia indivizilor imunizaţi. Însă, au fost identificaţi pozitivi şi indivizi cu titruri ridicate de anticorpi specifici. În aceste condiţii, se lansează ipoteza circulaţiei unor tulpini diferite din punct de vedere antigenic. Ipoteza impune continuarea investigaţiilor în vederea amplificării şi secvenţierii genei H din virusul CDV, genă la nivelul căreia au fost observate variaţii de structură, consecutiv studiilor efectuate de alţi cercetători.

CONCLUZII

1. Pentru confirmarea diagnosticului, s-a amplificat o secvenţă genică de 287 perechi de baze din nucleoproteina virală (769-1055 din tulpina vaccinală Onderstepoort).
2. Din cele 21 de probe cutanate testate, 13 (62%) au fost pozitive, iar 8 (38%) negative.
3. 11 (52%) din cei 21 de caîini testaţi au fost imunizaţi specific contra CDV.
4. 8 (61,5%) câini din cei 13 pozitivi fuseseră anterior imunizaţi specific.

BIBLIOGRAFIE

1. BRAUND K.G. (2001), Clinical Neurology in Small Animals – Localization, Diagnosis and Treatment, Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca, New Zork, USA
2. BIRCHARD S.J., SHERDING R.G., (2006) - Saunders Manual of Small Animal Practice, Third Edition, Elsevier Inc.
3. CALDERON MARINA GALLO, REMORINI PATRICIA , PERIOLO O., IGLESIAS MARCELA, MATTION NORA , LA TORRE J. (2007) - Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina, Veterinary Microbiology 125, 341–349
4. CHERPILLOD P., BECK K., ZURBRIGGEN A., WITTEK R., (1999), Sequence Analysis and Expression of the Attachment and Fusion Proteins of Canine Distemper Virus Wild-Type Strain A75/17, Journal of Virology, Mar., p. 2263–2269
5. D'INTINO G., VACCARI F., SIVILIA S., SCAGLIARINI A., GANDINI G., GIARDINO L., CALZÀ L., (2006) – A molecular study of hippocampus in dogs with convulsion during canine distemper virus encephalitis, Brain Research 1098, 186-195
6. DEMETER Z., LAKATOS B., PALADE ELENA ALINA, KOZMA T., FORGÁCH P., RUSVAI M., (2007) – Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains, Veterinary Microbiology 122, 258-269
7. ELIA G., DECARO N., MARTELLA V., CIRONE F., LUCENTE M.S., LORUSSO E., DI TRANI L., BUONAVOGLIA C., (2006) – Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR, Journal of Virological Methods 136, 171-176
8. ENGELHARDT P., WYDER M., ZURBRIGGEN A., GRÖNE A., (2005), Canine distemper virus associated proliferation of canine footpad keratinocytes in vitro, Veterinary Microbiology 107 1–12
9. ERLES K., DUBOVI E.J., BROOKS H.W., BROWNLIE J., (2004), Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease, Journal of Clinical Microbiology, Oct., p. 4524–4529
10. FRIESS M., ENGELHARDT P., DOBBELAERE D., ZURBRIGGEN A., GRÖNE A., (2005), Reduced Nuclear Translocation of Nuclear Factor (NF)-kB p65 in the Footpad Epidermis of Dogs Infected with Distemper Virus, J. Comp. Path., Vol. 132, 82–89
11. FRISK A. L., KÖNIG M., MORITZ A., BAUMGÄRTNER W., (1999), Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper Journal of Clinical Microbiology, Nov., p. 3634–3643
12. KEAWCHAROEN J., THEAMBOONLERS A., JANTARADSAMEE P., RUNGSIPIPAT A., POOVORAWAN Y., ORAVEERAKUL K., (2005), Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand Veterinary, Microbiology 105 137–142
13. LAN N.T., YAMAGUCHI R., FURUYA Y., INOMATA A., NGAMKALA S., NAGANOBU K. , KAI K., MOCHIZUKI M., KOBAYASHI Y., UCHIDA K., TATEYAMA S., (2005), Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs, Veterinary Microbiology 110 197–207
14. LAN N.T., YAMAGUCHI R., INOMATA A., FURUYA Y., UCHIDA K., SUGANO S., TATEYAMA S., (2006) – Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs, Veterinary Microbiology 115, 32-42
15. MARTELLA V., CIRONE F., ELIA G., LORUSSO E., DECARO N., CAMPOLO M., DESARIO C., LUCENTE M.S., BELLACICCO A.L., BLIXENKRONE-MØLLER M., CARMICHAEL L.E., BUONAVOGLIA C., (2006) - Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy, Veterinary Microbiology 116, 301-309
16. PARDO I.D.R., JOHNSON G.C., KLEIBOEKER S.B., (2005), Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America, Journal of Clinical Microbiology, Oct., p. 5009–5017
17. UEMA M., OHASHI K., WAKASA C., KAI C., (2005), Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan, Virus Research 109 59–63

CONSIDERAŢII ASUPRA GRADULUI DE CONTAMINARE A SMANTÂNII PASTEURIZATE CU BACTERII AEROBE MEZOFILE

CONSIDERATIONS ON THE CONTAMINATION DEGREE OF PASTEURIZED SOUR CREAM WITH AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA

DOBOS TATIANA[1], BONDOC I.[2], SINDILAR E.[2]
[1]DSVSA Galaţi
[2]Facultatea de Medicină Veterinară Iaşi
dobos-galati@ansv.ro
tatianadobos@yahoo.com

The quality of butter as a dairy product resulted from industrially processed sour cream is directly influenced by the quality of the raw material. The study of the microbiological quality of sour cream as raw material for the fabrication of indigenous butter proved that after the pasteurization all analysed samples ranged within the maximal limits admitted for this parameter. Thus, the statistical analysis of the results showed that from 228 sour cream samples, no values of the total aerobic mesophilic germ number/ml over the limit were encountered.

Key words: sour cream, mesophilic aerobic bacteria, quality

Calitatea untului, ca produs lactat rezultat din procesarea industrială a smântânii, este influenţată în mod direct de calitatea acesteia, dar şi de tehnologia aplicată (1, 5, 6, 7, 11, 15). Dintre etapele fluxului tehnologic, pasteurizarea smântânii materie primă este esenţială: distrugerea în totalitate a florei patogene potenţial prezentă, eliminarea într-o măsură cât mai însemnată a florei de poluare şi distrugerea lipazelor endogene/exogene, constituie deziderate fundamentale ale etapei de pasteurizare. La rândul lui, regimul de pasteurizare aplicabil este dependent de o serie de factori intrinseci, dintre care putem cita: pH-ul, aciditatea totală sau titrabilă, aciditatea plasmei etc. Pasteurizarea smântânii materie primă este de tipul HTST, asociată de multe ori cu dezodorizarea şi chiar cu dezaerarea (1, 5, 9, 11, 13, 15).

În ceea ce priveşte efectul pasteurizării asupra microorganismelor prezente în smântâna materie primă, şi acesta depinde de numeroşi factori intrinseci şi extrinseci, dintre care putem cita: pH-ul; oxigenul dizolvat şi potenţialul redox; structura alimentului (conţinutul de grăsime); temperatura aplicată; posibila contaminare suplimentară în timpul procesului ş.a. (3, 5, 9, 10).

Contaminarea microbiană reziduală a smântânii pasteurizate apare cu atât mai importantă cu cât, în cursul operaţiunilor tehnologice imediat următoare – răcirea şi maturarea fizică şi respectiv maturarea biochimică, între microorganismele care supravieţuiesc tratamentului termic şi microorganismele culturii starter se pot instala fenomene precum cel de sinergism sau de antagonism, fenomene care influenţează într-o măsură însemnată proprietăţile produsului finit (10, 11, 13).

Fenomenul de antagonism este benefic atunci când se exercită vis-a-vis de posibila dezvoltare în substratul alimentar a unor microorganisme patogene – exemplu, antagonismul dintre bacteriile grupei lactice şi unele bacterii potenţial patogene sau patogene, mai mult sau mai puţin rezistente la tratamentul termic, precum *Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Yersinia enterocolitica* ş.a. (3, 10).

Fenomenul de antagonism este unul important inclusiv prin prisma relaţiilor care se stabilesc ulterior între microorganismele culturii starter (în special cu streptococii lactici) şi unele microorganisme de poluare care acţionează prioritar asupra substratului alimentar, deteriorându-l (bacterii din genul *Achromobacter, Pseudomonas,* enterococi etc.).

Din aceste raţiuni, încărcătura cu microorganisme a smântânii pasteurizate apare ca un element definitoriu pentru calitatea acesteia, dar care poate influenţa şi calitatea produsului finit (8,

12, 14). Reamintim în acest context că unele dintre defectele produsului finit sunt consecinţa directă a pasteurizării necorespunzătoare a smântânii sau a încărcăturii microbiene importante a smântânii materie primă (1, 5, 8, 11, 12, 14).

În condiţiile tehnologice şi igienice oferite de unele unităţi de procesare din ţara noastră nu trebuie neglijat nici fenomenul de recontaminare a smântânii după pasteurizare. Microorganismele recontaminante găsesc condiţii propice multiplicării deoarece substratul alimentar tratat termic suferă unele modificări, convenabile multiplicării microbiene, iar concurenţa microbiană este mult redusă.

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul de lucru a fost reprezentat de 228 probe smântână, probe recoltate de pe fluxul tehnologic, la care s-a determinat numărul total de bacterii aerobe mezofile. Metoda de determinare are ca principiu înglobarea unei anumite cantităţi din proba de cercetat într-un mediu nutritiv solid adecvat, în plăci Petri, urmată de incubarea la temperatura de 35^0C, timp de 48 de ore şi numărarea coloniilor care se dezvoltă (2, 4).

Pentru determinarea numărului total de bacterii aerobe mezofile s-a utilizat metoda diluţiilor seriate. Investigaţiile s-au efectuat la un număr total de 228 probe smântână dulce. Probele au fost recoltate din unităţi de procesare de pe raza judeţului Galaţi, în perioada anilor 2004, 2005 şi 2006.

Interpretarea rezultatelor obţinute s-a făcut în conformitate cu Ordinul M. S. nr. 975/1998, normă care admite pentru smântâna dulce un număr total de maximum 100.000 bacterii aerobe mezofile/ml.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza rezultatelor înregistrate, privind numărul total de bacterii aerobe mezofile determinate, din cele 228 probe de smântână materie primă după pasteurizare, au rezultat următoarele:

*** În anul 2004,** din 68 de probe investigate nu s-au înregistrat valori ale NTG/ml care să depăşească limita maximă admisă pentru acest parametru. Nivelul încărcăturii cu microorganisme aerobe mezofile s-a situat între 10^3 şi 5 x 10^4 /ml.

Rezultatele obţinute la cele 68 de probe investigate pentru NTG/ml, pot fi prezentate după nivelul de decelare astfel:

- la 18 probe (26,47%), nivelul NTG/ml a fost < 10^4 /ml;
- la 16 probe (23,53%), nivelul NTG/ml a fost între 1,1 x 10^4 – 2 x 10^4 /ml;
- la 20 probe (29,41%), nivelul NTG/ml a fost între 2,1 x 10^4 – 3 x 10^4 /ml;
- la 9 probe (13,23%), nivelul NTG/ml a fost între 3,1 x 10^4 – 4 x 10^4 /ml;
- la 5 probe (7,35%), nivelul NTG/ml a fost între 4,1 x 10^4 – 5 x 10^4 /ml.

Limitele de variaţie ale bacteriilor aerobe mezofile s-au situat între 6.000 şi 48.000 UFC/ml, cu o medie de 28.500 UFC/ml.

*** În anul 2005,** din 74 probe investigate, nu s-au înregistrat valori ale NTG/ml care să depăşească limita maximă admisă pentru acest parametru. Nivelul NTG/ml s-a situat între 10^4 şi 5 x 10^4 /ml. Rezultatele obţinute la cele 74 de probe investigate pentru NTG/ml, pot fi încadrate după nivelul încărcăturii microbiene astfel:

- la 24 probe (32,43%), nivelul NTG/ml a fost < 10^4 /ml;
- la 22 probe (29,73%), nivelul NTG/ml a fost între 1,1 x 10^4 – 2 x 10^4 /ml;
- la 19 probe (25,68%), nivelul NTG/ml a fost între 2,1 x 10^4 – 3 x 10^4 /ml;
- la 7 probe (9,46%), nivelul NTG/ml a fost între 3,1 x 10^4 – 4 x 10^4 /ml;
- la 2 probe (2,70%), nivelul NTG/ml a fost între 4,1 x 10^4 – 5 x 10^4 /ml.

Limitele de variaţie ale bacteriilor aerobe mezofile s-au situat între 3.000 şi 49.000 UFC/ml, cu o medie de 13.000 UFC/ml.

*** În anul 2006,** din 86 probe investigate, nu s-au înregistrat valori ale NTG/ml care să depăşească limita maximă admisă pentru acest parametru. Limitele NTG/ml s-au situat între 10^4 şi 5 x 10^4 /ml. Încărcătura microbiană totală a probelor analizate a înregistrat următoarele valori:

- la 28 probe (32,56%), nivelul NTG/ml a fost < 10^4 /ml;
- la 30 probe (34,88%), nivelul NTG/ml a fost între 1,1 x 10^4 – 2 x 10^4 /ml;
- la 24 probe (27,91%), nivelul NTG/ml a fost între 2,1 x 10^4 – 3 x 10^4 /ml;
- la 3 probe (3,49%), nivelul NTG/ml a fost între 3,1 x 10^4 – 4 x 10^4 /ml;
- la o probă (1,16%), nivelul NTG/ml a fost între 4,1 x 10^4 – 5 x 10^4 /ml.

Limitele de variaţie ale bacteriilor aerobe mezofile s-au situat între 1.000 şi 43.000 UFC/ml, cu o medie de 12.500 UFC/ml.

Pe total perioadă se constată că din 228 probe de smântână pasteurizată, nu s-au înregistrat valori ale NTG/ml de bacterii aerobe mezofile care să depăşească limita admisă la acest parametru.

Rezultatele obţinute pe parcursul celor 3 ani de investigaţii au demonstrat că la nici una dintre cele 228 probe analizate, încărcătura totală cu bacterii aerobe mezofile nu a depăşit valoarea maximă admisă. Cele mai multe probe (70 probe, reprezentând 30,70%) au prezentat valori ale N.T.G. aerobi mezofili/ml < 10^4, în timp ce doar la 8 probe, reprezentând 3,51% s-au înregistrat valori cuprinse între 4,1 x 10^4 – 5 x 10^4 /ml.

CONCLUZII

Investigaţiile privind calitatea microbiologică a smântânii materie primă după pasteurizare au evidenţiat următoarele aspecte:

* în anul 2004, din 68 probe analizate, limitele de variaţie s-au situat între 6.000 şi 48.000 UFC/ml, cu o medie de 28.500 UFC/ml;

* în anul 2005, din 74 probe analizate, limitele de variaţie s-au situat între 3.000 şi 49.000 UFC/ml, cu o medie de 13.000 UFC/ml;

* în anul 2006, din 86 probe analizate, limitele de variaţie s-au situat între 1.000 şi 48.000 UFC/ml, cu o medie de 12.500 UFC/ml.

Pe toată perioadă investigată s-a constatat că probele de smântână dulce pasteurizată nu depăşesc limita maximă admisă de 100.000 bacterii aerobe mezofile/ml, limită stabilită prin normativele în vigoare.

Ca urmare a aplicării bunelor practici de igienă şi a sistemului HACCP pe fluxul tehnologic de procesare, în diferite unităţi de pe raza judeţului Galaţi, se constată în perioada investigată o descreştere a valorii medii la parametrul NTG/ml, de la 28.500 în anul 2004, la 12.500 în anul 2006.

BIBLIOGRAFIE

1. BANU C., VIZIREANU CAMELIA, 1998 – Procesarea industrială a laptelui. Ed. Tehnică, Bucureşti.
2. BĂRZOI D., LĂZĂRESCU SANDA, MAIER NATALIA, TULUŞ LIDIA, KORN R., NUCĂ OLGA, DUMITRESCU F., 1978 – Metode microbiologice pentru examenul de laborator al produselor de origine animală. Ministerul Agriculturii şi Industriei Alimentare, I.P.B.T., Bucureşti.
3. BĂRZOI D., APOSTU S., 2002 – Microbiologia produselor alimentare. Ed. Risoprint Cluj-Napoca.
4. BONDOC I., ŞINDILAR E. V., 2002 – Controlul sanitar veterinar al calităţii şi salubrităţii alimentelor. Vol. I. Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
5. BONDOC I., 2007 – Tehnologia şi controlul calităţii laptelui şi produselor lactate. Vol. I. Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
6. EECKHOUTTE M., 1996 – Technologie et Inspection du lait et des produits laitiers, 2 ème édition. École Nationale Vétérinare de Toulouse, Chaire d'H.I.D.A.O.A.
7. GEORGESCU GH. şi col., 2000 – Laptele şi produsele lactate. Ed. Ceres, Bucureşti.
8. GEORGESCU GH., MILITARU ELENA, 2003 – Analiza laptelui şi a produselor lactate. Ed. Ceres, Bucureşti.
9. Gilmore T., Shell J., 1993 – Dairy Equipment and Supplies. In: Dairy Science and Technology Handbook, Volume 3: Applications Science, Technology, and Engineering (HUY Y.H. – editor), pag. 155-294. VCH Publishers, Inc., New York.
10. ROGGI CARLA, TURCONI GIOVANNA, 2003 – Igiene degli alimenti e nutrizione umana. La sicurezza alimentare. Prima edizione. Ed. Medische Scientifiche Internazionali, Roma.
11. ROTARU O., MIHAIU M., 2001 – Igiena veterinară a produselor alimentare. Vol. II. Ed. Risoprint, Cluj-Napoca.
12. SAVU C., PETCU CARMEN, 2008 – Igiena şi controlul produselor de origine animală. Ed. Semne, Bucureşti.
13. SPREER E., MIXA A., 1998 – Milk and Dairy Product Technology. Marcel Dekker, Inc., New York.
14. ŞINDILAR E., 2000 – Controlul igienic al produselor şi subproduselor de origine animală. Vol. 2. Ed. I.N.R.C.S., Iaşi.
15. Wilcox G., 1971 – Milk, cream and butter technology. Park Ridge, New Jersey.

STUDII COMPARATIVE PRIVIND CALITATEA GLOBALĂ A UNTULUI DIN PRODUCŢIA INTERNĂ ŞI A CELUI DIN IMPORT

COMPARATIVE STUDIES THE GLOBAL QUALITY OF INDIGENOUS AND IMPORTED BUTTER

Tatiana DOBOŞ, Ionel BONDOC[2], Eusebie ŞINDILAR[2]
Direcţia Sanitară Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor, Galaţi
dobos-galati@ansv.ro si tatianadobos@yahoo.com
[2]Facultatea de Medicină Veterinară Iaşi

Butter is one of the dairy products that are most appreciated by European consumers. Given such conditions, the global quality of the product requires a special interest. Complex analyses of imported and indigenous butter proved that the different sorts of butter distributed on the national market are adequate to the standards. The non-adequate samples do not exceed 3% and are defined especially by several physico-chemical parameters of freshness and quality.

Key words: butter, global quality, freshness, physico-chemical indicators

Untul constituie unul dintre produsele lactate cele mai apreciate de către consumatorii europeni, inclusiv de către consumatorii din ţara noastră. Acest fapt este evidenţiat de creşterea producţiei europene de unt şi mai ales, de atenţia acordată de către Comisia Europeană, vis-a-vis de stabilirea cotelor şi de subvenţionarea sectorului laptelui şi produselor lactate. Astfel, conform datelor publicate de Institutul Naţional de Statistică, producţia de unt în luna decembrie 2008, a fost mai mare cu 135 tone faţă de producţia lunii decembrie a anului 2007, creşterea fiind de 16,3%. La nivelul întregului an 2008, producţia de unt a crescut cu 268 tone, ceea ce înseamnă o creştere medie a producţiei de 3,3%, comparativ cu producţia obţinută în anul 2007 (15).

Untul a constituit şi constituie încă un aliment a cărui pondere în cadrul importurilor şi actualmente, în cadrul schimburilor intracomunitare, este relativ însemnată. În asemenea condiţii, calitatea globală a produsului prezintă un interes deosebit. Din punct de vedere structural, prin analogie cu laptele, untul poate fi definit ca o fază inversă a laptelui, respectiv o emulsie de tipul A/U (1, 3, 4, 5, 9, 11, 12). Faza continuă este reprezentată de grăsime în proporţii variabile, în funcţie de tipul de unt, iar faza dispersă este formată din apă şi substanţă uscată negrasă.

Tipurile de unt fabricate în ţara noastră şi în alte ţări se diferenţiază între ele mai ales prin caracteristicile senzoriale şi compoziţia chimică, toţi aceşti indicatori fiind de fapt, determinaţi în principal de natura materiei prime şi de procedeul de fabricaţie (1, 7, 10, 13).

Ca produs de transformare avansată a grăsimilor laptelui, untul prezintă importanţă din punct de vedere nutriţional, energetic, dar şi dietetic (1, 3, 5, 10, 13). Proprietăţile produsului sunt influenţate de o multitudine de factori, iar aprecierea stării de prospeţime, a celei igienice şi a salubrităţii se realizează prin examene complexe de laborator (2, 4, 6, 8, 14).

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul de lucru a fost reprezentat de 2384 probe de unt, provenit fie din producţia internă, fie din import. Menţionăm că analizele au fost efectuate în decursul a 3 ani, în perioada 2004 – 2006, perioadă caracterizată prin schimbări profunde ale industriei procesatoare din ţara noastră şi prin importuri masive ale acestui produs lactat.

Menţionăm de asemenea că datorită condiţiilor de lucru şi a unor impedimente de natură materială şi tehnică, examenele privind calitatea globală, starea de prospeţime şi salubritatea, au fost efectuate pe loturi din acest produs, constituite după cum urmează:

452 probe au fost supuse examenelor privind starea de prospeţime; 464 probe au fost examinate pentru aprecierea calităţii globale; 777 probe au fost examinate sub raportul detectării reziduurilor de pesticide organofosforice şi organoclorurate; 424 probe au constituit materialul de lucru pentru determinarea unor categorii particulare de contaminanţi (metale grele şi arsen), iar 267 probe au constituit materialul de lucru pentru determinarea radioactivităţii.

Pentru examinarea materialului prezentat s-au utilizat metodele de analiză de referinţă, neacreditate, acreditate sau în curs de acreditare. Practic, pentru fiecare lot de probe prezentat anterior, s-au determinat următoarele:

►Principalii parametri care concură la stabilirea calităţii globale a produsului, respectiv: grăsime, apă şi substanţa uscată negrasă;

►Principalii parametri ai stării de prospeţime, respectiv: aciditatea, indicele de peroxid şi aldehida epihidrinică;

►Eficienţa procesului de pasteurizare a smântânii materie primă, prin cercetarea prezenţei lactoperoxidazei;

►Reziduurile de pesticide organoclorurate şi organofosforice;

►Reziduurile de metale grele, arsen şi radionuclizii.

Determinarea acestor parametri s-a realizat prin metodele standard, utilizate şi în prezent în cadrul laboratoarelor sanitar-veterinare de stat judeţene şi a Municipiului Bucureşti.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma investigaţiilor fizico-chimice privind prospeţimea şi calitatea globală a probelor de unt analizate, s-au constatat următoarele aspecte:

► Indicatorii privind starea de prospeţime (aciditatea, indicele de peroxid şi aldehida epihidrinică) s-au cercetat pe un număr total de 452 probe, dintre care 242 probe unt din producţia internă şi 210 probe provenite din import. În urma investigaţiilor s-a constatat că toate probele cercetate au corespuns normei STAS 6352/4-85, astfel: la untul din producţia internă, din 242 probe investigate, 237 (97,93%) au prezentat valori ale acidităţii mai mici de 2° de aciditate, restul de 5 probe (2,07%), prezentând valori ale acidităţii mai mici de 2,8° aciditate. În ceea ce priveşte probele de unt din import, aciditatea la toate cele 210 probe examinate s-a situat sub valoarea de 2° de aciditate.

Indicele de peroxid, unul dintre cei mai importanţi indicatori ai stării de prospeţime, a fost cercetat la aceleaşi probe: în urma acestei investigaţii, s-a constatat că toate probele cercetate au înregistrat valori mai mici de 0,1 g iod la 100 g unt.

Examenele calitative pentru evidenţierea aldehidei epihidrinice au furnizat rezultate negative la toate probele examinate.

►Examenul calitativ pentru aprecierea eficienţei pasteurizării materiei prime a demonstrat că acest proces a fost realizat corespunzător (proba lactoperoxidazei a fost negativă la toate probele analizate).

►Examenele pentru aprecierea calităţii globale au vizat determinarea principalelor elemente constituente, respectiv grăsimea, apa şi substanţa uscată negrasă. În urma investigaţiilor efectuate pe un număr total de 464 probe, s-au constatat următoarele aspecte:

Grăsimea s-a cercetat pe 254 probe de unt autohton şi pe 210 probe de unt din import. În urma investigaţiilor s-a constatat că la sortimentele de unt extra şi superior din import cercetate, nu s-au încadrat în norma STAS 2 probe (0,95%) având o grăsime **<**83% şi respectiv <80%. Determinarea grăsimii la untul din producţia internă a evidenţiat următoarele aspecte: din totalul probelor examinate, 9 probe, reprezentând 3,54%, s-au dovedit a fi neconforme, apreciate prin prisma acestui parametru. Repartiţia celor 9 probe neconforme a fost următoarea: unt extra 3 probe (1,18%), cu un conţinut de grăsime **<**83%; unt superior 2 probe (0,79%) cu un conţinut de grăsime **<**80% şi 4 probe (1,57%) unt calitatea a-II-a cu grăsimea **<**65%.

Apa a fost cercetată la aceleaşi probe, respectiv 254 probe de unt autohton şi 210 probe unt din import. În urma investigaţiilor s-a constatat că la sortimentul de unt extra cercetat, 3 probe (1,18%) de unt autohton şi 2 probe (0,95%) unt din import, au depăşit limita maximă de 17% apă; la untul superior cercetat, 2 probe (0,79%) de unt autohton şi 2 probe (0,95%) de unt din import, au depăşit limita maximă de 20% apă, iar la untul calitatea a-II-a, 4 probe, toate provenite din producţia internă, (1,57%) au depăşit limita maximă admisă de 35% apă.

Substanţa uscată negrasă s-a încadrat în majoritatea cazurilor în limita maximă admisă a fiecărui sortiment, înregistrându-se şi câteva excepţii. La sortimentele de unt extra şi superior din import, nu s-au încadrat în norma STAS 2 probe (0,95%), iar la untul autohton 9 probe, cu următoarea repartiţie: unt extra 3 probe (1,18%), unt superior 2 probe (0,79%) şi 4 probe (1,57%) unt de masă tip B.

►Reziduurile de pesticide organoclorurate şi organofosforice au fost cercetate prin metoda gazcromatografică la un număr total de 777 probe. Dintre cele 777 probe, la 377 s-a procedat la determinarea pesticidelor organoclorurate, iar la 400 probe au fost determinate pesticidele organofosforice.

În urma investigaţiilor efectuate nu au fost constatate depăşiri ale limitei maxime de detecţie, de 0,01 ppm.

►Contaminanţii de tipul metalelor grele *(*plumb, cupru, cadmiu, zinc, mercur) şi arsenul au fost cercetaţi la 424 probe, din care 224 probe de unt autohton şi 200 probe de unt din import. Cercetările efectuate nu au evidenţiat depăşiri ale valorilor maxime admise pentru fiecare dintre elementele menţionate.

►Radionuclizii (ca sumă de izomeri ai Cs^{134} şi Cs^{137}) au fost cercetaţi pe un număr total de 267 probe de unt autohton şi din import. În perioada în care s-au realizat investigaţiile, toate probele cercetate au prezentat valori sub limita maximă admisă de 370 Bq/kg.

CONCLUZII

1. Analizele complexe efectuate pe un număr de 2384 probe de unt, provenit din producţia internă şi din import au evidenţiat o proporţie redusă a probelor neconforme, proporţie care se situează sub 1,5%.

2. Probele de unt analizate au prezentat un grad de prospeţime corespunzător, apreciat prin prisma celor 3 indicatori fizico-chimici esenţiali: aciditate, indice de peroxid şi prezenţa aldehidei epihidrinice.

3. Probele de unt neconforme sub raportul calităţii globale au deţinut o pondere medie de 2,37% privind conţinutul de grăsime şi substanţa uscată negrasă şi 2,80% privind conţinutul de apă.

4. Probele neconforme predomină la untul provenit din producţia internă, faţă de cel din import.

5. Toate probele examinate au corespuns din punct de vedere al prezenţei reziduurilor de pesticide organoclorurate şi organofosforice şi al contaminanţilor de tipul metalelor grele şi al arsenului.

6. Determinarea radionuclizilor nu a evidenţiat depăşiri ale valorilor maxime admise ale acestora pentru unt.

7. În ansamblul lor, examenele efectuate au demonstrat că untul destinat consumului public apare ca un produs relativ sigur, cel puţin sub raportul unor pericole de natură fizico-chimică.

BLIOGRAFIE

1. **BANU C., VIZIREANU CAMELIA, 1998 –** *Procesarea industrială a laptelui.* Ed. Tehnică, Bucureşti.
2. **BONDOC I., ŞINDILAR E. V., 2002 –** *Controlul sanitar veterinar al calităţii şi salubrităţii alimentelor. Vol. I.* Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
3. **BONDOC I., 2007 –** *Tehnologia şi controlul calităţii laptelui şi produselor lactate.* Vol. I. Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
4. **EECKHOUTTE M., 1996 –** *Technologie et Inspection du lait et des produits laitiers, 2 ème édition.* École Nationale Vétérinare de Toulouse, Chaire d'H.I.D.A.O.A.
5. **GEORGESCU GH. şi col., 2000** – *Laptele şi produsele lactate.* Ed. Ceres, Bucureşti.
6. **GEORGESCU GH., MILITARU ELENA, 2003 –** *Analiza laptelui şi a produselor lactate.* Ed. Ceres, Bucureşti.
7. **GILMORE T., SHELL J., 1993** – Dairy Equipment and Supplies. *In: Dairy Science and Technology Handbook, Volume 3: Applications Science, Technology, and Engineering* (**HUY Y.H. – editor**), pag. 155-294. VCH Publishers, Inc., New York.
8. **POPESCU N., POPA G., STĂNESCU V., 1986** – Determinări fizico-chimice de laborator pentru produsele alimentare de origine animală. Ed. Ceres, Bucureşti.
9. **ROTARU O., MIHAIU M., 2001** – *Igiena veterinară a produselor alimentare.* Vol. II. Ed. Risoprint, Cluj-Napoca.
10. **SPREER E., MIXA A., 1998** – *Milk and Dairy Product Technology.* Marcel Dekker, Inc., New York.
11. **ŞINDILAR E., 2000 –** *Controlul igienic al produselor şi subproduselor de origine animală. Vol. 2.* Ed. I.N.R.C.S., Iaşi.
12. **ȚIBULCĂ D., JIMBOREAN MIRELA ANAMARIA, 2008 –** *Tehnologia de obținere a produselor lactate*. Ed. RISOPRINT, Cluj-Napoca.
13. **WILCOX G., 1971** – *Milk, cream and butter technology.* Park Ridge, New Jersey.
14. **Ordinul C.N.C.A.N. nr. 112/2002** pentru aprobarea Normelor privind alimentele și furajele contaminate radioactiv după un accident nuclear sau altă situație de urgență radiologică.
15. **Institutul Național de Statistică.** Comunicat de presă nr. 26 din 9 februarie 2009.

EFECTUL COMPARATIV AL SUPLIMENTĂRII HRANEI TINERETULUI PORCIN CU ANTIBIOTICE (*TIAMUTIN*) ŞI CELULAZE (*BIOZYM M 800*)

THE COMPARASION EFFECT OF FOOD SUPPLEMENT AT THE YOUTH SWINE WITH ANTIBIOTICS (TIAMUTIN) AND CELULLASE (BIOZYM M 800)

FALCA C.[1], ROSU M.[2]
[1]USAMVBT
[2]DSVSA Arad
cfalca@yahoo.com

The research made regarding the comparison effect of food supplement of youth swine with antibiotic and celullases shows that enzyme supplement BIOZYM M 800 led to the decrease of digestive disorders incidence at the youth swine between 65-95 days. On the entire experimental period the most decrease incidence of the digestive disorders was made at the BOZYME M 800 batch with 47,83% less than the control batch and with 15,79% at the batch supplied with TIAMUTIN. The administration of the two growth promoters went to a decrease of the number of total animals with 26,32% in the case of the batch which was supplied with TIAMUTIN and with 13, 16% at the batch supplied with BIOZYME M 800.

Keywords: antibiotic, celullase, youth swine

MATERIALE ŞI METODE

Experimentul s-a desfaşurat într-un complex de creştere industrială a porcinelor iar animalele incluse in test au fost obţinute în fermă, din mame F1 (Landrace x Marele Alb) şi vieri terminali (50 % Hampshire şi 50 % Petrain) transferaţi în hala de creştere la vârsta de 60 de zile.

Pentru efectuarea determinarilor au fost alcatuite trei loturi iar in cadrul loturilor au fost stabilite boxe de control a cate 20 de animale. Loturile luate în testare au fost:

- Lot martor - M (fără supliment nutritiv) - 439 de animale în compartiment
- Lot experimental - E 1 (cu antibiotic - *Tiamutin*) - 453 de animale în compartiment.
- Lot experimental - E 2 (cu enzimă - *Biozym M 800*) - 450 de animale în compartiment.

Loturile constituite au fost supuse aceloraşi condiţii de microclimat iar animalele au fost furajate identic cu excepţia suplimentului nutritiv care a fost adugat in cantitate de 150 g/tona de furaj la lotul E1 si în proporţie de 1‰ la lotul E 2. Pe parcursul perioade de testare au fost înregistrate toate cazurile tratate pentru tulburări digestive şi respiratorii dar şi mortalitatea din fiecare compartiment.

REZULTATE OBŢINUTE

Inregistrările au fost efectuate pe două etape a câte 30 de zile, respectiv, între cântăririle efectuate pentru determinarea sporului de masă corporală şi a sporului mediu zilnic (cântăriri efectuate la vârsta de 65, 95 şi 125 de zile). Rezultatele globale privind îmbolnăvirile şi mortalităţile sunt redate în tabelul 1 iar în tabelul 2 si figura 1 sunt prezentate sintetic rezultatele privind influenţa promotorilor adăugaţi, asupra incidenţei diareelor la animalele din loturile testate. Din datele obtinute se poat remarca următoarele aspecte:

în perioada 65-95 de zile, cea mai scăzută incidenţă a diareei s-a înregistrat la loturile E 2, la care furajul a fost suplimentat cu preparatul enzimatic *Biozym M 800.* Comparativ cu celelalte loturi

aflate în testare, frecvenţa diareei a fost mai mică cu 53,53 % comparativ cu lotul M şi cu 43,11 % comparativ cu lotul E 1. Valorile diferenţelor înregistrate la cele două loturi experimentale, comparativ cu lotul martor, sunt asigurate statistic.

în perioada 95-125 de zile, cea mai redusă incidenţă a diareei s-a înregistrat la lotul E 1, la care furajul a fost suplimentat cu antibiotic. Comparativ cu celelalte loturi aflate în testare, frecvenţa diareei la lotul E 1 a fost mai mică cu 47,86 % decât la lotul M şi cu 13,85 % comparativ cu lotul E 2.

pe parcursul întregii perioade experimentale (65-125 de zile), cea mai scăzută incidenţă a tulburărilor digestive a fost înregistrată la lotul E 2 la care furajul a fost suplimentat cu preparatul enzimatic *Biozym M 800*. Incidenţa diareei a fost mai scăzută cu 47,83 % comparativ cu lotul M şi cu 15,79 % comparativ cu lotul E 1, la care furajul a fost suplimentată cu antibiotic. Influenţa preparatului enzimatic *Biozym M 800* a fost mai importantă în perioada 65-95 de zile, când vârsta animalelelor a fost mai scăzută şi producţia enzimatică a tubului digestiv mai redusă. In perioada 95-125 de zile, efectul preparatului enzimatic s-a diminuat prin comparaţie cu efectul indus de antibioticul administrat lotului E 1.

Efectul antibioticului *Tiamutin* a fost relativ constant pe toată durata experimentului, diferenţa dintre numărul de animale înregistrate cu tulburări digestive în perioada 65-95 de zile fiind foarte apropiat de cel al animalelor îmbolnăvite în perioada 95-125 de zile. In acest caz se poate concluziona ca efectul antibioticului nu a fost influenţat de vârsta animalelor. Numărul de animale moarte în loturile aflate în testare a fost înregistrat diferenţiat (tabelul 4) în funcţie de diagnosticul stabilit în urma examenului necropsic, pe două categorii; animale moarte ca urmare a afecţiunilor digestive si animale moarte ca urmare a afecţiunilor sistemului respirator.

Din analiza datelor rezultate cu privire la numărul de animale moarte din loturile aflate în testare se pot evidenţia următoarele aspecte:

- ➔ în perioada 65-95 de zile cel mai mare număr de animale moarte ca urmare a tulburărilor digestive a fost înregistrat la lotul martor iar cel mai mic a fost înregistrat la lotul E 2, la care furajul a fost suplimentat cu enzime. Comparativ cu lotul E 1 la care furajul a fost suplimentat cu antibiotic, la lotul E 2, numărul de animale moarte din cauza tulburărilor digestive a fost mai mic cu 25 %.
- ➔ în perioada 95-125 de zile, cel mai mare număr de animale moarte ca urmare a tulburărilor digestive a fost înregistrat la lotul martor iar cel mai mic a fost înregistrat la lotul E 1, la care furajul a fost suplimentat cu *Tiamutin.* Comparativ cu lotul M, mortalitatea înregistrată la lotul E 2 a fost mai mică cu 15,43 % iar comparativ cu lotul E 1 a fost mai mare cu 43,2 %.
- ➔ pe întreaga perioadă de testare cea mai scăzută mortalitate datorată cauzelor digestive a fost înregistrată la lotul E 1. La lotul E 2 s-a înregistrat o mortalitate mai mare cu 13,1 % decât la E 1 şi cu 51, 2 % mai mică decât la lotul M.
- ➔ numărul de animale tarate înregistrat la loturile experimentale a fost; 28 animale la lotul E 1, 33 la lotul E 2 şi 38 animale la lotul M. Cel mai mic număr de animale tarate a fost înregistrat la lotul E 1, acesta a fost mai mic cu 26,32 % faţă de lotul M. La lotul E 2 numărul de animale tarate a fost cu 13,16 % mai mic decât la lotul M.

Tabelul 1

Situaţia îmbolnăvirilor şi a mortalităţii la animalele din loturile experimentale

Perioadă (zile)	U.M.	Lotul M				Lotul E 1				Lotul E 2			
		d	r	m		d	r	m		d	r	m	
				d	r			d	r			d	r
65-95	nr. de animale	313	490	12	3	264	322	4	1	150	160	3	9
95-125	nr. de animale	498	588	8	10	254	299	5	19	286	424	7	15
65-125	nr. de animale	811	998	20	13	518	551	9	20	436	584	10	24

d=digestiv; r=respirator; m=morţi

Tabelul 2

Incidenţa diareei la porcinele din loturile aflate în testare

Perioadă (zile)	Specificare	U.M.	Lotul M	Lotul E 1	Lotul E 2
65-95	număr de animale/lot	nr. de animale	439	453	450
	număr de animale tratate de diaree/lot	nr. de animale	313	264	150
	număr de tratamente/animal	%	0,71	0,58	0,33
95-125	număr de animale/lot	nr. de animale	424	448	438
	număr de animale tratate de diaree/lot	nr. de animale	498	254	286
	număr de tratamente/animal	%	1,17	0,56	0,65
65-125	număr de animale/lot	nr. de animale	439	453	450
	număr de animale tratate de diaree/lot	nr. de animale	811	518	436
	număr de tratamente/animal	%	1,84	1,14	0,96
65-125	E 1 si E 2 din M	%	100	61,95	52,17

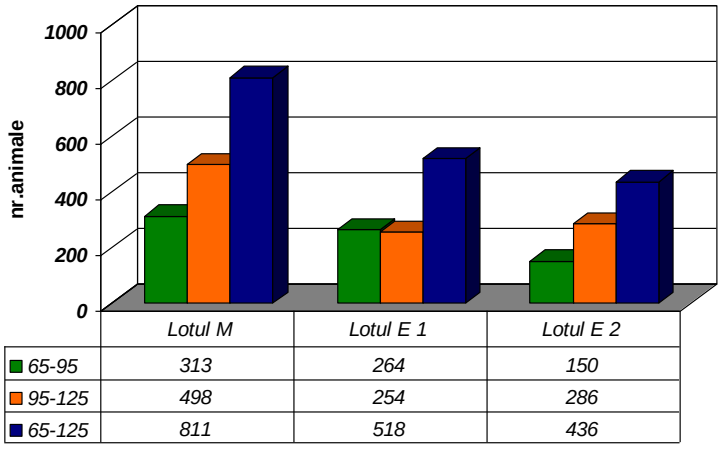


Fig. 1. Incidenţa diareei la porcinele din loturile aflate în testare

CONCLUZII

- Suplimentul enzimatic *Biozym M 800* a determinat o scădere a incidenței tulburărilor digestive, mai importantă în perioada 65-95 de zile, când vârsta animalelor a fost mai scăzută şi producţia de celulaze a tubului digestiv mai redusă.
- În perioada 95-125 de zile, la lotul la care furajul a fost suplimentat cu antibiotic s-a înregistrat cea mai scazută frecvență a tulburarilor digestive. La lotul suplimentat cu preparat enzimatic s-a înregistrat o frecvență a diareei cu 11,19 % mai mare decât lotul suplimentat cu antibiotic.
- Pe întreaga perioadă experimentală, cea mai scăzută incidență a tulburărilor digestive s-a înregistrat la lotul cu *Biozym M 800*, respectiv cu; 47,83 % mai mică decât la lotul martor şi cu 15,79 % mai mică comparativ cu lotul la care furajul a fost suplimentat cu *Tiamutin*.
- Administrarea celor doi promotori de creştere a dus la scăderea numărului de animale tarate cu; 26,32 % în cazul lotului la care furajul a fost suplimentat cu *Tiamutin* şi cu 13,16 % în cazul lotului furajat cu supliment enzimatic (*Biozym M 800*).

BIBLIOGRAFIE

1. Cromwell, G.L., 2000. Why and how antibiotics are used în swine production: in: Procedings of the Pork Industry Conference on Addressing Issue of Antibiotic Use în Livestock Production. Ed. L.B. Schook. Univ. Illinois, Urbana. 7-27.
2. Göransson, L., 1997. Alternatives to antibiotics – the influence of new feeding strategies for pig on biology and performance. In: Recent Advances in Animal Nutrition. Eds. P.C. Garnsworthy and J. Wiseman. Nottingham University Press, Nottingham, 45-56.
3. Inborr, J., Ogle, R.B., 1988. Effect of enzyme treatment of piglets feeds on performance and post weaning diarrhoea. Swedish J. Agric. Res. 18:129-133.

STUDIU ASUPRA FLOREI BACTERIENE IZOLATE DIN PLĂGI MIAZIGENE ŞI LARVE DE *WOHLFARTIA MAGNIFICA* IMPLICATE ÎN LEZIUNI

STUDY OF BACTERIAL FLORA ISOLATED FROM BLOWFLY WOUNDS AND *WOHLFARTIA MAGNIFICA LARVAE INVOLVED IN LESIONS*

FIT N., RAPUNTEAN GH., NADAS G., SUTEU E.
USAMV Cluj Napoca, Faculty of Veterinary Medicine
nfit@usamvcluj.ro

The researches regarding the bacterial flora from blowfly wounds considered 30 diseased and 15 healthy sheep from Bihor and Cluj counties farms. The exam of the bacterial flora from wounds of skin and genital blowfly compared to normal skin and genital areas flora was performed. The study on the bacterial flora from Wohlfartia magnifica larvae collected from the genital lesions was realized. The bacterial flora identified from the skin and genital wounds was represented by germs with pathogenic character but also conditioned pathogen bacteria. From the genital wounds 13 bacterial species were isolated, mostly E.coli (60%), A.pyogenes (44.6%), Prot.mirabilis (46.6%), B.cereus and Ps.aeruginosa (40%). From the skin lesions 15 species were isolated, most frequently E.coli (55.3%), A.pyogenes, B.subtilis and Ps.aeruginosa, these representing 40%. Healthy sheep micro flora was represented by 7 species, mostly E.coli (60%), Stf.epidermitis (46.6%), Str.viridans and Prot.vulgaris (40%) in the genital areas, while at the skin level E.coli (53.3%), Stf.epidermitis and Prot.vulgaris (40%). The bacterial flora associated to W.magnifica larvae was represented by 11 species, isolating Stf.epidermitis and Prot.vulgaris at the outside and Stf.epidermitis, M.luteus and B.subtilis at the inside.

Key words: blowfly wounds, bacterial flora, *Wohlfartia magnifica*

INTRODUCERE

Miaza cutanată şi genitală la ovine este produsă de larvele unor insecte din familiile *Caliphoridae* şi *Sarcophagidae*, care străbat pielea, ajung în ţesutul conjunctiv subcutanat, de unde se infiltrează printre masele musculare, producând eroziuni şi necroze multiple (Cosoroabă, 2000). Pe lângă acest efect de distrugere mecanic ele însămânţează, de-a lungul traiectelor parcurse, diferite bacterii piogene, necrozante cu efecte grave asupra gazdei (Şuteu şi Cozma, 2004).

La ovine se pot întâlni aspecte clinice de miază foarte variate, într-o turmă putându-se găsi numeroase cazuri cu una sau mai multe localizări, cu grade restrânse de extindere a leziunilor, până la leziuni inflamatorii grave, complicate cu suprainfecţii bacteriene şi stări septicemice (Fenton şi colab., 1998).

Insectele miazigene au o mare importanţă ca vectori şi gazde intermediare, datorită comportamentului lor. Microflora insectelor, în special cea externă, este mult influenţată calitativ şi cantitativ de mediul lor de viaţă. Această microfloră, foarte bogată ca număr şi varietate de specii, este transmisă parţial larvelor şi ouălor odată cu ponta (Toth şi colab, 2006).

Pornind de la aceste deziderate în lucrarea de faţă ne-am propus identificarea florei bacteriene din plăgile cu miază, comparativ cu flora cutanată de la ovine sănătoase, precum şi de pe suprafaţa larvelor implicate în leziuni.

MATERIALE SI METODE

Studiul florei bacteriene s-a efectuat pe 45 ovine din fermele Agrinstal Salonta, Gostat Carei, S.C.Baciu SRL cu vârsta cuprinsă între 6 luni şi 7 ani, femele şi masculi. S-au recoltat probe (exsudate) de la 30 animale cu miază din care: 15 probe de la berbeci cu miază prepuţială şi 15 probe de la ovine cu miază

cutanată. Probele au fost recoltate cu tampoane sterile din zona centrală a leziunilor. De la 15 ovine clinic sănătoase s-au recoltat 15 probe martor de la nivelul prepuțului şi 15 de la nivelul crupei. Probele recoltate au fost recoltate pentru identificarea florei bacteriene.

S-a efectuat totodată un studiu asupra florei bacteriene din larvele recoltate de la nivelul leziunilor. S-au recoltat astfel de la 12 berbeci cu miază prepuțială, de la periferia şi centrul leziunilor, în recipiente sterile, 40 larve bine dezvoltate. Larvele au fost ulterior transportate în cadrul laboratorului unde au fost identificate şi clasificate ca fiind de *Wohlfartia magnifica (W. magnifica)* stadiul III de dezvoltare. Izolarea florei bacteriene externe a larvelor s-a realizat prin spălări cu soluție fiziologică sterilă a larvelor. Lichidul de spălare a fost prelevat şi analizat în scopul identificării speciilor bacteriene.

Studirea florei bacteriene din interiorul larvelor s-a realizat după spălarea externă a aceloraşi larve cu ser fiziologic steril şi dezinfecție cu alcool 70%. Ulterior au fost introduse câte 5 larve în 10 ml de ser fiziologic steril şi mojarate până s-a obținut un macerat larvar. Numărul total de probe prelucrate sunt prezentate în tabelul 1:

Tabel 1 Probe de leziuni cutanate şi triturate larvare de W.magnifica prelucrate pentru examenul florei bacteriene

Tip de probă		Nr. probe	Ex. bacterioscopic	Ex. bacteriologic	Ex. caractere biochimice
Zona prepuț	Cu miază	15	15	15	15
	Fără miază(M)	15	15	15	15
Crupă	Cu miază	15	15	15	15
	Fără miază(M)	15	15	15	15
Larve de *W.magnifica*	Stadiul III	8 ext.	8	8	8
		8 int.	8	8	8
Total probe şi ex. efectuate		**68**	**68**	**68**	**68**

M-martor; ext-suprafața corpului; int-triturat de larve

Probele au fost prelucrate şi identificate după tehnicile de izolare a germenilor aerobi şi anaerobi recomandate de Quinn şi colab. (1994),

Pentru identificare s-au realizat examene bacterioscopice, bacteriologice pe medii uzuale şi speciale de identificare (SS-agar, mediul MacConkey,Chapmman), examene biochimice cu medii politrope (TSI, MIU, MILF,OF) precum şi microtestele API pentru anumite specii.

REZULTATE ŞI DISCUȚII

Examenul florei bacteriene din plăgi

Examenul microbiologic efectuat asupra exsudatelor prelevate din plăgi de la ovine cu miază a evidențiat prezența germenilor aparținând familiilor *Micrococcaceae, Streptococcaceaea, Bacillaceae, Enterobacteriaceae* şi *Pseudomonadaceae* precum şi genuri neâncadrate până la ora actuală în familii. Speciile bacteriene izolate din aceste exsudate au fost în număr de 15, majoritatea reprezentând germeni condiționat patogeni (Tabel 2, Fig 1,2,3,4,5,6).

*De la ovinele clinic sănătoase***,** din probele prelevate de la nivelul prepuțului şi a crupei, s-au izolat un număr mai mic de specii bacteriene. Microorganismele izolate au fost încadrate în familiile *Micrococcaceae, Streptococcaceae, Bacillaceae* şi *Enterobacteriaceae.* Numărul total de specii bacteriene la cele 30 de probe de la ovinele sănătoase au fost în număr de 7 (Tabel 3).

E.coli a fost specia cea mai frecvent izolată, 60% la nivelul prepuțului şi în 53.3% din probele de pe crupă. *Stf.epidermitis* s-a izolat în 46.6% din probele de la nivelul prepuțului şi în 40% din probele cutanate. *Proteus vulgaris* a fost izolat în 40% din probele de la prepuț şi crupă. *Str.viridans* a fost identificat în 40% din probele de la nivelul prepuțului şi în 33.3% din cele cutanate. *E.fecalis* a fost izolat în 33.3% la nivelul

prepuţului şi în 40% din probele de crupă. *B.subtilis* şi *Fusobacterium necrophorum* au fost izolate cu o frecvenţă de sub 33.3% din probele de la nivelul mucoasei prepuţiale şi din regiunea crupei.

Tabel 2 Flora bacteriană izolată din exsudatele prelevate din plăgile miazigene, la ovine

Specii bacteriene	Tipul de leziune			
	Prepuţială Nr. probe examinate =15		Crupă Nr. probe examinate =15	
	Probe pozitive		Probe pozitive	
	Nr.	%	Nr.	%
Stf. epidermitis	3	20	5	33.3
Stf. aureus	5	33.3	4	26.6
Str.pyogenes (grup A)	4	26.6	2	13.3
Str. viridans	5	33.3	5	33.3
Str. zooepidemicus	0	0	1	6.6
E. fecalis	0	0	4	26.6
A. pyogenes	7	46.6	6	40
B. cereus	6	40	6	40
B.subtilis	3	20	6	40
Cl. perfringens	4	26.6	1	6.6
E. coli	9	60	8	53.3
F.necrophorum	2	13.3	3	20
Ps.aeruginosa	6	40	6	40
Prot. vulgaris	4	26.6	3	20
Prot. mirabilis	7	46.6	6	40

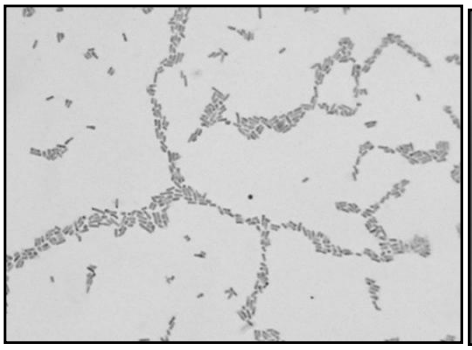


Fig.1. E. coli coloraţie Gram (1000x)

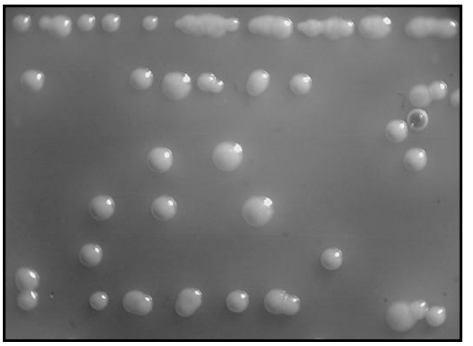


Fig.2. Colonii de E. coli pe Agar MacConkey

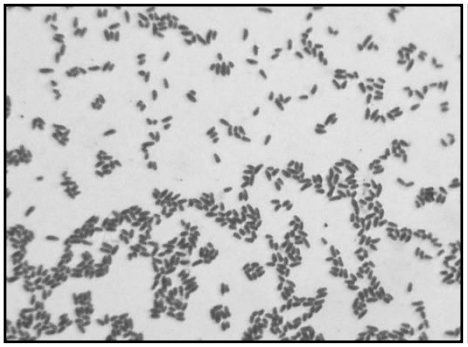


Fig.3. Arcanobacterium pyogenes coloraţie Gram (1000x)

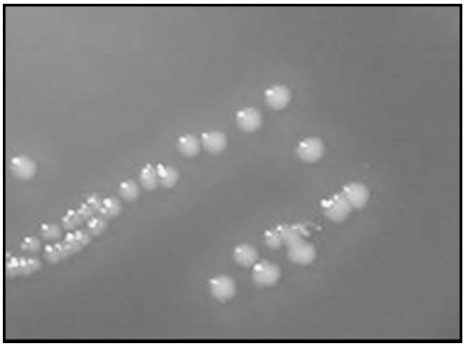


Fig.4. Arcanobacterium pyogenes colonii pe agar sânge

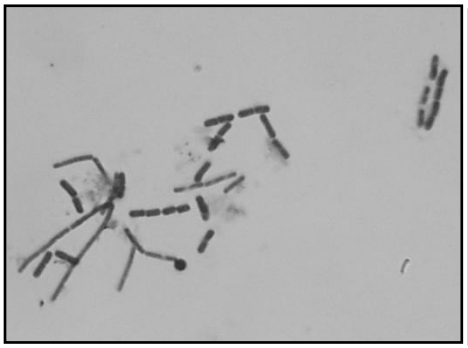


Fig.5. Bacillus cereus coloraţie Gram (1000x)

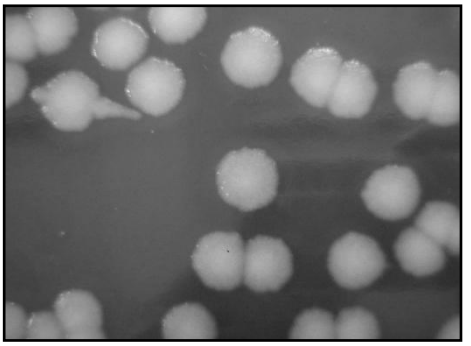


Fig.6. Bacillus cereus colonii pe agar sânge

Tabel 3 Flora bacteriană izolată din regiunile prepuţială şi crupă, de la ovinele clinic sănătoase

Specii bacteriene	Zonă examinată			
	Prepuţială Nr. probe examinate =15		Crupală Nr. probe examinate =15	
	Probe pozitive		Probe pozitive	
	Nr .	%	Nr.	%
Stf.epidermitis	7	46.6	6	40.0
Str.viridans	6	40.0	5	33.3
E.fecalis	5	33.3	6	40.0
B.subtilis	4	26.6	4	26.6
E.coli	9	60.0	8	53.3
F.necrophorum	5	33.3	3	20.0
P.vulgaris	6	40.0	6	40.0

Speciile bacteriene izolate din probele prelevate de la ovine sănătoase se încadrează în categoria bacteriilor condiţionat patogene.

În urma *examenelor microbiologice efectuate asupra florei bacteriene pe larvare de W.magnifica* s-a constatat că numărul speciilor bacteriene izolate de pe exteriorul larvelor este mai mic decât numărul speciilor bacteriene izolate din interiorul acestora.

S-au izolat 6 specii din probele cu flora externă dintre care *Stf.epidermitis* a reprezentat 75%, *Prot.vulgaris* 62,5%, *M.luteus, B.cereus, E.fecalis, şi E.coli* în proporţie de 37,5%. Flora internă a fost mai diversă, izolându-se în 50% din probe *Stf.epidermitis*, *M.luteus* şi *B.subtilis*, în 37,5% *Str.viridans, E.fecalis* şi *B.cereus*, în 25% din probe s-au izolat speciile *B.megaterium, Cl.pefringens, E.coli* şi *F.necrophorum* iar în 12,5% din probe s-a izolat *Prot.vulgaris*.

Cele 15 specii bacteriene izolate din leziunile de miază par să indice clar, în concordanţă cu alţi autori, că microflora normală a pielii, cea de contaminare din mediul ambiental şi din fecale poate fi incriminată în agravarea proceselor patologice (Ruiz-Martinez, 1990; Fischer şi colab., 2004: Fiţ, 2005).

Dintre speciile izolate din leziuni se pare că unele au rol în degradarea microbiologică a lânii şi în producerea de dermatite la ovine. Studii efectuate de către Colditz şi colab., (1994) demonstrează că ovinele sensibile la infecţiile cutanate cu *Ps.aeruginosa* sunt mai frecvent afectate de miază decât cele care sunt rezistente la infecţiile cu acest germen.

Izolarea acestor specii cu o frecvenţă crescută poate să indice implicarea acestora în favorizarea apariţiei miazei la acest nivel (Ruiz-Martinez, 1990). De asemenea prezenţa unor specii care nu au fost izolate din probele de la ovinele sănătoase, ca *Str.pyogenes, B.cereus, Cl.perfringens, Ps.aeruginosa, Prot.mirabilis,* chiar într-un procent mai mic, pot să aibă un rol în patogenitate prin producţia de metaboliţi cu rol distructiv şi totodată de atractanţi pentru insectele miazigene (Knoga şi colab., 2002; Fischer şi colab., 2004; Hald şi colab., 2004).

Flora bacteriană de la nivelul prepuţului berbecilor sănătoşi a fost cu o frecvenţă mult mai mică, faţa de probele cu miază, acest lucru relevă că numărul speciilor de bacterii izolate dintr-o probă fără leziuni a fost mult mai mic. Rezultatele obţinute de noi sunt conform studiilor din acest domeniu efectuate de alţi autori. Ruiz-Martinez (1990) într-un studiu asupra florei microbiene la ovinele cu miază genitală şi fără, a izolat în total 27 de specii bacteriene din leziunile cu miază şi 8 specii de la ovinele fără miază. Speciile care au fost izolate cu o frecvenţă mai mare din plăgile cu miază au fost *E.coli* (45%)*, S.enterococcus* (35%)*, F.necrophorum* (24%)*, B.fragilis* (20%)*, F.nucleorum* (10%) *şi Str.hemoliticus* (8,8%). Bacteriile izolate mai frecvent de la ovinele fără miază au fost aceleaşi, mai puţin *Str.hemoliticus* care a fost izolat dar cu o frecvenţă mai mică în probele de miază. Acest lucru a făcut ca autorul să considere cele 5 specii *E.coli, S.enterococcus, F.necrophorum, B.fragilis* şi *F.nucleorum* ca fiind flora normală a acestei regiuni.

Se poate afirma că o parte din această floră izolată din leziunile de miază este transportată de insectele miazigene în momentul ovopoziţiei precum şi odată cu pătrunderea larvelor în leziuni.

Microflora asociată cu stadiul III larvar de *W.magnifica* a fost reprezentată de 6 specii bacteriene, izolate de pe exteriorul larvelor. Flora bacteriană internă a fost mai variată, izolându-se un număr total de 11 specii, cu o frecvenţă mai mare a speciilor *Stf.epidermitis*, *M.luteus* şi *B.subtilis*, celelalte specii au avut o frecvenţă medie a izolării sub 50%.

În mod normal larvele prin activitatea lor de nutriţie produc o contaminare cu microfloră proprie a conductului parazitar unde se dezvoltă. În acelaşi timp, după cum se poate bănui şi din rezultatele acestui studiu, la rândul lor larvele se contaminează cu microorganisme de la nivelul nişei ecologice de unde se dezvoltă. Diferenţierea dintre speciile bacteriene specifice larvelor şi cele care au fost preluate de la nivelul organelor genitale este dificil de realizat.

Prezenţa florei de la nivelul nişei ecologice, precum şi a florei specifice larvelor de diptere miazigene, contribuie la dezvoltarea leziunilor cu producerea de secreţii fetide caracteristice care se pare că au rol atractant pentru insectele pregătite pentru pontă (Hard şi colab., 2004).

CONCLUZII

- Flora bacteriană izolată din exsudatele prelevate din plăgile cutanate şi genitale a fost reprezentată de bacterii cu potențial patogen (*Stf. Aureus, Str.pyogenes, A. pyogenes, Ps.aeruginosa*) şi bacterii condiționat patogene (*Stf.epidermitis, Str.viridans, Str.zooepidemicus, E.fecalis, B.cereus, B.subtilis, Cl.perfringens, E.coli, F.necrophorum, Prot.vulgaris, Prot.mirabilis*. Din probele genitale s-au izolat 13 specii bacteriene cu o frecvență mai mare a speciilor *E.coli* (60%), *A.pyogenes* (44.6%), *Prot.mirabilis* (46.6%), *B.cereus* şi *Ps.aeruginosa* (40%). Din probele cutanate s-au izolat 15 specii ,mai frecvent *E.coli* (55.3%), *A.pyogenes, B.subtilis* şi *Ps.aeruginosa*, toate în 40%.
- De la animalele clinic sănătoase s-au izolat 7 specii bacteriene de pe piele şi de la nivel genital. În probele genitale au predominat speciile *E.coli* (60%), *Stf.epidermitis* (46.6%), *Str.viridans* şi *Prot.vulgaris* (40%) iar în cele de pe piele, *E.coli* (53.3%), *Stf.epidermitis* şi *Prot.vulgaris* (40%).
- Flora bacteriană asociată cu larvele de *W.magnifica* a fost reprezentată de 11 specii. Speciile bacteriene izolate de pe cuticula larvelor au fost în număr de 6, izolându-se mai frecvent *Stf.epidermitis şi Prot.vulgaris.* Flora din mojarat larvar a fost reprezentată de 11 specii izolându-se mai frecvent *Stf.epidermitis*, *M.luteus* şi *B.subtilis.*

BIBLIOGRAFIE

1. Colditz I.G., Lax J., Mortimer S.I., Clarke R.A., Beh K.J.– Cellular inflammatory responses in skin of sheep selected for resistance or susceptibility to fleece rot and fly strike. Parasite Immunology, 16 (6), 289-296, 1994.
2. Cosoroabă I.– Parazitologie veterinară. Edit. Mirton, Timişoara, 2000.
3. Fenton A., Woll R., French N. – The incidence of sheep strike by Lucilia sericata on sheep forms in Britain: a simulation model. Veterinary Parasitology 76(3), 211-228, 1998.
4. Fischer O., Matlova L., Dvorska L., Svastova P., Bartl J., Melicharek I., Weston R., Pavlik I. – Dipter as vector of mycobacterial infections in cattle and pigs. Medical and Veterinary Entomology 15(2): 208-211, 2001.
5. Fischer O.A., Matlova L., Dvorska L., Svastova P., Bartl J., Weston R.T., Pavlik I.– Blowflies Calliphora vicina and Lucilia sericata as a passive vectors of Mycobacterium avium subsp. Avium M.a. paratuberculosis and M.a. hominisuis. Medical and Veterinary Entomology, 18(2) 116-122, 2004.
6. Fiț N., Gh. Răpuntean, G. Nadăş, Cosmina Cuc - The calitative and cantitative study on bacterian flora izolated from the Wohlfahtia magnifica larvae, Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Nr. 62, 2005.
7. Hald B., Skovgard H., Dang Duong Bang, Pedersen K., Dybdahl J., Jespersen J.B., Madsen M.– Flies and Campylobacter infection of broiler flocks. Emerging Infectious Diseases, 10 (8), 1490-1492, Atlanta, USA, 2004.
8. Khoga J.M., Toth E., Marialigeti K., Borossay J. – Fly-attracting volatiles produced by Rhodoccus fascians and Mycobacterium aurum isolated from myiatic lesions of sheep, Journal of Microbiological Methods, 48(2/3) 281-287, Oxford, UK, 2002.
9. Quinn P., Carter M.E., Markey B., Carter G.R., Clinical veterinary Micribiology. Edit. Wolfe , 1994.
10. Ruiz Martinez I.– Tesina de doctorado, Universidad de Granada Espana, 1990.
11. Şuteu I., Cozma V. – Parazitologie clinică veterinară. Vol. II, Edit. Risoprint, Cluj-Napoca, 2004.
12. Toth E.M., Hell E., Kovacs G., Borsodi AK., Marialigeti K– Bacteria isolated from the different developmental stages and larval organs of the obligate parasitic fly. Wohlfartia magnifica (Diptera, Sarcophagidae). Microb. Ecol., 51(1), 13-21, Epub, 2006.

STUDIU BIBLIOGRAFIC PRIVIND TOXIINFECŢIILE ALIMENTARE PRIN CONSUMUL DE ALIMENTE DE ORIGINE ANIMALĂ CONTAMINATE CU *SHIGELLA SPP*.

FOOD POISONING DUE TO THE CONSUMPTION OF SALAMI AND SAUSAGES CONTAMINATED WITH *SHIGELLA SPP*.

FOICA F. M.[1],. CARP CARARE M.[2], VLAD – SABIE ALINA[2], DRUGOCIU DANA SIMONA[3]
[1]Colegiul A.I.A. Ţara Bârsei Prejmer – Braşov,
[2]FMV Iaşi,
[3]FMV Bucureşti
dr_mikeflavius@yahoo.com

Shigellosis is an intestinal disorder produced by an endobacteria belonging to the Shigella genus from the family Enterobacteriaceae, whose symptoms are abdominal cramps and pains, with frequent blood and mucoid stools. Shigella contamination is due to unhygienic maipulation of food before its consumption, as a result of human presence. Clinical evolution is characterised by the small amount of feces, frequent and sanguinolent diarrhea, covered in mucus, with many inflammation cells, accompanied by cramps, tenesmus, and including rectal prolapse.

Antibiotic treatment in the acute phase of the disorder significantly reduces the excretory capacity of patients. Most of the Shigella spp. strains isolated from food proved to be sensitive to a large number of antibacterial substances, the significant fact being that the isolated strains are 100% gentamicin-sensitive, and they presented the strongest resistence to penicillin, penicillin, spectinomycin, streptomycin, eritromicin and cefalexin.

Key words: *Shigella*, food poisoning.

Încă din antichitate sigheloza a fost semnalată ca boală intestinală, Hipocrate descriind-o ca pe o boală caracterizată prin crampe şi dureri abdominale şi frecvente scaune cu sânge şi mucus**. (Jay M.J. 1988 cit. de Bărzoi 1999)**.

Doza infectantă redusă a făcut ca transmiterea indirectă să fie deosebit de activă în situaţii de igienă precară, fiind redusă ca incidenţă în ţările avansate economic, spre deosebire de ţările sub-dezvoltate unde shigeloza persistă la un nivel endemo-epidemic. **(Bărzoi 1999).**

Statisticile medicale la nivel mondial evidenţiază, în mod constant numărul mare şi în continuă creştere al îmbolnăvirilor de origine alimentară având ca etiologie germeni din genul *Shigella spp*.

Este evident faptul că infecţiile cu *Shigella* au devenit un pericol major pentru sănătatea publică, pentru care diagnosticul şi eficienţa mijloacelor de profilaxie specifică şi nespecifică cunoscute se dovedesc a fi încă nesatisfăcătoare. **(Enache 2005).**

Se estimează că numărul îmbolnăvirilor de toxiinfecţie alimentară determinate de *Sigella spp.* ar fi de 6,5-8 milioane anual. Rata reală a morbidităţii şi mortalităţii prin toxiinfecţii sigelozice în fapt mult mai înaltă decât cea raportată, în continuă creştere în întreaga lume este un serios motiv de îngrijorare pentru sănătatea publică.

În 1888, Chatemesse şi Widal au raportat izolarea aceleiaşi bacterii de la 5 cazuri de dizenterie, iar Grigorieff în Rusia a izolat culturi de la 11 bolnavi cu aceleaşi fenomene clinice dizenteriforme. **Shiga** în 1898 şi **Flexner** în 1900 descriu un bacil scurt drept cauză a dizenteriei.

Dizenteria bacilară este larg răspândită fiind una din cauzele etiologice comune ale bolii diareice în toată lumea. Incidenţa ei este mai ridicată în ţările în curs de dezvoltare, în zonele cu climă caldă. Morbiditatea reală nu este însă cunoscută datorită numărului mare de cazuri medii şi uşoare de diaree, ce nu sunt înregistrate şi investigate bacteriologic.

În România, morbiditatea multianuală în perioada 1990-1996 s-a situat între 21,4 şi 51,5. (tabelul nr. 1).

Tabel 1 Morbiditatea în România prin boli diareice alimentare, toxiinfecţii alimantare şi dizenterie în perioada 1990-1996 (după Bârzoi şi col. 1999)

Tip de morbiditate	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Boli diareeice acute ($^0/_{0000}$)	413,7	413,7	427	420,2	501,5	388,4	349,1
Toxiinfecţii alimentare($^0/_{0000}$)	8,2	10,3	10,3	8,8	10,1	13	13,2
Salmoneloze($^0/_{0000}$)	9,7	5,3	5,7	7,1	7,4	7,6	5,3
Dizenterie ($^0/_{0000}$)	31,8	32,5	35,6	38,2	51,3	36,6	24,1

Sigella sonnei este serotipul predominant în ţările industrializate europene şi nord-americane, urmat de *S. flexneri*. În ţările în curs de dezvoltare din Asia de sud-est şi America Centrală *S. flexneri* şi *S. dysenteriae* 1 sunt serotipurile dominante.

În SUA într-o perioadă de 15 ani (1973-1987) au fost raportate 107 focare sigelozice etiologic confirmate, însumând 14.300 îmbolnăviri cu 4 decese.

În Statele Unite unde raportarea îmbolnăvirilor este mai apropiată de realitate, morbiditatea în perioada 1983-1994 a oscilat între 7,1 şi 12,4.

În anul 2007, în SUA au fost raportate 2848/100.000 cazuri, 78% fiind produse de *Sigella sonney*, iar 18% de *Sigella flexneri.*

Din 1594 de focare înregistrate în Anglia şi Ţara Galilor în 1992-1994, numai 46 (4%) au fost determinate de *Sigella sonney*

În Franţa, de-a lungul a a 3 ani (1990-1992) din 1974 de focare de toxiinfecţii alimentare numai 10 au fost determinate de *Sigella,* în totalitate *Sigella sonney.*

În România, morbiditatea multianuală în perioada 1990-1996 s-a situat între 24,1-51,5.

La nivel mondial, îmbolnăvirile cu *Sigella spp*. înregistrează 164,7 milioane de cazuri /an, din care 1,1 milioane se soldează cu decese. 60% din îmbolnăviri şi 61 % din cazurile mortale apar la copii cu vârsta de până în 5 ani.

30% din cazuri sunt produse de *Sigella dysenteriae*, îndeosebi în ţările asiatice în curs de dezvoltare.

Din totalul bolilor diareice, la nivel mondial, *Sigella spp*. determină 28% din cazuri. **(Jaya Sureshbabu, Venugopalan P., 2008).**

O incidenţă a izbucnirilor hidrice şi toxiinfecţiilor alimentare determinate de *Sigella spp*. în perioada 1990-1996 este redată în tabelul nr.2.

Tabel nr.2 Izbucnirile hidrice şi toxiinfecţiilor alimentare determinate de Sigella spp. în perioada 1990-1999 (după Bârzoi şi col. 1999)

Locul izbucnirii	Anul	Număr de cazuri	Calea de tanrsmitere a infecţiei	Agentul etiologic
Israel	1990	8000	Hidrică	*Sigella sonnnei*
SUA-Alaska	1991	25	Supă de elan	*Sigella sonnei*
SUA-vapor croazieră	1994	218	Ceapă verde	*Sigella flexneri tip 2a*
Europa (Norvegia, Anglia)	1994	?	Salată (import Spania)	*Sigella sonnei*
Internaţional (24 de state din SUA)	1992	240	Sandwich-uri preparate în bucătăria avionului	*Sigella sonnei*
SUA-multistatal	1994	?	Ceapă verde (import Mexic)	*Sigella flexneri tip6*
Italia-vapor croazieră	1996	330	Peşte afumat	*Sigella dysenteriae tip 1a*

În toxiinfecţiile alimentare determinate de *Sigella spp*., alimentele prelucrate, contaminate înainte de consum, au fost cel mai frecvent incriminate. Multiplicarea alimentară a sigelelor chiar la temperaturi 10-19ºC explică incriminarea unor alimente iniţial contaminate cu un număr subinfectant de germeni.

Consumul de crudităţi (salată, ceapă verde) a fost punctul de plecare a unor focare de mare extindere în Europa şi America. Lactatele au fost de asemenea frecvent incriminate în izbucniri alimentere indeosebi familiale. Controlul curent al surselor potenţiale în fabricile de lapte şi derivate din lapte şi a produsului finit înainte de comercializare reduce mult probabilitatea contaminărilor acestei categorii de produse.

În produsele în care şigelele se află în asociere cu *Escherichia coli* spuravieţuiesc puţin timp, întrucât sunt sensibile la produşii de metabolism ale acestei bacterii, fiind sensibile şi la acidifierea substratului, produsă de *Escherichia coli*. Şigelele au rezistenţă scăzută în competiţie cu flora fecaloidă sau saprofită din alimente. În lapte, brânzeturi, crustacee, moluşte, ouă, supravieţuiesc între 3 săptămâni şi 3 luni.

În apă la 7-10^{o}C supravieţuiesc cca. 9 zile, iar în alimente 1-2 săptămâni. În apa îngheţată trăiesc cca. 2 luni. **(Maurelli A.T., Lampel A.K., 1994 cit. de Enache 2005).**

Rezistenţa shigelelor în mediul extern este mai redusă decât a salmonelelor, dar ele pot supravieţui un timp suficient de lung, pentru a asigura transimetrea infecţiei. In alimente cu pH apropiat de neutru acestea supravieţuiesc şi se înmulţesc. *Shigella flexneri* a fost izolată din icrele de Manciuria cu Ph 5,5 şi concentraţie de sare 6%. **(Enache 2005)**.

Mecanismele de patogenitate ale bacteriei sunt: capacitatea invazivă de multiplicare, şi toxicitatea. Tulpinile patogene produc o enterotoxină sau toxina *Shiga* care acţioneză ca o citotoxină, având rol neurotoxic, explicând astfel fenomenele neurologice prezente în dizenteria produsă de *Sh.dysenteriae* tip 1.

Rezistenţa şigelelor la antibiotice este condiţionată de uşurinţa cu care această grupare achiziţionează şi transferă plasmidial rezistenţa multiplă.

Din cauza folosirii curente în clinica umană a unui număr mare de antibiotice, *Shigella spp*. a devenit rezistentă progresiv la cele mai răspândite şi accesibile antibiotice.

Dobândirea uşoară a rezistenţei de la alte enterobacterii comensale face ineficientă terapia iniţială şi induce enterobacterii rezistente implicate apoi în complicaţii secundare, reducând gama antibioticelor active în terapie.

În terapia şigelozelor la om sunt recomandate trimethoprim, sulfametoxazolul şi quinolonele de toate generaţiile, deoarece scurtează evoluţia şi portajul cronic. **(Guerrant L.R.,1995, Hedberg C.W. ŞI col., 1992 cit. de Enache 2005).** S-au mai utilizat în terapie, la diferite categorii de vârstă şi antibiotice ca: gentamicina, ampicilina asociate cu cloramfenicolul. **(Alkan M., Simu A., Salzstein E., 1995).**

Şigelloza este o boală frecvent contractată şi dezvoltată de persoanele cu sindromul imunodeficienţei dobândite SIDA, sau de alte persoane imunodeficitare. Populaţia ţintă este reprezentată însă de copii şi de bătrâni, la care declanşează simptome mai severe. La copii evoluează cu febră mare (39-40°C) şi semne neurologice – convulsii, letargie, delir.

În infecţiile cu *Shigella dysenteriae* tip 1, boala se poate complica cu fenomene toxice şi cu sindrom de hematurie. Sindromul hemoragic uremic este determinat de toxina *Shiga* care are o puternică activitate citotoxică. **(Gunzer F., şi col., 1992 cit. de Enache 2005).**

În doza clinică relevantă(10 $^{-5}$ celule/ml) aceşti germeni au proprietăţi utero-contractile**(Kramer M.H. şi col. 1996 cit. de Enache 2005).**

Contaminarea se realizează de obicei pe cale orală, fiind favorizată de apele contaminate, de obiceiurile igienice rele şi de manipularea necorespunzătoare a alimentelor.

Alimentele asociate sunt mai ales salatele (în special cu pui sau ton), legumele crude, laptele şi produele lactate nepasteurizate, preparate din carne şi carnea de pasăre. Ca multe bacterii nocive care se regăsesc în alimente, bacteriile sunt distruse în alimentele fierte.

Shigella este sensibilă la dezinfectanţii obişnuiţi, este însă rezistentă în materiile fecale până la 10 zile, pe muşte 12 zile, sau în cămăşile murdare 8 zile, ceea ce impune respectarea strictă a condiţiilor de igienă.

Dată fiind importanţa sursei umane, măsurile cele mai eficiente se adresează neutralizării ei prin scuratarea stării de excretor, cât şi prin limitarea potenţialului contaminat**.**

(Bărzoi şi col. 1999).

Alimentele de origine animală sunt la origine indemne de *Shigella*. Contaminarea shigelozică se realizează prin manipularea neigienică, înainte de consum, prin prezenţa unei surse umane. Marile izbucniri de pe vasele de croazieră sau transporturile aeriene au avut întotdeauna o sursă excretoare umană ce a intervenit în procesarea alimnetelor chiar înainte de consum. Vectorii sezonieri – muştele – joacă un rol activator mai frecvent al căii de contact. **(Bărzoi şi col. 1999).**

Controlul bacteriologic al produselor procesate industrial este util. Pragul redus al contaminării face însă ca această bacterie să scape deseori practicilor curente de investigare bacteriologică. De asemenea controlul bacteriologic al crudităţilor, pe lângă faptul că se realizează foarte greu, prin eficienţa redusă nu poate constitui o măsură de control acceptată şi nu se efectuează decât în scopuri epidemiologice pentru identificarea căilor de infecţie în focare.

Măsurile individuale educativ-sanitare, deprinderile igienice joacă un rol important în limitarea focarelor restrânse, familiale şi reducerea morbidităţii prin dizenterie ca de altfel în toate bolile cu transmitere fecaloid-orală.

Prevalenţa tulpinilor de *Shigella spp*. în unele alimente de origine animală în România după Enache şi col., 2005:

Prevalenţa tulpinilor de *Shigella spp*. în lapte şi derivate din lapte:

Enache şi col., în perioada 2001-2003 a studiat prevalenţa tulpinilor de *Shigella spp.* pe eşantioane mari de lapte şi derivate de lapte, provenite de la producătorii neautorizaţi (din mai multe judeţe limitrofe Municipiului Bucureşti) care comercializau aceste produse în condiţii precare de tehnologie şi igienă.

Din 743 de eşantioane examinate, s-a izolat *Sigella spp*. din 5 probe (0,6%), rezultate fiind redate în tabelul nr. 3.

Tabelul nr. 3

Felul produsului	Numărul de probe examinate	Numărul de probe pozitive
Lapte proaspăt nepasteurizat	320	2
Caş proaspăt	120	3
Urdă dulce	46	-
Brânză proaspătă de vaci	257	1
Total	743	5

Prevalenţa tulpinilor de *Shigella spp.* în carnea de pasăre dezosată mecanic:

s-au investigat 6 loturi însumând 609 tone carne de pasăre(MDM), importată din : Belgia, SUA, Italia, Franţa. Olanda, Brazilia, pe probele examinate nu s-a reuşit izolarea de *Sigella spp*..

Prevalenţa tulpinilor de *Shigella spp.* în semiconserve de peşte:

Peştele şi derivatele din peşte pot fi sursă de contaminare cu şigela, astfel că dintr-un eşantion de 52 de probe examinate 5 probe au fost pozitive – tabel nr. 4

Din salata simplă de icre de crap şi hering şi salata de icre cu adosuri de legume, s-au identificat 5 probe pozitive pentru *Sigella spp*., aceste produse fiind probabil, contaminate de la purtători, în condiţiile nerespectării normelor de igienă individuală şi tehnologică pe fluxul de procesare a materiilor prime.

Tabel nr. 4

Denumirea produsului	Cantitatea (kg/lot)	Numărul de probe examinate	Probe pozitive
Salată de icre de crap	2573	17	1
Salată de icre de hering	2135	11	2
Salată de icre cu adosuri de legume	100	6	2
Salată nordică	30	1	-
Salată pescarească	42	2	-
Macrou afumat	3100	15	-
Total	7980	52	5

Prevalenţa tulpinilor de *Shigella spp*. în prăjituri şi produse de patiserie comercializate de unităţi de alimentaţie publică este prezentată în tabelul nr.5. Din evaluarea surselor posibile de contaminare a acestor produse s-a constatat că materiile prime folosite la prepararea prăjiturilor şi produselor de patiserie nu sunt cauza contaminării produsului finit. Sursa reală de contaminare o reprezintă prelucrarea neigienică a acestora. Din 57 de probe analizate 2 au fost pozitive.

Tabelul nr. 5

Anul	Denumirea produsului	Cantitatea (bucăţi)	Numărul de probe analizate	Numărul de probe pozitive
2000	Prăjituri	785	20	-
2000	Produse de patiserie	524	12	1
2001	Prăjituri	23404	10	-
2002	Prăjituri	232	15	1
Total		24945	57	2

Infecţiile produse de *Sigella spp*. nu pot fi încă controlate eficient, datorită necunoaşterii incidenţei reale la bolnavii cu toxiinfecţii alimentare, întrucât prevalenţa în produsele alimentare de origine animală şi în apă nu este evaluată corect şi complet.

Controlul bacteriologic al produselor procesate industrial este util. Pragul redus al contaminării face însă ca această bacterie să scape deseori practicilor curente de investigare bacteriologică.

Este necesar ca în toate laboratoarele veterinare pentru controlul alimentelor de origine animală să fie legiferată obligativitatea diagnosticului curent pentru şigele, întrucât aceşti germeni fac parte din punct de vedere epidemiologic din aceeiaşi grupă de risc din care fac parte toxiinfecţia alimentară produsă de *Salmonella.* **(Enache T., Enache T. Jr. ,2005).**

BIBLIOGRAFIE

1. Apostu S., 2006 – Microbiologia produselor alimentare, vol. I, II,III, Editura Risoprint, Cluj-Napoca.
2. Apostu S., 2004 – Managementul Calităţii Alimentelor, Editura Risoprint, Cluj-Napoca.
3. Alkan M., Simu A., Salzstein E., 1995 – Four casses of Sigella septicemia in Israel, Eur. Journal of Clinical Microbiology, Vol 4, pg. 417-418.
4. Bazgan O., 1998 – Diagnostic de laborator şi igiena alimentelor de origine animală, Editura Moldogrup, Iaşi.
5. Bărzoi D., Meica S., Neguţ M., 1999 – Toxiinfecţiile alimentare, Editura Diacon Coresi, Bucureşti.
6. Bărzoi D., 1985 – Microbiologia produselor alimentare de origine animală, Editura Ceres, Bucureşti.
7. Bărzoi D., Apostu S., 2002 – Microbiologia produselor alimentare, Editura Risoprint, Cluj-Napoca.
8. Bondoc I., Şindilar E.V., 2002 – Controlul veterinar al calităţii şi salubrităţii alimentelor, vol. I, Editura Ion Ionescu de la Brad, Iaşi.
9. Buiuc D., Neguţ M., 2008 – Tratat de microbiologie clinică, Ediţia a II a, Editura Medicală, Bucureşti.
10. Buiuc D., 2003 – Microbiologie medicală, Ghid pentru studiul si practica medicinei, Editia a VI a, Editura Gr. T. Popa, Iaşi.

11. Carp-Cărare M., Timofte D., Paul I.,Guguianu E., Boişteanu M., Moroşanu Ş., 1995-1996 - Semnalarea unui episod de infecţie cu Sigella boydii la puii de găină de 9 zile, Lucrări ştiinţifice, Vol. 38-39, UAMV Iaşi, pg. 72-75 ISSN 0075-5313.
12. Carp-Cărare M., 2001 – Microbiologie veterinară, Editura Venus, Iaşi.
13. Carp-Cărare M., Guguianu E., Timofte D., 1997 – Lucrări practice de microbiologie veterinară – Uz intern, UŞAMV, Iaşi.
14. Dan V., 2001 – Microbiologia Alimentelor, Editura Alma, Galaţi.
15. Dunca S., Ailiesei O., Nimiţan E., Ştefan M., 2007 – Microbiologie Aplicată
16. Enache T., Nicolae Ş., Enache T. Jr., Hălăciugă F., - 2005 Toxiinfecţii Alimentare prin alimente de origine animală contaminate cu Shigella spp.
17. Guguianu E., 2002 – Bacteriologie generală, Editura Venus, Iaşi.
18. Işan Elena, 2001 – Observaţii privind calitatea şi salubritatea preparatelor din carne comercializate pe teritoriul Judeţului Iaşi. Lucrări ştiinţifice UŞAMV, 44, Editura Ion Ionescu de la Brad Iaşi.
19. Işan E., Gugianu E., 2001 – Cecetări privind microflora cărnii, semipreparatelor şi preparatelor din carne examinate în cadrul L.S.V.S. Iaşi. Lucrări ştiinţifice UŞAMV, 44, Editura Ion Ionescu de la Brad, Iaşi.
20. Moza A.C., 2008 – Noţiuni Teoretice şi Practice de Poluare Micotoxicologică, Editura Universităţii din Oradea.
21. Negrea A., 2002 – Controlul sanitar veterinar al cărnii şi organelor în bolile parazitare şi infecţioase, Editura Pim, Iaşi.
22. Nicolescu C., 2005 – Microbiologia produselor alimentare de origine animală, Editura Bibliotheca, Târgovişte.
23. Savu C., 2008 – Igiena şi controlul produselor de origine animală, Editura Semne, Bucureşti.
24. Savu C., Georgescu N., 2004 – Siguranţa alimentelor, Editura Semne, Bucureşti.
25. J. Sureshbabu, P. Venugopalan – Sigella infection, eMedicin, 2008.
26. Jay J.M., 1998 – Modern Food microbiology, Arnold, London.
27. Jay J.M., 2000 - Modern Food Microbiology An Aspen Publication, Aspen Publishers, Int Gaitherburg, Maryland.
28. Tofan C., 2004 – Microbiologie alimentară, Editura Agir, Bucureşti.
29. Tofan C., Bahrim G., Nicolau A., Yara M., 2002 – Microbiologia produselor alimentare. Tehnici şi analize de laborator, Editura Agir, Bucureşti.

30. *** Ghid de bune practici de igiena şi producţie pentru sectorul de procesare a cărnii, 2005 – Asociaţia română a cărnii, Editura Agricola, Bucureşti.
31. *** SR EN ISO 22 000, Ediţia I 2005 – Sisteme de management al siguranţei alimentelor. Cerinţe pentru orice organizaţie din lanţul alimentar.
32. *** SR ISO/TS 22 004, 2006 – Sisteme de management al siguranţei alimentelor. Recomandări de aplicare pentru ISO 22000 : 2005.

ANALIZA DIFERENŢIATĂ A EXTERIORULUI CONFORM STANDARDELOR RASELOR DE CIOBÂNEŞTI ROMÂNEŞTI

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXTERIOR ACORDING TO THE BREED STANDARDS IN ROMANIAN SHEPHERD DOGS

C.V. GAŞPAR[1], C. GAŞPAR[2], G. I. GAŞPAR[2]
[1]Clubul Naţional Bucovina
[2]Facultatea de Medicină veterinară Iaşi

Key words: Romanian Shepherd dogs, morphology, standards

În lucrarea prezentă se face o analiză diferenţită a exteriorului celor patru rase de ciobăneşti româneşti conform standardelor, rezultatele find prezentate în tabelele urmatoare:

Ciobănesc Românesc Mioritc – C.R.M.
Ciobănesc Românesc Carpatin – C.R.C.
Ciobănesc Românesc de Bucovina - C.R.B.
Ciobănesc Românesc Corb – C.R.Corb
Federaţia Chinologică Internaţională – F.C.I.

Tabelul Nr.1 Prezentarea generală a raselor de ciobăneşti Româneşti.

Specificare	Rasa			
	C.R.M.	C.RC.	C.R.B.	C.R.Corb
Nr. standard.	FCI N° / 349/ 13.07.2005	FCI N° / 350 / 13.07.2005	FCI-Standard N° /357 / 9.05.2009	
Clasificare F.C.I.	Grupa 1 Câini ciobăneşti şi de cireadă (fără câinii de cireadă elveţieni). Secţiune 1.1 Câini ciobăneşti.	Grupa 1 Câini ciobăneşti şi de cireadă (fără câinii de cireadă elveţieni). Secţiune 1.1 Câini ciobăneşti.	Grupa II Pinscher-Schnauzer, Molossoizi, Câini de cireadă şi de munte elveţieni şi alte rase Secţiunea 2.2 . Molossoizi, tip montan. Fără probă de lucru.	Grupa II Pinscher-Schnauzer, Molossoizi, Câini de cireadă şi de munte elveţieni şi alte rase Secţiunea 2.2. Molossoizi, tip montan Fără probă de lucru.
Descriere generală	Câine de talie mare dar niciodată greoi, viguros şi spectaculos. Părul este lung şi abundent pe cap, pe tot corpul şi pe membre. Masculii sunt mai înalţi şi mai puternici decât femelele.	Câine de talie destul de mare, agil, niciodată greoi, aspectul general fiind acela al unui câine viguros. Corp rectangular, crupă lată, uşor înclinată, cutie toracică amplă şi înaltă, umăr lung şi uşor înclinat. Dimorfismul sexual este bine marcat, masculii trebuind să fie mai înalţi şi mai puternici decât femelele.	De talie mare, impozant, temerar şi mândru. Dimorfismul sexual este bine marcat.	De talie mare, impozant, curajos şi mândru. Dimorfism sexual bine marcat, masculii fiind mai puternici, de talie mai mare, mai robuşti decât femelele. Roba sa este neagră, în proporţie de cel puţin 80% cu marcaje albe pe piept şi pe labe. Marcajele albe neavând nici un fel de stropituri.

Tabelul Nr.2 Prezentare comparativă a regiunii capului şi gâtului la rasele de ciobăneşti româneşti.

Specificare	Rasa			
	C.R.M.	C.RC.	C.R.B.	C.R.Corb
Descriere generală	Puternic, masiv, important în raport cu corpul.	Tip lupoid.	Masiv, portul său este uşor ridicat în raport cu linia spatelui.	Puternic, masiv, cu forme bine cizelate, niciodată colţuros sau cu expresie respingătoare. Cap cu un port mândru, ridicat peste linia spatelui.
Craniu	De lăţime potrivită, uşor bombat. Profilele superioare ale craniului şi botului sunt aproape paralele. Văzut din faţă, profilul superior este uşor bombat. Arcadele zigomatice sunt puţin marcate.	Ciobănescul Carpatin este un câine mezocefal, cu un cap puternic dar nu greoi. Fruntea este lată şi uşor bombată. Craniul este mai lat între urechi şi se îngustează progresiv către stop, silonul frontal este destul de lung şi suficient de bine marcat	Potrivit de lat. Axele longitudinale ale craniului şi botului sunt uşor convergente. Văzut din faţă, este uşor bombat; văzut din profil, este aproape plat; lăţimea craniului: la masculi 16-18 cm, la femele 15-17 cm. Arcadele zigomatice sunt potrivit dezvoltate.	Suficient de lat, pătrat, lungimea şi lăţimea aproximativ egale. Axele longitudinale ale craniului şi botului sunt aproape paralele. Văzut din faţă, este uşor bombat; văzut din profil, este aproape plat; lăţimea craniului: la masculi 16-18 cm, la femele 15-17 cm. Arcadele zigomatice sunt potrivit dezvoltate.
Protuberanţa occipitală	Este bine marcată.		Este puţin marcată	Este puţin marcată
Stopul	Nu prea marcat.	Moderat, niciodată prea marcat dar nici şters.	Uşor marcat.	Moderat marcat.
Trufa	Lată, bine dezvoltată, neagră.	Mare, lată şi întodeauna neagră.	Bine dezvoltată şi lată, de culoare neagră.	Bine dezvoltată si lată, de culoare neagră.
Bot	Uşor mai scurt decât craniul; bine dezvoltat, se îngustează progresiv către trufă şi niciodată nu este ascuţit; mandibulă puternică.	Puternic, cu o secţiune aproximativ ovală, uşor tronconic. Lungimea botului este uşor mai mică sau cel mult egală cu lungimea craniului.	Tronconic, de aceeaşi lungime cu cea a craniului; bine dezvoltat, el se îngustează progresiv către extremitate dar niciodată nu devine ascuţit.	Tronconic, de lungime uşor mai mică sau egală cu cea a craniului; bine dezvoltat, el se îngustează progresiv către extremitatea sa dar niciodată nu devine ascuţit; lăţimea şi adâncimea acestuia sunt egale.
Buzele	Groase, aderente, puternic pigmentate.	Groase, bine pigmentate, bine aplicate, cu o comisură bine închisă.	Groase şi bine aplicate, puternic pigmentate.	Groase, uşor căzute, acoperind linia inferioară a mandibulei, puternic pigmentate.
Maxilare / dinţii	Puternice; dentiţie completă, puternică, sănătoasă cu dinţi albi, bine implantaţi; muşcătura în foarfecă.	Puternice, solide şi drepte. Dantură puternică; muşcătură în foarfecă, arcadele incisive sunt uşor rotunjite.	Puternice; dentiţie completă cu dinţi sănătoşi, bine implantaţi, de culoare albă; muşcătură în foarfecă. Muşcătura în cleşte este admisă.	Puternice; dentiţie completă cu dinţi sănătoşi, bine implantaţi, de culoare albă; muşcătură în foarfecă sau cleşte. Muşcătura în foarfecă inversată este admisă.
Obrajii	Nu sunt proeminenţi.	Maseteri puternici dar niciodată proeminenţi. Pielea este bine întinsă.	Nu sunt proeminenţi.	Nu sunt proeminenţi.
Ochii	De mărime potrivită, oblici; de culoarea alunei, brun închisă sau uşor mai deschisă, niciodată galbeni. Pleoape bine pigmentate. Expresie calmă şi inteligentă.	: Migdalaţi, uşor oblici, nu prea mari în raport cu dimensiunile craniului, de culoare brun închisă. Nu sunt proeminenţi şi nici înfundaţi în orbite. Pleoapele sunt negre şi îmbracă bine forma globului ocular.	Sunt mici în raport cu dimensiunile capului; migdalaţi şi oblici, de culoare castanie sau uşor mai deschisă, niciodată de culoare galbenă. Pleoapele sunt bine pigmentate.	Sunt mici în raport cu dimensiunile capului; migdalaţi şi oblici, de culoarea ambrei de la nuanţe mai deschise la nuanţe închise. Pleoapele sunt bine pigmentate.
Urechile	Prinse relativ sus, în formă de « V » cu extremitatea uşor rotunjită, lungi de 10-15 cm, căzute şi bine apropiate de obraji; amputarea lor este interzisă.	Nu prea mari, triunghiulare, prinse puţin mai sus faţă de linia ochiului, cu extremitatea uşor rotunjită, bine lipite de obraji.	Prinse relativ sus, în formă de « V », cu extremitatea uşor rotunjită, căzute şi bine apropiate de obraji. Amputarea lor este interzisă.	Prinse uşor mai sus de nivelul ochilor, în formă de « V », cu extremitatea uşor rotunjită, căzute şi apropiate de obraji. Întinse, urechile trebuie sa depăşească comisura buzelor.
Gâtul	De lungime potrivită, lat şi puternic, lipsit de salbă.	Musculos, foarte puternic, de lungime medie, formând un unghi de cca. 50grade în raport cu orizontala.	De lungime potrivită, gros şi puternic, lipsit de salbă.	Lungime potrivită, gros şi puternic, cu o uşoară salbă.

Tabelul Nr.3 Prezentarea diferenţiată a regiunii trunchiului la rasele de ciobăneşti româneşti

Specificare	Rasa			
	C.R.M.	C.RC.	C.R.B.	C.R.Corb
Descrierea generală	Bine dezvoltat.	Viguros, bine dezvoltat, de formă uşor rectangulară.	Masiv, viguros.	Masiv, viguros.
Linia superioară	Dreaptă, bine susţinută.	Dreaptă şi fermă.	Orizontală.	Orizontală.
Greabănul	Mediu marcat	Puţin marcat.	Puţin marcat.	Puternic marcat.
Spatele	Orizontal, puternic şi musculos.	De lungime potrivită, drept, solid şi musculos.	Bine susţinut şi foarte musculos.	Puternic, foarte musculos.
Şalele	Potrivit de lungi, late şi foarte musculoase.	Puternice şi musculoase dar nu prea late, de lungime potrivită, nici prea lungi (linia superioară pierzând astfel din fermitate), nici prea scurte.	Puternice, foarte musculoase.	Puternice, foarte musculoase.
Crupa	Musculoasă şi potrivit înclinată către baza cozii.	Musculoasă şi lată, de lungime potrivită, uşor înclinată, niciodată căzută.	Musculoasă şi moderat înclinată către baza cozii.	Musculoasă şi moderat înclinată către baza cozii.
Pieptul	Lat, nu prea lung, înălţimea sa măsurând circa jumătate din înălţimea la greabăn, cu coaste bine arcuite.	Bine dezvoltat, bine coborât până la nivelul coatelor, destul de lat. Coaste solide, bine arcuite, niciodată în butoi.	Lat şi înalt, atingând nivelul coatelor; coastele sunt bine arcuite.	Lat şi înalt, atingând nivelul coatelor; coastele sunt bine arcuite.
Linia inferioară	Uşor ridicată, fără a fi însă foarte suptă (de tip ogar).	Potrivit de ridicată, abdomen ridicat dar nu supt şi nici căzut.	Uşor ridicată.	Uşor ridicată.
Coada	Prinsă sus. În repaos, este purtată căzută, atingând sau depăşind uşor jaretul; când câinele este atent sau în acţiune, este purtată ridicată, un pic curbată, putând depăşi nivelul spatelui dar niciodată rulată pe spate. Amputarea este interzisă.	Prinsă destul de sus, stufoasă, acoperită de păr abundent. În repaos, ea este purtată jos, dreaptă sau uşor în formă de sabie, atingând punctul jaretului. Când câinele este atent sau în acţiune, ea este purtată ridicată putând depăşi nivelul spatelui; nu este nici culcată şi nici rulată pe spate.	Prinsă destul de înalt. În repaos, este purtată jos, atingând punctul jaretului sau chiar mai jos; când câinele este atent sau în acţiune, ea este purtată ridicată, putând depăşi nivelul spatelui, în formă de seceră. Amputarea este interzisă.	Prinsă destul de înalt. În repaos, este purtată jos, cu extremitatea uşor curbată în ultima sa treime. Alungită, atinge punctul jaretului sau coboară chiar mai jos; când câinele este atent sau în acţiune, ea este purtată ridicată, putând depăşi nivelul spatelui dar niciodată curbată pe unul din flancuri.

Tabel Nr. 4 Analiza diferenţiată a membrelor la rasele de ciobăneşti româneşti .

Specificare	Rasa			
	C.R.M.	C.RC.	C.R.B.	C.R.Corb
Anterioare				
Vederea de ansamblu	Văzute din faţă sau din profil au aplomburi bune.	Văzute din faţă sau din profil, membrele anterioare au aplomburi bune şi sunt perpendiculare pe sol.	Văzute din profil şi din faţă, membrele au aplomburi bune.	Văzute din profil şi din faţă, membrele au aplomburi bune.
Umărul	De lungime potrivită, oblic, foarte musculos şi bine prins. Angulaţie scapulo-humerală de circa 100-105%.	Solizi, potrivit înclinaţi.	Omoplaţi lungi, puternici şi oblici, bine prinşi, foarte musculoşi. Angulaţie scapulohumerală de circa 100-110%.	Omoplaţi lungi, puternici şsi oblici, bine prinşi, foarte musculoşi. Angulaţie scapulo-humerală de circa 100-110%.
Braţul	lungime potrivită, foarte musculos.		Potrivit de lung şi foarte musculos.	Potrivit de lung şi foarte musculos.
Cotul	Bine apropiate de corp, nedeviate spre interior sau exterior.	Bine apropiate de corp, nedeviate la exterior sau răsucite spre interior.	Bine apropiate la corp, se mişcă cu uşurinţă.	Bine apropiate la corp, se mişcă cu uşurinţă.
Antebraţul	Suficient de lung, puternic şi musculos.	Drept, foarte viguros, cu secţiune ovală.	Puternic şi nu prea lung.	Puternic şi nu prea lung.
Carpul	Ferm.		Solid.	Solid.
Metacarpul	Văzut din profil este uşor înclinat.	Scurte, uşor înclinate.	Scurte, văzute din profil sunt uşor înclinate.	Scurte, văzute din profil sunt aproape drepte
Labele anterioare	Ovale, compacte şi masive; degete strânse şi arcuite, unghii de culoare gri-cenuşie.	Ovale, masive, compacte	De formă ovală, compacte şi puternice, cu unghii de culoare neagră sau cenuşie.	: De formă rotunjită (labă de pisică), compacte şi puternice, cu unghii de culoare neagră sau cenuşie.
Posterioare				
Vederea de ansamblu	Foarte musculoase şi puternice, drepte şi paralele văzute din spate.	Musculoase, cu osatură solidă şi cu angulaţii bune.	Foarte musculoase şi puternice, cu aplomburi bune.	Foarte musculoase şi puternice, cu aplomburi bune.
Agulaţiile	Puţin deschise.	Cu aplomburi bune.		
Coapsa	Lungă, lată şi foarte musculoasă.	Lată, foarte musculoasă.	Potrivit de lungă, lată, foarte musculoasă.	Potrivit de lungă, lată, foarte musculoasă.
Grasetul	Unghiul femuro-tibial este de circa 105-110%.		Unghiul articulaţiei femuro-tibiale este de circa 110%.	Unghiul articulaţiei femuro-tibiale este de circa 110%.
Gamba	Suficient de lungă, musculoasă, cu o bună osatură.	Puternică, musculoasă, de lungime potrivită.	De lungime medie, musculoasă	De lungime medie, musculoasă.
Jaretul	De înălţime medie; puternici, bine angulaţi, nedeviaţi spre interior sau exterior.	Solid, ferm, nici prea înalt (determinând astfel o accentuare a angulaţiei grasetului), nici prea coborât.	Văzut din profil, este lat şi cu o angulaţie potrivită; văzut din spate, este situat într-un plan paralel cu planul median al corpului.	Văzut din profil, este lat şi cu o angulaţie potrivită; văzut din spate, este situat într-un plan paralel cu planul median al corpului.
Metatarsul	Nu prea lung, robust şi aproape vertical, văzut din profil. Prezenţa pintenilor nu trebuie să fie penalizată.	Solid, vertical.	Robust şi net, cu aplomb perfect. Prezenţa pintenilor nu trebuie să fie penalizată.	Robust şi net, cu aplomb perfect. Prezenţa pintenilor nu trebuie să fie penalizată.
Labe posterioare	Puţin mai alungite decât cele anterioare.	Ovale, bine dezvoltate şi compacte, uşor mai mici decât cele anterioare. Degetele sunt arcuite şi strânse. Se vor îndepărta eventualii pinteni, mai puţin în ţările unde această practică este interzisă prin lege. Cuzineţii sunt elastici şi rezistenţi.	De formă ovală, compacte şi puternice, cu unghii de culoare neagră sau cenuşie.	Foarte uşor mai alungite decât cele anterioare, compacte şi puternice, cu unghii de culoare neagră sau cenuşie.
Mişcarea	Armonioasă, suplă, bine coordonată, puternică şi facilă. Mişcarea preferată este trapul; galopul este susţinut şi echilibrat.	Este degajată şi cu o bună alonjă. Trapul este viguros şi susţinut. Membrele se mişcă în planuri paralele.	Regulată şi degajată; văzute din faţă şi din spate membrele se mişcă în linie dreaptă. Trapul de amplitudine medie este mişcarea preferată. Mişcările încrucişate sau ridicate trebuie să fie penalizate.	Regulată şi degajată; văzute din faţă şi din spate, membrele se mişcă în linie dreaptă. Trapul de amplitudine medie este mişcarea preferată.

Tabel Nr. 5 Analiza diferenţiată a pielii robei, taliei, şi greutăţii la ciobăneşti româneşti

Specificare	Rasa			
	C.R.M.	C.RC.	C.R.B.	C.R.Corb
Pielea	Groasă, bine întinsă pe corp, bine pigmentată.	Pigmentată cenuşiu. Trufa, marginile pleoapelor şi buzele trebuie să fie de culoare neagră. Se preferă unghiile de culoare cenuşie sau neagră.	Groasă, bine aplicată, de culoare cenuşiu-închisă.	Groasă, bine aplicată, de culoare cenusiu-închisă.
Roba				
Părul	Este abundent pe cap şi pe corp, de textură aspră, drept şi lung de minimum 10 cm. Subpărul este mai dens şi mai suplu, de culoare deschisă. Pe membre, părul este mai scurt. Coada este bine acoperită de păr.	Este aspru, des şi drept. Subpărul este dens şi moale. Cu excepţia capului şi feţelor anterioare ale membrelor unde părul este scurt şi plat, părul este abundent pe tot corpul, de lungime potrivită. Pe gât, faţa posterioară a membrelor şi pe coadă, părul este mai lung, abundenţa părului în aceste regiuni fiind tipică.	Este scurt pe cap şi pe faţa anterioară a membrelor. Pe corp, părul este abundent, drept, mai gros şi mai dur, atingând o lungime de 6-9 cm. Subpărul este mai scurt şi mai des, de culoare mai deschisă. Pe gât, părul este mai lung şi formează o coamă; pe faţa posterioară a membrelor, părul formează franjuri de lungime moderată. Coada este stufoasă, fiind acoperită de un păr mai lung şi mai gros.	Este scurt pe cap şi pe faţa anterioară a membrelor. Pe corp, părul este abundent, drept, mai gros şi mai dur, atingând o lungime de 7-10 cm. Subpărul este mai scurt şi des. Pe gât, părul este mai lung şi formează o coamă; pe faţa posterioară a membrelor, părul formează franjuri de lungime moderată. Coada este stufoasă, fiind acoperită de un păr mai lung şi mai gros.
Culorea	Câini în întregime de culoare albă sau gri. Robă bălţată: Fondul trebuie să fie alb cu pete bine definite de culoare neagră sau gri.	Nisipiu-cărbunoasă (lupie), cu nuanţe diferite, adesea mai deschise pe părţile laterale şi mai închise deasupra trunchiului; nisipiu-cărbunoasă (lupie) cu pete albe, de preferinţă nu foarte întinse.	Clasică : Fondul trebuie să fie alb cu pete bine definite de culoare nisipiu-cărbunos (lupie), tigrată sau neagră. Pe membre, se admit stropituri negre sau de diferite nuanţe. Culori uniforme: Robele uniforme (fără pete), de culoare integral albă sau neagră, sunt acceptate dar nu căutate.	Fondul trebuie să fie întotdeauna negru (pana corbului) pe cel puţin 80% din suprafaţa corpului, cu marcaje albe pe piept şi pe membrele anterioare. Pe membrele anterioare marcajele albe nu trebuie să depăşească nivelul articulaţiei metacarpului, dar pot urca pe partea posterioară până aproape de cot. Nu se admit stropituri negre sau de diferite nuanţe pe fondul alb. Prezenţa albului pe vârful labelor posterioare nu se penalizează. La valoare aproximativ egală exemplarele cu mai mult negru vor fi preferate. Roba cu tente roşcate, datorată expunerii prelungite la soare din timpul verii, nu se va penaliza.
Taliea	Înălţime la greabăn: Masculi: min.70 cm, ideal 75 cm Femele: min.65 cm, ideal 70 cm	Înălţime la greabăn: Ideală: 65-73 cm la masculi; 59-67 cm la femele.	Înălţime la greabăn: Masculi: 68-78 cm, ideal 71-75 cm Femele: 64-72 cm, ideal 66-68 cm	Înălţime la greabăn: Masculi: 70-80 cm, ideal 75 cm Femele: 65-75 cm, ideal 70 cm
Greutatea	în raport cu talia.	În raport cu talia, dând impresia unui câine puternic dar nu greoi.	În raport cu talia.	În raport cu talia.

CONCLUZII

Cele patru rase se deosebesc prin:

- culoare C.BM. şi C.R.B pot fi albi sau alb cu pete de la gri deschis până la negru C.R.C. este de culoare mai închisă pe tot corpul cu excepția marcajelor de pe piept şi membre C.R. Corb de culoare neagră cu marcaje albe pe picioare piept şi gât;
- talia mare este la C.R.B. urmat de C.R.M. după care C.R.C. şi C.R. Corb fiind cei mai mici având aproximativ aceeaşi înălțime;
- încadrare F.C.I astfel C.R.M. şi C.R.C. fac parte din grupa I pe când C.R.B. şi C.R. Corb sunt încadrați în grupa a-II-a.

Cele patru rase sunt folosite la: paza bunurilor, paza turmelor, cirezilor şi folosirea lor în diferite scopuri depinde de zona geografică unde se cresc, mediul în care trăiesc precum şi de obiceiurile şi tradițiile oamenilor din acele locuri.

CERCETĂRI PRIVIND PARAMETRII GENETICI AI UNEI POPULAŢII DE IEPURI CRESCUŢI ÎNTR-O EXPLOATAŢIE DE TIP FAMILIAL

RESEARCH REGARDING THE GENETIC PARAMETERS OF A RABBIT POPULATION RAISED IN A DOMESTIC EXPLOITATION FARM

GAVRILAS ANGELA, COSTACHESCU ELENA,. SIMEANU D.
USAMV Iaşi
angelagavrilas@yahoo.com

The improvement of the productive performances of animals can be achieved only by promoting for reproduction of those individuals that own the most valuable features and qualities both for production and reproduction. For this purpose, we estimated the genetic parameters that directly influence, under precise environment conditions, the quantity and quality of meat in a rabbit population raised in a domestic exploitation farm. In order to establish the genetic determinism of the analyzed features, we calculated the coefficients of heritability (h^2), of phenotypical correlation and recurrence for the dimensions (established through measurements and weighing) that influence the meat production. It was therefore possible to ascertain that the value of h^2 for the majority of the analyzed features situates inside the limits cited by the speciality literature, excepting the thoracic perimeter (0,67 against 0,37), demonstrating the necessity to calculate the parameters for each population at a time. For all the other parameters differences were obtained, both in value and in meaning.

Key words: rabbits, heritability, genetic parameters.

INTRODUCERE

Creşterea cantităţii, calităţii şi economicităţii producţiei animale, indiferent de specie, presupune un efort susţinut de cunoaştere a materialului biologic şi de concepţie a metodelor şi tehnicilor moderne de ameliorare.

Acest lucru se poate realiza prin cunoaşterea şi promovarea acelor indivizi care posedă cele mai valoroase caractere şi insuşiri de producţie şi reproducţie. Asfel de caractere, cunoscute în literatura de specialitate sub denumirea de caractere metrice sau cantitative, au o variaţie continuă în populaţie şi sunt puternic influenţate de mediu.

Determinismul genetic al caracterelor cantitative poate fi pus în evidenţă cu ajutorul unor parametri genetici, cum sunt: heritabilitatea, repetabilitatea şi corelaţiile genotipice ale caracterele studiate.

În această lucrare ne-am propus să determinăm perfomanţele productive şi parametrii genetici a unei populaţii de iepuri crescuţi într-o exploataţie de tip familial din comuna Aroneanu , în scopul elaborării, în perspectivă, a unui program de ameliorare menit să sporească producţia de carne la această specie.

MATERIAL ŞI METODĂ

Materialul biologic a fost reprezentat de iepuri adulţi şi tineret cunicul, fătări de primăvară, din rasa Chinchilla. S-a lucrat pe cupluri, mamă-fiică, tată-fiu, la care s-au efectuat măsurători şi cântăriri pentru determinarea, înălţimii la grebăn, lungimii şi lărgimii corpului, perimetrului toracic şi greutăţii corporale.

Datele obţinute au fost prelucrate statistic, după programul conceput de Conf. dr. Vasile Maciuc, din cadrul Facultăţii de Zootehnie.

Pentru stabilirea determinismului genetic al caracterelor urmărite s-au calculat coeficienţii de heritabilitate (h^2), de corelaţie fenotipică şi de repetabilitate. Deoarece heritabilitatea nu este numai o proprietate a unui caracter sau individ, ci este o proprietate a populaţiei, a generaţiei şi a condiţiilor de

mediu în care aceasta evoluează, estimarea coeficienților de heritabilitate pentru caractere analizate capătă o importanță deosebită.

Pe de altă parte, cunoaşterea coeficienţilor de corelaţie şi a repetabilităţii, măreşte siguranţa în aprecierea valorii cantitative a carecterelor analizate.

REZULTATE ŞI DISCUȚII

În urma prelucrării statistice a greutății corporale valorii medii obținute au fost, la iepurii adulți între 3,7 şi 4,2 kg, iar la tineretul cunicul între 2,7 şi 2,78 kg. Celelalte dimensiuni corporale au înregistrat valori medii de: 28,9 şi 31,75 cm, la iepurii adulți şi de 27,4 şi 28,0 cm la tineretul cunicul, pentru perimetrul toracic; de 9,0 şi 9,5 cm la adulți şi respectiv de 8.33 şi 8,4 cm la tineret, pentru înălțimea la greabăn şi de 34,4 cm şi 40,7 cm la adulți şi de 32,16 şi 34,0 la tineret, pentru lungimea corpului.

Analizând dimensiunile corporale prezentate în tabelul 1, se constată faptul că la iepurii adulți nu există diferențe semnificative, între sexe, în privința taliei şi greutății corporale. Pentru lungimea corpului şi perimetrul toracic se înregistrează diferențe între masculi şi femele cu 6,3 şi respectiv 4,4 cm în favoarea masculilor

În privința tineretului cunicul se observă că acesta este mult mai omogen sub aspectul dezvoltării corporale; dimensiunile corporale studiate înregistrând valori foarte apropiate între sexe.

Tabelul 1. Valorile medii şi estimatele variabilității dezvoltării corporale la iepurii adulți şi tineretul cunicul

Categoria de vârstă	Numărul de exemplare	Statistici	Principalele dimensiuni corporale			
			Greutatea corporală (kg)	Înălțimea la grebăn (cm)	Lungimea corpului (cm)	Perimetrul toracic (cm)
Femele adulte	15	$\bar{x} \pm s\,\bar{x}$	3,7±340	9±0,547	34,4±5,363	27,5±1,462
		V%	19,84	13,55	34.76	10,97
		Limite de variație	2,5-4,4	7,8-10,7	25-40	25-33
Masculi adulți	4	$\bar{x} \pm s\,\bar{x}$	4,20±0,302	9,5±0,892	40,7±0,438	31,9±0,75
		V%	14,38	31,94	2,24	4,72
		Limite de variație	3,4-4,8	6,9-9,9	40-41	30-33
Tineret femel	16	$\bar{x} \pm s\,\bar{x}$	2,70±0,287	8,33±0,336	32,1±1,698	28,0±2,020
		V%	26,07	9,80	12,93	17,67
		Limite de variație	1,9-3,7	7,9-8,7	25-38	26-30
Tineret mascul	15	$\bar{x} \pm s\,\bar{x}$	2,78±0,251	8,4±0,404	34,0±1,048	28,4±1,128
		V%	18.92	10,64	6,89	9,15
		Limite de variație	2,2-3,3	7,8-9,2	32-38	25-33

Pornind de la semnificația heritabilitățiii în fundamentarea programelor de ameliorare la toate speciile, prezentăm, în tabelul 2, valoarea acesteia la caracterele analizate.

Astfel, valoarea lui h^2 pentru perimetrul toracic şi greutatea corporală încadrează aceaste însuşire ca fiind puternic determinate genetic, deşi datele din literatura de specialitate citează o valoare de 0,65 pentru greutatea corporală şi de numai 0,37 pentru perimetrul toracelui. Acest lucru vine să reconfirme faptul că heritabilitatea este un parametru statistic specific fiecărei populații şi fiecărei generații.

Înălțimea la grebăn, lărgimea şi lungimea crupei se încadrează în limitele însuşirilor intermediar determinate genetic (h^2 = 0,36-0,46), în timp ce pentru lungimea corpului valoarea lui h^2, de 0,206, o încadrează printre caracterele cu un determinism genetic slab.

Tabelul 2. Valorile coeficientului de heritabilitate pentru caracterele analizate

Caracterul	Coeficientul de heritabilitate
Greutatea corporală	0,611
Înălţimea la grebăn	0,459
Lungimea corpului	0,206
Perimetrul toracic	0,674
Lungimea crupei	0,362
Lărgimea crupei	0,428

Valorile coeficienţilor de corelaţie fenotipică între caracterele determinate la populaţia de iepuri analizată sunt prezentate în *tabelul 3.*

Tabelul 3. Valorile coeficienţilor de corelaţie fenotipică

Caracterul	R±RS	t calculat	t tabelar	Semnificaţii
Greutatea corporală adulţi × greutate tineret	0,43±0,27	0,70	0,631	*
Greutatea × lungimea corpului	0,59±0,21	2,20	0,764	***
Greutatea × perimetrul toracic	0,70±0,17	0,35	0,631	ns
Greutatea × lărgimea crupei	0,75±0,14	4,20	0,764	***
Perimetrul toracic × talia	-0,40±0,26	0,95	0,764	***
Lungimea crupei × lărgimea crupei	0,46±0,26	1,77	0,631	***
Lung. corpului × lărg. crupei	-0,50±0,25	1,15	0,631	***
Greutatea × lungimea crupei	0,49±0,25	1,94	0,631	***
Lungimea corpului × lungimea crupei	0,14±0,32	0,30	0,631	ns
Lungimea corpului × lărgimea corpului	-0,64±0,19	1,41	0,764	***
Lungimea corpului × perimetrul toracelui	0,48±0,25	1,57	0,631	***

Studiind corelaţiile obţinute între caracterele părinţilor şi a produşilor se constată diferenţe atât ca valoare cât şi ca sens. Asfel, s-au înregistrat corelaţii pozitive între greutatea corporală a părinţilor şi greutatea produşilor (R=0,43), între greutatea părinţilor şi lungimea corpului produşilor (R=0,59), între greutatea părinţilor şi lărgimea crupei la tineret (R=0,75). Acest lucru permite ca în cazul în care se face selecţie după greutatea corporală să se amelioreze, la produşii obţinuţi, şi caracterele cu care aceasta se corelează pozitiv.

Corelaţii negative s-au înregistrat între perimetrul toracic şi înălţimea la grebăn la descendenţi (R= - 0,40), între lungimea corpului şi lărgimea crupei la tineret (R= - 0,50) şi între lungimea corpului la adulţi şi lărgimea corpului la descendenţi (R= - 0,64). Rezultă că selecţionând animalele după lungimea mare a corpului vom determina o scădere a lărgimii crupei şi pieptului.

CONCLUZII

Din analiza principalelor dimensiuni corporale nu s-au constatat diferenţe semnificative, între sexe la iepurii adulţi, în privinţa taliei şi a greutăţii corporale. Diferenţele, de 4,4 cm la nivelul perimetrului toracic şi de 6,3 cm a lungimii corpului, în favoarea masculilor adulţi, demonstrează faptul că aceştia au însuşiri mai bune pentru producţia de carne.

Sub aspectul dezvoltării corporale în ansamblu, tineretul cunicul a fost mult mai omogen, ceea ce denotă o foarte bună potrivire a perechilor de părinţi.

Valorile coeficienţilor de heritabilitate pentru înălţimea la greabăn, lărgimea crupei şi lungimea crupei, se încadrează în limitele însuşirilor intermediar determinate genetic (h^2=0,36-0,46), iar pentru lungimea corpului (h^2 de 0,206) printre caracterele cu un determinism genetic slab.

Valorile lui h^2 pentru perimetrul toracic şi greutatea corporală, de 0,611 şi respectiv de 0,674 încadrează aceste însuşiri ca fiind puternic determinate genetic. Pentru aceste caractere literatura de

specialitate citează o valoare de 0,65 pentru greutatea corporală şi de numai 0,37 pentru perimetrul toracic de unde rezultă necesitatea calculării coeficienţilor de heritabilitatea pentru fiecare populaţie în parte.

Studiind corelaţiile obţinute între caracterele părinţilor şi produşilor s-au observat diferenţe atât ca valoare cât şi ca sens astfel: corelaţii pozitive s-au înregistrat între greutatea corporală a părinţilor şi greutatea produşilor, între greutatea părinţilor şi lungimea corpului la tineret, sau între greutatea părinţilor şi lărgimea crupei la tineret; corelaţiile negative sunt între perimetrul toracic şi talia la descendenţi, între lărgimea corpului şi lărgimea crupei la tineret şi între lungimea corpului la adulţi şi lărgimea corpului la descendenţi. Cunoaşterea corelaţiilor dintre caractere este deosebit de importantă în munca de ameliorare.

BIBLIOGRAFIE

1. COSTĂCHESCU, Elena, 2002- Iepuri animale de blană şi vânat. Editura SATYA. Iaşi.
2. COSTĂCHESCU, Elena, 1999 – Iepuri creştere valorificare şi patologie. Editura MOLDOGRUP, Iaşi.
3. BURA, M., 1994 – Creşterea iepurilor de casă. Editura Ceres, Bucureşti.
4. DRĂGĂNESCU, C.,1979 – Ameliorarea animalelor. Editura Ceres, Bucureşti.
5. SANDU, Gh., 1986 - Genetica şi ameliorarea iepurilor. Editura Ceres, Bucureşti.

OBSERVAŢII PRIVIND LEPTOSPIROZA CANINĂ ÎN MUNICIPIUL GALAŢI

OBSERVATIONS REGARDING CANINE LEPTOSPIROSIS IN GALATI

GHIORGHIŢĂ ILEANA[1], PERIANU T.[2]

Researches were made between July 2004 and May 2006 in CSV Galati area on 4392 dogs from different breeds and with different ages. We have sampled 142 dogs with icterus and we have performed the microscopic agglutination test using 8 serotypes of leptospira. The results showed that 82 (57, 74%) samples were positive and 60 (42, 26%) negative.

Most of the positive results were with Leptospira canicola 32(29,09%), followed in descending order by Leptospira tarrasovi (10,50%), Leptospira icterohaemorrhagiae (7,74%), Leptospira wolffi (5,60%), Leptospira grippothyphosa (4,92%), Leptospira hardjo (2,80%), Leptospira pomona (2,11%) and finally the less positive results with the serovariety Leptospira hebdomadis (1,40%).

Clinical examination revealed a sever icter, moderate dehydration, sensibility of the hepatic area and a body temperature of 39, 6˚C.

Serological examination of the samples from the dogs with clinical signs showed us seropositivity for Leptospira grippothyphosa on a titer higher than 1/3.200. the findings on necropsy were icterus of the abdominal skin, conjunctival and bucal icterus and a repellent smell.

Key words: leptospirosis , dog, diagnostic

INTRODUCERE

Populaţia canină prin modul de viaţă şi prin contactul cu animalele infectate, sau cu unele surse secundare, se poate contamina şi menţine astfel, atât serovarul Leptospira canicola cât şi alte serovaruri pentru care este gazdă tranzitorie (Moga, 2001 şi Perianu, 2003).

Având în vedere aceste aspecte epidemiologice, ale infecţiilor cu germeni din Genul Leptospira, la câini, există în permanenţă un risc privind contaminarea oamenilor, fie a persoanelor deţinătoare de câini, fie a personalului veterinar, fie a altor categorii sociale umane. În acelaşi timp, la acelaşi risc, sunt expuse şi animalele domestice care vin în contact strâns cu populaţia canină. De asemenea, prin modul lor de viaţă, câinii fără stăpân (comunitari), vin în contact şi cu mamiferele sălbatice contribuind la menţinerea lanţului epidemiologic, la închiderea circuitului natural al leptospirelor şi, în final, la menţinerea focalităţii naturale a acestor boli (Buiuc şi Neguţ 1999; Ivan 2002).

Din considerentele menţionate, cercetările efectuate au urmărit pe de o parte seroprevalenţa infecţiilor leptospirice la carnasierele de pe raza Municiupilui Galaţi, iar pe de altă parte de a stabilii serovarietăţile de Leptospire circulante.

MATERIALE ŞI METODE

Cercetările au fost realizate în perioada iulie 2004 – mai 2006, pe un număr de 4392 câini de rasă şi origini diferite, examinaţi clinic.

Din cei 4392 câini examinaţi un număr de 142 au prezentat colorație icterică, de la care s-a recoltat probe de sânge.

Serurile prelevate au fost examinate, prin reacţia de microaglutinare–liză (RML), faţă L.pomona, L.icterohaemorrhagiae, L.grippotyphosa, L.canicola,L. hebdomadis, L.wolffi, L.tarassovi şi L.hardjo, incluse în setul de diagnostic Leptotest (Tîrziu, 1997).

Pe o lamă de sticlă bine curăţată şi degresată s-a pus o picătură din suspensia de antigen (examinată microscopic, picatura va prezenta un număr mare de leptospire de formă spiralată cu mobilitate ridicată),

după care peste picătura de antigen s-a adăugat o picătură din serul de examinat. S-au omogenizat picăturile şi s-au lăsat acoperite cu o placă Petri timp de 10 – 15 minute la tempetatura camerei.

Din cei 142 de câini cu semne icterice, 3 au fost necropsiați, iar la 139 câini s-a aplicat tratamentul următor: dietă alimentară (brânzeturi, cartofi fierți, mucilagiu de orez), tratament simptomatic şi un tratament de susținere.

REZULTATE ŞI DISCUȚII

În aceeaşi perioadă iulie 2004 –mai 2006 s-au descoperit În urma examenului clinic efectuat, din cei 4.392 câini, un număr de 142 (3,23%) au prezentat semne icterice ale mucoasei bucale (fig.1), conjunctivale (fig.2.) şi în special colorația icterică a pielii din zona abdominală.

Fig.2. Colorația icterică a mucoasei conjunctivale

Fig. 1. Colorația icterică a mucoasei bucale

La examenul serologic prin testul de microaglutinare-liză al celor 142 probe de ser sanguin, față de 8 serotipuri de leptospire au s-au obținut rezultatele (tabelul 1 şi fig.3.).

Tabelul 1 Rezultatul examenului serologic pentru leptospiroză

Nr. crt.	Nr.probe examinate	Serotipul	Rezultatul obţinut			
			Pozitive		Negative	
			Nr.	%	Nr.	%.
1	142	L. pomona	3	2,11	139	97,89
2		L.ichterohaemorrhagiae	11	7,74	131	92,26
3		L.grippotyphosa	7	4,92	135	95,08
4		L.canicola	32	29,09	110	70,91
5		L.hebdomadis	2	1,40	140	98,60
6		L.wolffi	8	5,60	134	94,40
7		L.tarrasovi	15	10,50	127	89,50
8		L.hardjo	4	2,80	138	97,20
T o t a l	142		82	57,74	60	42,26

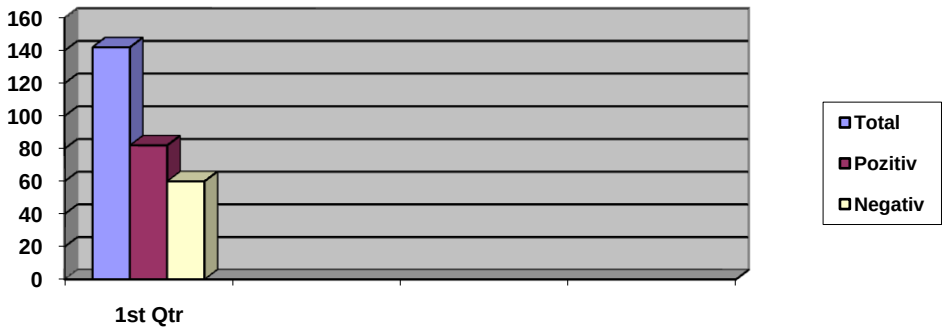


Fig.3. Rezultatul examenului serologic pentru leptospiroză

Din analiza rezultatelor se observă că din cele 142 probe de sânge examinate, un număr de 82 au reacţionat seropozitiv faţă de leptospire, ceea ce reprezintă 57,74%, iar 60 (42,26%) de probe au fost seronegative.

Rezultatele diferă şi în funcţie de serotipul de leptospiră.

Cele mai multe reacţii seropozitive s-au obţinut faţă de Leptospira canicola 32(29,09%), urmate în ordine descrescătoare de de Leptospira tarrasovi (10,50%), Leptospira icterohaemorrhagiae (7,74%), Leptospira wolffi (5,60%), Leptospira grippothyphosa (4,92%), Leptospira hardjo (2,80%), Leptospira pomona (2,11%) şi cele mai poţine reacţii seropozitive s-a înregistrat faţă de serovaritatea Leptospira hebdomadis (1,40%).

În România, o anchetă serologică efectuată în anul 1963 a stabilit că 29,3% din câinii examinaţi au prezentat infecţii leptospirice cu serovariantele: Leptospira canicola (17%), Leptospira icterohaemorrhagiae (9,7%) şi foarte rar cu altele (Leptospira pomona, Leptospira weilli, et.)

Cazul de leptospiroză clinică a evoluat în perioada de vară a anului 2004. O căţeluşă, cu numele Cora, din rasa Pechinez, în vârstă de 7 ani, vaccinată s-a prezentat la consultaţie cu stare de letargie, vărsături, diaree, pierdere în greutate şi o formă severă de icter.

Examinarea clinică a relevat icter pronunţat, deshidratare moderată, sensibilitate la palpare în zona hepatică şi temperatură corporală de 39,6˚C.

S-au recoltat probe de sânge şi de urină ce au fost examinate biochimic. La ecograf s-a observat ficatul mărit în volum, ecogenitate şi structură normală.

Examenul urinei a evidenţiat creşterea valoii bilirubinei, pH marit şi creştere semnificativă a glucozuriei, iar la examinarea probei de sânge s-a costatat o creştere a enzimelor hepatitice. Examenul serologic prin reacţia de microaglutinare-liză a serului, a evidenţiat reacţie pozitivă la titrul de 1:3200 faţă de Leptospira grippotyphosa.

CONCLUZII

Cercetările clinice şi serologice privind prevalența leptospirozei la canine din Municipiul Galați, au dus la desprinderea următoarelor concluzii:

1. Probele de ser sanguin recoltate de la 142 de câini examinate prin reacția de microaglutinare liză, față de 8 serovarietăți de leptospire au reacționat în 82 seropozitiv, reprezentând 57,74%, iar 60 (42,26%)de probe au fost negative.
2. Cele mai multe reacții seropozitive s-au obținut față de Leptospira canicola 32(29,09%), urmate în ordine descrescătoare de de Leptospira tarrasovi (10,50%), Leptospira icterohaemorrhagiae (7,74%), Leptospira wolffi (5,60%), Leptospira grippothyphosa (4,92%), Leptospira hardjo (2,80%), Leptospira pomona (2,11%) şi cele mai poține reacții seropozitive s-a înregistrat față de serovaritatea Leptospira hebdomadis (1,40%).
3. Examinarea clinică a relevat un icter pronunțat, deshidratare moderată, sensibilitate la palpare în zona hepatică şi temperatură de 39,6˚C.
4. Examenul serologic al probei recoltate de la câinele cu manifestări clinice a evidențiat seropozitivitate față de Leptospira grippothyphosa, la titru de 1/3.200.

BIBLIOGRAFIE

Abdussalam M. (1975) – Leptospiroza and Spirochaeta. – Symp. Bucharest, 113.
Acha M., Pedro B. Szyfres (1972) – Leptospiroza – Zoonoses. –Ed.II, Pg. 90-98.
Addamiano L., Babudieri B., Smith D.J.W. (1960) – Zwei neue zur Gruppe Leptospira canicola Gehörige serotypen. – Zbl. Bahk, I, ABT, OIE 180, 419-421.
Băieş I., Bran L. (1971) – Boli infecțioase ale animalelor domestice. – Ed. Didactică şi pedagogică, Bucureşti.
Bărzoi D., Stoenescu D., Drăgoi I. (1955) – Date expetrimentale cu privire la tratamentul şi profilaxia leptospirozei. – Bull. Informativ Zoo-veterinar, 3-4, p.20.
Bercea I. (1957) – Teză de doctorat.- Institutul Agronomic „Nicolae Bălcescu", Bucureşti.
Combiescu D., Botez V., Sturdza N., Munțiu N. (1952) - Leptospiroza câinilor (studiu experimental). –Comunicările Academiei R.P.R., 13.
Combiescu D., Botez V., Sturdza N., Drăgoi I.. (1952) – Cazuri de leptospiroză clinic aparentă într-un grup de câini.- Comunicările Academiei R.P.R., 13.
Constantinescu Veronica, Petriceanu Gela (1988) – Observații privind diagnosticul serologic al leptospirozei la animalele domestice în anii 1984-1987. – Zoonoze –Lucrările primului şi celui de-aol doilea simpozion național, Bucureşti.
Jivoin P.(1960) – Leptospirozele animalelor în R.P.R. –Zoonoze- Lucrările primului şi celui de-aol doilea simpozion național, Bucureşti.
Klarenbeek A.(1927) – Prezența spirochetei de tipul leptospiurei în rinichii câinilor bolnavi de icter şi febră tifoidă. – Ann.Inst. Pasteur.
Leluțiu C., Bărzoi D., Nicolaescu Al., Sotiriu E. (1961) – Leptospirozele animalelor domestice. – Ed. Agro-Silvică, Bucureşti.
Markin K.R., Gartrell L.C. (1966) – Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan 17 coses /1990-1995). – Am. Journal Hospital Ass. USA.
Perianu T.(1996) – Bolile infecțioase ale animalelor domestice.Bacterioze, Vol.I , Ed. Fundației „Chemarea", Iaşi.
Surdan C., Wynohradnyk L.W. (1960) – Considerații asupra leptospirozelor la animale în perioada 1950-1956. –Zoonoze-Lucrările primului şi celui de-al doilea simpozion național, Bucureşti.
Volintir V. (1975) – Patologia bolilor infecțioase la animale. – Ed.Didactică şi pedagogică, Bucureşti.

EVALUAREA INCIDENŢEI REZIDUURILOR DE ANTIBIOTICE DIN LAPTE ŞI A INFLUENŢEI LOR ASUPRA UNOR INDICI DE CALITATE AI LAPTELUI-MATERIE PRIMĂ CA PARTE A APLICĂRII PRINCIPIILOR HACCP[3]

EVALUATION OF THE MILK ANTIBIOTIC RESIDUES INCIDENCE AND OF THEIR INFLUENCE UPON SOME MILK QUALITY INDEXES AS PART OF THE HACCP PRINCIPLES IMPLEMENTATION

GRADINARU A. C.[1], HAVRISTIUC SIMONA[2], POPESCU O.[1]
[1]UŞAMV - Facultatea de Medicină Veterinară IAŞI;
[2]Universitatea „Ştefan cel Mare" – Facultatea de Inginerie Alimentară, SUCEAVA.

Investigations associated with the present work aimed to determine the incidence of some antibiotic residues in milk used as raw material for milk products, according to the HACCP principles, national and European Union legislation. Some milk quality indexes were also determinated in both positive and negative milk samples and comparisons of their values were made between the two types of samples.

5,64% of the milk samples proved to be positive for antibiotic residues. The analysis of the main milk quality values of these samples revealed the increase of both somatic cell and total germ comits. They also showed the decrease of some chemical parameters, e.q. fat, proteins and lactose contents in samples whose antibiotic residue levels were above the accepted maximal levels.

Keywords: antibiotic residues, milk, food safety, HACCP

Determinarea reziduurilor de antibiotice în lapte şi produse lactate are o importanţă deosebită atât din punct de vedere tehnologic, epidemiologic, cât şi din punct de vedere (eco)toxicologic în medicina veterinară şi a omului (2,4,6). Reziduurile de antibiotice din laptele-materie primă pentru produsele lactate inhibă dezvoltarea bacteriilor lactice din maiele şi influenţează calitatea produsului finit; ele favorizează apariţia unor suşe bacteriene antibiorezistente şi pot produce stări acute de tip alergic şi toxic la om şi animale (1,3,5).

Investigaţiile aferente prezentei lucrări au urmărit determinarea incidenţei unor reziduuri de antibiotice în laptele-materie primă, conform principiilor HACCP şi în acord cu legislaţia naţională şi comunitară în vigoare (7,8). Au fost determinaţi, de asemenea, unii indicatori de calitate ai laptelui (număr de celule somatice, număr total de germeni, grăsime, proteine, lactoză) în probele pozitive şi negative pentru antibiotice şi s-au făcut comparaţii ale valorilor lor în raport cu prezenţa sau absenţa reziduurilor de antibiotice.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate în perioada 2006- apr. 2009 în cadrul unei unităţi de prelucrare a laptelui şi produselor lactate din zona Moldovei.

[3] parte din investigaţiile prezentate în această lucrare au fost finanţate din contractul de cercetare nr.77/15.09.2008, cod proiect: TD 286, Programul Resurse Umane, CNCSIS.

Materialul de lucru a fost reprezentat de un număr de 372 probe de lapte recoltate la recepţionarea lor în cadrul unităţii procesatoare. Probele au fost recoltate şi pregătite în aşa fel încât să exprime cât mai real caracteristicile laptelui şi să fie suficiente pentru executarea analizelor şi, eventual, repetarea lor.

Probele de lapte au fost analizate cu ajutorul unor dispozitive automate, special concepute pentru analiza principalilor parametri de calitate ai laptelui. Astfel, pentru determinarea constantelor fizico-chimice s-a utilizat dispozitivul *LactoStar* (Producător: Funke-Gerber, Germania), pentru determinarea numărului total de germeni s-a folosit analizatorul *Soleris* (Producător: Centrus International Inc.,USA) iar stabilirea numărului de celule somatice s-a realizat cu ajutorul analizatorului automat *Ekoscope* (Producător: EON Trading LLC, USA).

Pentru identificarea reziduurilor de antibiotice din laptele-materie primă s-a folosit dispozitivul *Ekotest* (Producător: EON Trading LLC, USA). Acest instrument de analiză prezintă o sensibilitate crescută faţă de majoritatea antibioticelor folosite în terapia bovinelor, se efectuează într-o perioadă scurtă de timp iar interpretarea rezultatelor este facilă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele investigaţiilor efectuate evidenţiază următoarele: din totalul de 372 probe de lapte examinate, 21 de probe de lapte au fost depistate pozitiv faţă de prezenţa reziduurilor de antibiotice, reprezentând un procent de 5,64% (tabel nr.1). Unitatea de procesare are implementat sistemul HACCP de siguranţă alimentară. Astfel, laptele depistat neconform la poarta de intrare nu a fost introdus în fluxul tehnologic, în acest fel prevenindu-se contaminarea unor cantităţi mai mari de lapte şi obţinerea unor produse finite necorespunzătoare calitativ.

Tabel 1
Interpretarea rezultatelor pentru identificarea reziduurilor de antibiotice prin analiza Ekotest

Interpretarea rezultatelor Ekotest	Rezultate obţinute	
	Nr.	%
Probe (-)	351	94,36
Probe (+)	21	5,64
TOTAL	372	100

Ulterior, s-a urmărit variaţia principalilor indicatori de calitate ai laptelui, în funcţie de prezenţa sau absenţa reziduurilor de antibiotice în probele analizate (tabel nr. 2).

Tabel 2
Variaţia principalilor indicatori de calitate ai laptelui în raport cu prezenţa sau absenţa reziduurilor de antibiotice în probele analizate

Reziduuri de antibiotice *Antibiotic residues*	NCS x 1000/ml	NTG x 1000/ml	Grăsime % *Fat %*	Proteine % *Proteins %*	Lactoză % *Lactose %*
Absente *Absent*	118.23±26,2	58.03±9.6	4.24±0.19	3.17±0.23	5.33±0.14
Prezente *Present*	1227.5±64.8	387.4±31.5	3.7±0.21	3,02±0.15	4.52±0.33
Valori normale *Normal values*	<400	<100	2,8 – 6	3 – 3.5	2,84– 7,66

Din observaţiile noastre, laptele depistat fără reziduuri de antibiotice se încadrează pentru toţi ceilalţi indicatori analizaţi în limitele normale de calitate, conform standardelor în vigoare. Concentraţiile medii înregistrate sunt de 4,24% pentru grăsime, 3,17% pentru proteine şi 5,33% pentru lactoză. Numărul de celule somatice înregistrează o medie de 118.230/ml iar numărul total de germeni se încadrează în intervalul 58,03±9,6 (x1000)/ml.

În probele de lapte ce conţin reziduuri de antibiotice peste limita maximă admisă se constată creşterea valorilor numărului total de germeni şi numărului de celule somatice, datele înregistrate depăşind limitele normale prevăzute ca standard. De asemenea, se observă scăderea cu aproximativ 12,74% a cantităţii de grăsime, 4,73% a cantităţii de proteine şi 15,2% a cantităţii de lactoză, raportarea facându-se faţă de valorile medii înregistrate la analiza aceloraşi constante în laptele fără reziduuri de antibiotice.

CONCLUZII

1. În 5,64% din probe au fost depistate reziduuri de antibiotice peste Limita Maximă Admisă;
2. Prezenţa reziduurilor de antibiotice în probele examinate s-a corelat cu creşterea valorilor numărului de celule somatice şi a numărului total de germeni;
3. Analiza unor componente ale laptelui, de exemplu cantitatea de grăsime, proteine şi lactoză în probele cu reziduuri de antibiotice, a identificat o scădere a acestora faţă de normalul loturilor examinate;
4. Implementarea sistemului HACCP de siguranţă alimentară a contribuit la depistarea laptelui neconform încă de la etapa de recepţie a acestuia, prevenindu-se astfel contaminarea unei cantităţi mai mari de lapte-materie primă.

BIBLIOGRAFIE

1. GEORGESCU G., 2005 – „Cartea producătorului şi procesatorului de lapte”, vol. 4, Editura Ceres, Bucureşti;
2. HUY Y.H., 1993 – „Dairy science and technology handbook.Technology and engineering”, V.C.H. Publishers, New-York;
3. ROTARU O., MIHAIU M., 2002 – „Igiena veterinară a produselor alimentare – patologie prin alimente”, Editura Todesco, Cluj-Napoca;
4. SAVU C., GEORGESCU Narcisa, 2004 – „Siguranţa alimentelor – riscuri şi beneficii”, Editura Semne, Bucureşti;
5. SISCHO W.M.,1996 – „Quality milk and tests for antibiotic residues”, Journal of Dairy Science, vol. 79, nr.6,p.1065-1073;
6. ŞINDILAR E., 1998 – „Controlul igienic al produselor şi subproduselor de origine animală”, vol.2, Editura Moldogrup, Iaşi;
7. *** Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (OJ No L 224, 18. 8. 1990, p. 1). Last amended by Commission Regulation (EEC) No 675/92 (OJ No L 73, 19. 3. 1992, p. 8).
8. *** Ordin nr. 95/2007, Publicat în Monitorul Oficial nr. 272 din 24/04/2007, pentru aprobarea Normei Sanitare Veterinare privind măsurile de supraveghere şi control al unor substanţe şi al reziduurilor acestora la animalele vii şi la produsele de origine animală;
9. *** SR EN ISO 2418/61 – “Lapte şi produse lactate. Proprietăţi organoleptice şi fizico-chimice a laptelui crud integral.”, modificat şi înlocuit cu SR EN ISO 2418/2008 – “Lapte crud integral. Cerinţe de calitate”.

EVALUAREA UNOR REZIDUURI DE XENOBIOTICE ELEMENTARE (PB,CU,CD,ZN) ÎN LAPTELE DE COLECTURĂ RECOLTAT DIN ZONA MOLDOVEI[4]

EVALUATION OF SOME XENOBIOTIC TRACE ELEMENT RESIDUES (PB, CD, CU, ZN) IN THE BULK MILK SAMPLES COLLECTED FROM THE MOLDAVIAN FARMS

GRADINARU A. C., SOLCAN GH., MUNTEANU Alina, POPESCU O.
[1]USAMV - Facultatea de Medicină Veterinară Iaşi

The determination of the toxic metal residues in milk has a considerable importance, particularly due to their toxic effects on the consumers and their interference with the milk product technologies.

Investigations associated with this work aimed to establish the quality of the raw milk material by the toxic metal (Pb, Cu, Cd, Zn) residue analysis, according to the national and European Union legislation. The results showed no milk contamination with lead and cadmium. The values obtained for copper and zinc residues ranged between 0.1 - 0.5 mg / kg for the former and 2.1 - 4.88 mg / kg for the latter. The contamination with these two elementary xenobiotics was predominant in the warm season.

Key words: lead, cadmium, cooper, zinc, milk, food safety

Dezvoltarea sistemului intensiv de creştere şi exploatare al plantelor şi animalelor, industrializarea şi urbanizarea determină poluarea excesivă a mediului care conduce prin lanţul trofic terestru la contaminarea laptelui, în particular cu metale toxice(3,4,6). Determinarea reziduurilor de metale toxice din lapte are o importanţă epidemiologică deosebită, în special datorită efectelor toxice asupra consumatorului direct, cât şi datorită implicaţiilor tehnologice, prin influenţarea negativă a unor procese de coagulare ale laptelui (1,2,5).

Investigaţiile asociate prezentei lucrări au urmărit stabilirea nivelului de calitate a laptelui materie primă prin determinarea valorilor unor reziduuri de metale toxice (Pb,Cu,Cd,Zn), conform cu legislaţia naţională şi a Uniunii Europene în vigoare(7,9).

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate în perioada 2006 – 2008 şi au urmărit evaluarea unor reziduuri de xenobiotice elementare (Pb,Cu,Cd,Zn) în laptele de colectură folosit ca materie primă în cadrul unei unităţi de prelucrare a laptelui din zona Moldovei. Pe parcursul studiului au fost examinate un total de 56 probe de lapte de colectură, câte 28 probe pentru fiecare sezon (sezonul cald: *martie – septembrie*, sezonul rece: *octombrie – februarie*).

Probele de lapte au fost recoltate şi pregătite în aşa fel încât să exprime cât mai real calităţile laptelui şi să fie suficiente pentru efectuarea analizelor şi, eventual, repetarea lor. Astfel, s-a avut în vedere omogenizarea manuală cât mai eficientă a laptelui înainte de recoltare, recoltarea unui volum adecvat de probă – 500 ml, conservarea optimă a probelor (temperaturi de 0-4^{0}C) şi transportarea lor cât mai rapidă către laboratorul de analize.

[4] parte din investigaţiile prezentate în această lucrare au fost finanţate din contractul de cercetare nr.77/15.09.2008, cod proiect: TD 286, Programul Resurse Umane, CNCSIS.

Metoda utilizată pentru determinarea xenobioticelor elementare a fost reprezentată de *spectrofotometria de absorbţie atomică*. Plumbul şi cadmiul au necesitat *spectrofotometria de absorbţie atomică cu cuptor de grafit*, în timp ce zincul şi cuprul au putut fi analizate prin *spectrometrie de absorbţie atomică în flacără*. Limitele de detecţie ale metodei utilizate sunt în acord cu legislaţia naţională şi comunitară privind limitele maxime admise de reziduuri în laptele destinat consumului alimentar.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele investigaţiilor cu privire la nivelul mediu de Pb, Cu, Cd şi Zn în laptele materie primă, sunt redate în tabelul nr. 1. Valorile medii obţinute variază în funcţie de elementul analizat şi sezonul în care au fost recoltate probele de lapte (tabel 1, figura 1).

Tabel 1

Variaţia gradului de contaminare a laptelui cu xenobiotice elementare (Pb,Cu,Cd,Zn)

Denumire probă	Sezon	Nr. probe	Xenobiotice elementare determinate			
			Pb (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Lapte de colectură	Cald (martie-septembrie)	28	<LOD*	0,1 – 0,5 0,32	<LOD*	2,15 – 4,88 3,35
	Rece (octombrie – februarie)	28	<LOD*	0,1 – 0,5 0,28	<LOD*	2,1 – 4,72 3,02
LOD*			0,002	0,1	0,02	0,02
*LMA***			*0,1*	*0,5*	*0,01*	*5*
LMA /MRL***			0,02	-	-	-

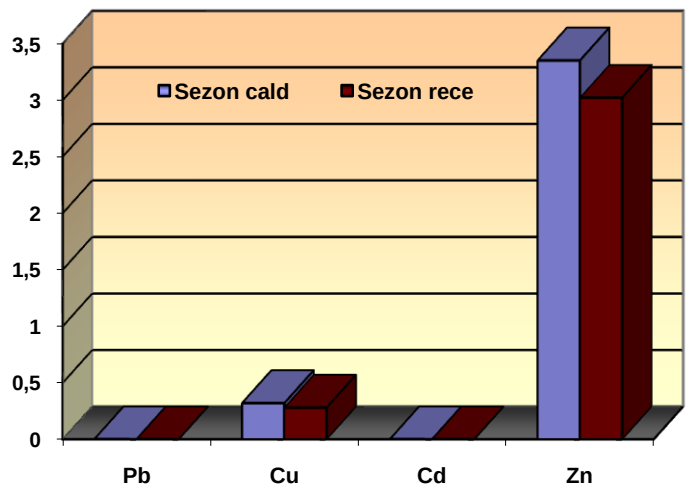
* LOD – Limit of Detection (Limita minimă de detecţiei a metodei)

** LMA – Limită Maximă Admisă (conform Ordinului ANSVSA nr.97/2005);

*** LMA / MRL – Limită Maximă Admisă / Maximum Residue Limits (conform Ordinului ANSVSA nr.121/2007, Council Regulation (EC) No 1881/2006).

Figura 1

Variaţia sezonieră a gradului de contaminare a laptelui cu xenobiotice elementare (Pb,Cu,Cd,Zn)



Investigaţiile efectuate au arătat că laptele materie primă nu conţine *plumb şi cadmiu*, indiferent de sezonul în care au fost recoltate şi analizate probele de lapte sau, aceste reziduuri au fost sub limita de detecţie a aparatului.

Valorile medii ale cuprului din probele analizate au fost de *0,32 mg/kg* pentru probele recoltate în timpul sezonului cald şi *0,28 mg/kg* pentru probele de lapte recoltate în timpul sezonului rece, cu limite comune de variaţie cuprinse între *0,1 – 0,5 mg/kg*.

Zincul a prezentat valori cuprinse între *2,15 – 4,88 mg/kg*, cu o medie de *3,35 mg/kg*, pentru probele recoltate în timpul sezonului cald. Limita de variaţie a fost cuprinsă între *2,1 – 4,72 mg/kg*, cu o medie de *3,02 mg/kg* pentru conţinutul în zinc al probelor de lapte recoltate în timpul sezonului rece.

Variaţia sezonieră a conţinutului de zinc şi cupru în probele de lapte analizate poate fi atribuită condiţiilor de mediu, specificului alimentaţiei din timpul celor două sezoane, intensificării în sezonul cald a lucrărilor în agricultură şi a tratamentelor specifice de combatere a dăunătorilor.

Chiar dacă limitele maxime admise pentru cupru şi zinc nu sunt normate în noua legislatură adoptată *(Ordinul ANSVSA nr.121/2007, Council Regulation no.1881/2006),* valorile obţinute nu depăşesc limitele prevăzute în *Ordinul ANSVSA nr.97/2005*.

Controlul reziduurilor chimice din produsele alimentare de origine animală, în particular din lapte, reprezintă un demers indispensabil în garantarea siguranţei consumatorului. Prezenţa acestor elemente în lapte poate constitui un risc pentru consumatori, datorită posibilităţii de acumulare în produsele lactate.

CONCLUZII

1. Reziduurile de plumb şi cadmiu au fost absente în probele analizate;
2. Zincul şi cuprul au înregistrat valori cuprinse între 2,1 – 4,88 mg/kg, respectiv 0,1 – 0,5 mg/kg, concentraţiile medii încadrându-se în normativele legale;
3. Valorile medii obţinute pentru cupru şi zinc sunt mai mari pentru probele recoltate în timpul sezonului cald faţă de cele recoltate în timpul sezonului rece.

BIBLIOGRAFIE

1. BANU C., BĂRAŞCU Elena, STOICA Al., NICOLAU Anca, 2007 – „Suveranitate, securitate şi siguranţă alimentară”, Editura ASAB, BUCUREŞTI;
2. BONDOC I., 2007 – „Tehnologia şi controlul calităţii laptelui şi produselor lactate”, Vol.1, Editura ION IONESCU de la BRAD, IAŞI;
3. ENACHE T., POPESCU O., 1996 – „Medicină legală veterinară”, Vol.2, Editura ALL, BUCUREŞTI;
4. LEES Michèle, 2000 – „Food authenticity and traceability”, CRC PRESS, U.S.A;
5. SAVU C., GEORGESCU Narcisa, 2004 – „Siguranţa alimentelor – Riscuri şi beneficii”, Editura SEMNE, BUCUREŞTI;
6. SOLCAN Gh., BESCHEA CHIRIAC I.S., 2005 – „Toxicologie veterinară – manual practic”, Editura TEHNOPRESS, IAŞI;
7. *** - Council Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, published in Official Journal No. L 364 of 20 December 2006;
8. *** - Ordin nr. 97/2005 al Preşedintelui Autorităţii Naţionale Sanitare Veterinare şi pentru Siguranţa Alimentelor privind aprobarea Normei sanitare veterinare şi pentru siguranţa alimentelor privind anumiţi contaminanţi din alimentele de origine animală şi nonanimală, publicat în M.Of. nr.1056 din 26/11/2005;
9. *** - Ordin nr. 121 /2007 al Preşedintelui Autorităţii Naţionale Sanitare Veterinare şi pentru Siguranţa Alimentelor privind anumiţi contaminanţi din alimentele de origine animală şi nonanimală, publicat în M.Of. nr.509 din 30/07/2007;
10. *** - SR EN 14082/2003 – „Produse alimentare. Determinarea microelementelor. Determinare plumb, cadmiu, zinc, cupru, fier şi crom prin spectrometrie de absorbţie atomică (SAA) după calcinare”;
11. *** - SR EN 14083/2003 – „Produse alimentare. Determinarea microelementelor. Determinare plumb, cadmiu, crom şi molibden prin spectrometrie de absorbţie atomică cu cuptor de grafit (GFAAS) după digestie sub presiune”.

AEROMONOZE DE PRIMĂVARĂ LA CIPRINIDELE DE CRESCĂTORIE

SPRING AEROMONOSES AT FARMS CIPRINIDES

GUGUIANU ELEONORA [1], VULPE V.[1], RIMBU CRISTINA [1], ROSCA LILIANA [2], LAZAR M. [1]
[1] FMV , IAŞI
[2] DSVSA IAŞI

One of the main causes of economic losses in the fish farms is represented by localized and septicemic infections caused by comensale conditioned pathogenic species of the genre Aeromonas. Pathogenicity exhibition of these germs is influenced by the appearance of some holes in the antiinfectious natural barriers system caused by various endogenous and environmental factors. Favourising factors frequently involved in triggering these infections are heat stress, injuries and stress produced by handling, skin parasitosis, overcrowded spaces, improper physical-chemical water parameters (4,5,6).

Aeromonoses diagnosed at ciprinides of two fish farms (A and B) of Iasi County, during March-April periode of the current year have been favored by low water temperature, infestation with Lernaea sp. and the inappropriate aquatic environment report content as nitrites and ammonia.

Clinical symptoms was characterized by adynamia, swimming float, a state of hypoxia, mortality between 80-100%. Lesions were of bleeding, necrotic and ulcerative type, located predominantly on the skin and fins. Bacteriological examinations made from skin lesions, kidney, liver and blood, incriminated in etiology A. hydrophila apecie, in combination with Aeromonas caviae and/or A. sobria.

Key words: aeromonoses, water, fish

MATERIAL ŞI METODĂ

Investigaţiile parazitologice şi bacteriologice s-au efectuat pe crap oglindă, caras, crap fitofag recoltaţi din ferma A şi pe crap oglindă crescut în monocultură provenit din unitatea B. În paralel s-au efectuat unele examene fizico-chimice ale apei din bazinele cu peşti bolnavi: temperatura , pH, concentraţia nitriţilor, nitraţilor, amoniului, clorurilor şi oxigenului dizolvat.

După inventarierea leziunilor externe ale peştilor, s-au efectuat frotiuri colorate prin metoda Gram din ulcerele cutanate şi însămânţări din ulcere, rinichiul anterior, sângele din cord , iar de la caras şi din ficatul cu leziuni. Mediile utilizate au fost geloza nutritivă şi BHI (bulion creier-cord) – mediu pe care iniţiază culturi majoritatea bacteriilor patogene pentru peşti.

Mediile însămânţate au fost incubate la 25^0C, 24-48 ore, iar identificarea culturilor obţinute s-a bazat pe testarea caracterelor metabolice. Deoarece pe baza aspectelor lezionale, a examenului microscopic direct şi al culturilor s-a suspectat implicarea etiologică a bacteriilor din genul *Aeromonas,* din fiecare placă au fost repicate colonii în scopul confirmării biochimice. Iniţial s-a efectuat testul oxidazei, care departajează *Aeromonas spp*. de enterobacteriacee, apoi testele de diferenţiere a speciilor în cadrul genului: fermentarea glucozei şi testul hidrogenului sulfurat utilizând mediul TSI , hidroliza esculinei, fermentarea arabinozei şi salicilinei, reacţia Voges-Proskauer, examenul mobilităţii pe mediul MIU (1,2,3,5).. Tulpinile bacteriene care au reacţionat atipic la unele teste au fost retestate cu ajutorul galeriilor API 20 NE. Antibiogramele au fost efectuate prin metoda difuzimetrică.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Examenul extern a evidenţiat la crapii din ambele unităţi, prezenţa de peteşii, necroze şi ulcere cutanate superficiale şi profunde înconjurate de un halou hiperemic (fig. 1 A;B;C). Procesul necrotic a interesat uneori şi aripioarele, în special aripioara dorsală şi cea caudală, mergând până la amputarea lor (fig.2 A). Unele exemplare au prezentat abdomen ascitic, melanoză şi exoftalmie (fig.1 C şi fig 2 A, B). .

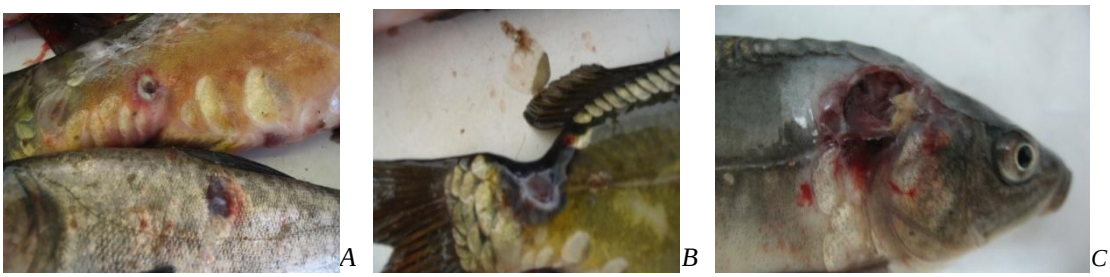


Fig.1 A;B;C - Aspecte lezionale la crapul fitofag şi crapul oglindă: hemoragii şi ulcere cutanate cu diverse localizări, exoftalmie.

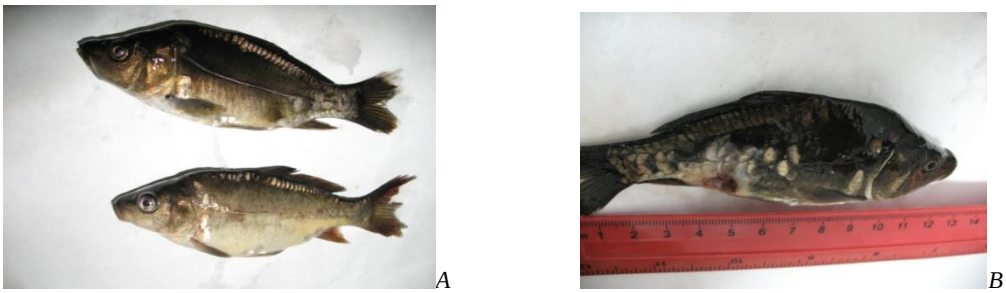


Fig. 2 - A – crapi cu ascită, exoftalmie, melanoză, necroza aripioarei caudale; B – crap cu hemoragii perianale şi melanoză accentuată.

În plus, la crapii din unitatea B s-au depistat la nivelul pielii, paraziţi din genul Lernaea.

La examenul morfopatologic, caraşii au prezentat leziuni de diateză hemoragică: peteşii cutanate şi branhiale, hemoragii la nivelul membranei aripioarelor , musculaturii şi ficatului (fig. 3 A; B; C)..

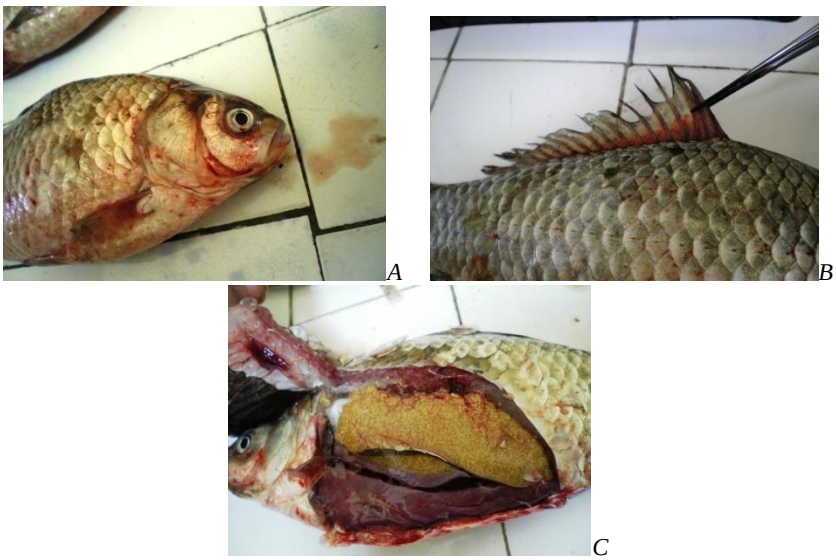


Fig. 3 A; B; C - Caraşi cu leziuni externe şi interne de tip hemoragic

Examenul microscopic al amprentelor din ulcerele cutanate la crapii oglindă şi fitofagi au evidenţiat numeroşi bacili şi cocobacili Gram negativi (fig. 4), bacterii care au dezvoltat pe geloza nutritivă, colonii netede, nepigmentate sau uşor pigmentate în crem.

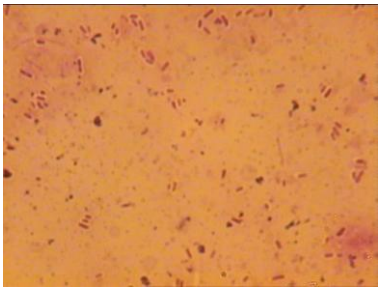


Fig.4 - Frotiu din ulcer cutanat la crap. Coloraţia Gram. 90x5

Culturi cu aceleaşi caracteristici s-au dezvoltat din rinichiul anterior şi sângele crapilor, dar şi din ficatul caraşilor examinaţi (fig.5).

Fig.5 – Aspectul culturilor pe geloză nutritivă după 24 ore de incubaţie la 25^0 C.

Toate tulpinile testate au fost mobile şi oxidază pozitive dar au reacţionat diferit la celelalte teste, pe baza cărora au fost încadrate taxonomic în speciile *A. hydrophila, A., caviae şi A. sobria* (tabelul 1).

Tabelul 1
Rezultatele testărilor biochimice a tulpinilor bacteriene izolate de la peşti

TESTUL	*A. hydrophila*	*A.. caviae*	*A.. sobria*
Glucoză (+gaz)	+	-	+
Esculină	+	+	-
Arabinoză	+	+	-
Salicilină	+	-	-
Voges-Proskauer	+	-	+
H_2S	+	-	+

La crapii din ambele unităţi, din ulcerele cutanate s-au izolat culturi mixte de *Aeromonas spp*, iar din rinichi şi sânge, *A. hydrophila* în culturi pure şi în asociere cu una din celelalte două specii sau cu ambele specii. Din prelevatele de la caraşi (sânge din cord, rinichi) s-au izolat culturi pure de *A. hydrophila*

Coroborând aspectele anatomoclinice cu rezultatele examenelor bacteriologice, s-a stabilit diagnosticul de eritrodermatită la crap şi septicemie hemoragică bacteriană la caras.

Rezultatele examenelor fizico-chimice ale apei au condus la concluzia că aeromonozele diagnosticate au apărut pe fondul imunosupresiei induse de temperatura apei (10-15^0 C), situată sub limita confortului termic al ciprinidelor (22 -25^0 C) şi stresul chimic cauzat de conţinutul mare în nitriţi (1,32 mg/ml faţă de 0,04 mg/ml – limita maximă admisă) şi amoniu (0,485 mg/ml, faţă de 0,2 – 1,00 mg/ml) al apei din unitatea B.. În aceeaşi unitate (B), un rol major în apariţia eritrodermatitei l-au avut leziunile cutanate produse de paraziţi , care au constituit porţi de intrarea pentru germenii oportunişti.

Antibiogramele au evidenţiat o antibiorezistenţă de tip ,,multi-steep", 20% din tulpinile testate fiind rezistente la mai mult de 4 antibiotice.

Toate tulpinile au fost sensibile la neomicină, gentamicină, cloramfenicol şi ciprofloxacin şi au manifestat rezistenţă la ampicilină. Majoritatea tulpinilor (75%) au manifestat sensibilitate la asocierea amoxicilin şi acid clavulanic**.**

CONCLUZII

1. În perioada martie-aprilie 2009 a fost semnaltă evoluţia eritrodermatitei şi a septicemiei hemoragice bacteriene la ciprinidele de crescătorie.
2. Diagnosticul a fost stabilit prin coroborarea aspectelor clinice şi morfopatologice, cu rezultatele examenelor microbiologice.
3. Agenţii etiologici incriminaţi au fost *A. hydrophila, Aeromonas caviae* şi *A. sobria.*
4. Aeromonozele diagnosticate au fost favorizate de temperatura scăzută a apei, infestaţia cu *Lernaea sp*. şi mediul acvatic impropriu sub raportul conţinutului în nitriţi şi amoniu.
5. Tulpinile bacteriene izolate au manifestat sensibilitate de 100% faţă de neomicină, gentamicină, cloramfenicol şi ciprofloxacin şi în proporţie de 65% , la asocierea amoxicilin - acid clavulanic.
6. Toate tulpinile de *Aeromonas* au fost rezistente faţă de ampicilină..

BIBLIOGRAFIE

1. Austin B., Austin D. A., 2007 – Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish. Fourt edition. Praxis, Publishing Ltd, Chichester, UK.
2. Buller N.B., 2003 – Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. Cabi Publising.
3. Edward J. Noga, 1999- Fish disease- diagnosis and treatment. Ed. Iowa State University Press, Iowa, USA.
4. GHITTINO, P., 1985 - Tecnologia e patologia in aquacoltura, Vol 2, Patologia; Tipografía Emilio Bono, Torino.
5. GUGUIANU ELEONORA, MIRON L., 2002 – Elements of ihtio-pathology. Edit. PIM, Iaşi.
6. JANA B.B., CARL D., Ph.D. WEBSTER, 2003 – Sustainable Aquaculture: Global Perspectives. Food Products Press.

EFFECTS OF MILK FERMENTED WITH LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS AND BIFIDOBACTERIUM ON YOGHURT QUALITY AND GLUCOSE CONTENT

HENDRONOTO ARNOLDUS WALEWANGKO LENGKEY, LOVITA ADRIANI
Faculty of Animal Husbandry, Padjadjaran University, Bandung, INDONESIA
hawlengkey@yahoo.com

The aim of this research are comparing the yoghurt quality and the glucose content, for the effect to the consumers. The samples are the yoghurt fermented with Lactbacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus compared to the yoghurt fermented with Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium. Results indicated that the quality of both yoghurt has no significancy, but the yoghurt fermented with Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium, has lower glucose content; but still in the normal range than the Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus fermented yoghurt.

Key words: yoghurt, Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus.

Industrial microbiologists have extended the term fermentation to discribe any process for the production of product by the mass culture of a micro-organism.

Contamination during milking and milk handling will result in a large variety of micro-organisms starting to develop after milk has been drawn. But in most cases lactic acid bacteria (LAB) will become predominant by overgrowing the other bacteria. The acid produced is generally not considered unpleasant by the consumer and because it also suppresses pathogenic as well as proteolytic and lipolytic bacteria it actually helps to preserve milk. From a comparison of the various fermented liquid milk products produced in the world, all products can be classified in a few groups. The principal differences between these groups depend on: the type of milk used, the type of fermenting flora, and the way the milk is processed either before or after fermentation. The flora that is found in indigenous fermented milk products largely depends on the ambient temperature and the character of the contaminating bacteria. Some LAB are mesophilic, others are thermophilic. The LAB can be characterized by the way they ferment lactose in milk after this disaccharide has been transformed into two monosaccharides, viz. glucose and galactose (Stanbury and Whitaker, 1984).

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). In many fermented products, the presence of specific micro-organisms other than LAB may determine the character of the product. The *Streptococcus sp.* that homofermentative will produce diacetyl, but the *Lactobacillus acidophilus*, also homofermentative does not producing diacetyl (van den Berg, 1988).

The aim of this work is comparing the effect of using the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* as cultures on the yoghurt quality and glucose content in mice blood.

MATERIALS AND METHODS

The milk. Raw milk (cow milk) from farm animals at the faculty.

The bacteria. The bacteria are pure cultivated *Bifidobacterium, Lactobacillus acidophillus, Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. The identification of the cultures was based on the characteristics of the lactobacilli and streptococci as described in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, et al, 1994).

Yoghurt quality, was tested by preference test and for the glucose content we used mice as animal test. The parameter for yoghurt quality are preference test and pH.

Blood glucose content in mice after three weeks treatment with 1.25% and 2.00 % dosage.

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of the treatment on pH yoghurt.

The pH or the hydrogen ion concentration of yoghurt indicates its real acidity. In Table 1, presents the results of the yoghurt pH for each yoghurt (*Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, and *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus*).

Table 1. pH yoghurt

No.	Yoghurt starters	pH
1	*Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus*	4.01
2	*Bifidobacterium and Lactobacillus acidophilus*	4.64

Streptococcus thermophilus is homofermentative and is especially found in thermophilic starters and cultures, that are particularly suitable for products culture such as yoghurt, and producing diacetyl. *Lactobacillus bulgaricus* which, together with *Streptococcus thermophilus* is known for its capacity to produce the flavour component acetaldehyde in addition to diacetyl. Greater acid prodution is obtained when the two organisms are growing together than if grown separately. This is due to the proteolytic action of *Lactobacillus bulgaricus*, whereby valin, which stimulates the growth and acid production of the streptococci, is released. *Streptococcus thermophilus*, however, also produces a stimulant for the growth of lactobacilli; this agent has been proved to be formic acid.

Lactobacillus acidophilus is a slow acid producer in cultures used for the production of yoghurt that has a plain acid flavour, and may be combined with other bacteria to obtain a more palatable product. *Lactobacillus acidophilus* grows very slowly in milk and therefore it is important to protect the milk against contamination. The milk has no real aromatic flavour and is frequently recognized as too sour, so it is sometimes mixed with other bacteria. The reason for using *Bifidobacterium* in place of *Lactobacillus bulgaricus* is that *Bifidobacterium* produces the physiologically active D(+)-lactic acid.

The acidity of the yoghurt using *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* (pH 4.64), are lower than the yoghurt with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* starters (pH 4.01); because they produced slightly lower of lactic acid and higher acetic acid.

Preference test.

For preference test, we're using 20 well trained tester, for testing the colour, aroma, taste, consistency, and texture. In Table 2, presents the results of the preference test.

Table 2. Preference test

Yoghurt	Consumer Preferency					
	Colour	Aroma	Taste	Consistency	Texture	Average
A	3.25	2.70	3.05	3.20	3.15	3.07
B	3.35	3.30	2.80	2.95	3.00	3.08

Notes : A = Lactobacillus bulgaricus : Streptococcus thermophilus = 1 : 1

B = Bifidobacterium : Lactobacillus acidophilus = 1 : 1

Scale : 1 = dislike extremely

2 = dislike moderately

3 = moderately

4 = like moderately

5 = like extremely

From Table 2, the average of the preference test has no significancy. It means that the consumer could accept both yoghurt. Even the yoghurt from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* starter has

slightly higher score than the yoghurt with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* starter, and also for colour, and aroma, but has lower score for taste, consistency and texture.

Glucose content.

The glucose content in mice blood, was tested after 7 weeks of the trial. In Table 3, presents the results of the glucose content that was tested after 7 weeks trial, and after 3 hours the mice consumpt with 1.25% and 2.00% yoghurt.

Table 3. Blood glucose content in mice (mg/100 ml)

Dosage (%)	Yoghurt			
	A	A	B	B
	Male	Female	Male	Female
1.25	171	176	136	137
2.00	176	177	165	166

Notes : A = Lactobacillus bulgaricus : Streptococcus thermophilus = 1 : 1
B = Bifidobacterium : Lactobacillus acidophilus = 1 : 1

After 7 weeks treatment with 1.25% and 2.00% dosage in male and female mice, and 3 hours after consumpt; the average of blood contents are varied between 136 mg/100ml and 177 mg/100 ml. The glucose content in the mice (male and female) from both dosage (1.25 and 2.00%), that consumed with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* yoghurt are higher than the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* yoghurt in both sexes. And between sexes, the male are lower than the female; and when the dosage are higher, the blood content will higher too. The yoghurt with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* starters, has lower glucose content, because could raised the blood insulin so the blood glucose will decreased. Even it decreased, but the glucose content still in normal range.

CONCLUSIONS

The yoghurt that fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* has no effect on yoghurt quality than the yoghurt with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, and the blood glucose will decrease after 3 hours treatment even still in normal range.

REFERENCES

1. Cross, H. R. and A. J. Overby, 1988. Meat Science, Milk Science and Technology. Elsevier Science Publisher. Amsterdam. pp. 265-268, 293,
2. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams and Williams. Baltimore. p. 566.
3. 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.
4. Stanbury, P.F. and A. Whitaker, 1984, Principles of Fermentation Technology, Pergamon Press, Oxford. 1
5. van den Berg, J. C. T., 1988, Dairy technology in the tropics and subtropics. Pudoc, Wageningen. p. 150.

THE BIOFERMENTATION OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* AND *BIFIDOBACTERIUM* ON MILK AGAINST THE ACTIVITY OF LIPASE AND MICE BLOOD CHOLESTEROL

LOVITA ADRIANI [1], HENDRONOTO ARNOLDUS WALEWANGKO LENGKEY [1], NOOREMMA SOPHIANIE[2]

[1] Faculty of Animal Husbandry, Padjadjaran University, Bandung, INDONESIA

[2] Biomerieux Indonesia, INDONESIA

hawlengkey@yahoo.com

lovitayoghurt@yahoo.co.id

The development in food fermentation technology allowed humans to use microbes ability optimally to increase the benefit of materials that could be damaged to products that could resist and have a high economical value.

The aim of the research is to explore the effect of the fermentation with Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium against the ability to increase the activity of lipase and to decrease the cholesterol value of mice blood.

Results indicated that the activity of lipase in milk fermented with Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium are 0.45 units/ml, and the cholesterol value is 169.5 mg/dl, compared with the Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophillus milk fermented that is 0.18 units/ml, and 224.3 mg/dl.

Key words : Biofermentation, lipase, cholesterol, Lactobacillus acidophilus,Bifidobacterium

Lactobacillus acidophilus is a slow acid producer in cultures used for the production of acidophilus milk. This product has a plain acid flavour, and may be combined with other bacteria to obtain a more palatable product. Acidophilus milk is recommended as a dietary product, because *Lactobacillus acidophilus* functions in the large intestine of man (van den Berg, 1988) In bioghurt, *Lactobacillus bulgaricus* is replaced by *Bifidobacterium* in place of *Lactobacillus bulgaricus* is that *Bifidobacterium* produces the physiologically active D(+)-lactic acid. It is assumed that a high concentration of cholesterol in the diet affects the cholesterol level in the blood serum.The endogenous lipolytic activity in intestine is low so that lipases ingested will make a significant contribution to intestinal lipolysis (Cross and Overby, 1988).

Some of the milk enzymes, can be found in the skim milk, e.g. lipase and lysozyme (Cross and Overby, 1988).

The aim of this work was to get the effect of fermentation with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* on gaining the lipase activities and to reduce the blood cholesterol in mice.

MATERIALS AND METHODS

The milk. We are using raw milk (cow milk) from farm animals at the faculty.

The bacteria. The bacteria are pure cultivated *Bifidobacterium, Lactobacillus acidophillus, Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. The identification of the cultures was based on the characteristics of the lactobacilli and streptococcus as described in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, et al, 1994). Bacteria total count with Total Plate Count (TPC).

Lipase activity. Lipase activities are tested according to Bergmeyer, 1981, after 7 weeks fermented.

Blood cholesterol. Blood cholesterol was tested according to Randox.

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of the treatment on lipase activities

Lipase activities are responsible for the rancid flavour in milk and milk products. They hydrolyse glycerides, thus liberating free fatty acids. This process is called lipolysis. Lipase enzymes are still active at temperatures as low as 4 to 5^{O} C. Most of them are destroyed at normal or slightly increased HTST pasteurization temperatures, but rancidity already developed in raw milk will not be removed during pasteurization (van den Berg, 1988).

Table 1. Total cell counts and Lipase activities in yoghurt

Yoghurt	Total cell count (cell/ml)	Lipase activities (unit/ml)
Lactobacillus bulgaricus and *Streptococcus thermophilus*	13×10^{11}	0.18
Bifidobacterium and *Lactobacillus acidophilus*	7.6×10^{9}	0.45

In Table 1. , presents the total cell counts in yoghurt and the lipase activities in yoghurt. After fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*, total cell count was 13×10^{11} cell/ml and lipase activities was 0.45 unit/ml, compared to the *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* fermentation; the total cell counts was 7.6×10^{9} cell/ml and the lipase activities only 0.18 unit/ml.

The distribution of lipase between serum and cream fractions was altered, indicating that the equilibrium between the lipase activity of skim milk and cream is temperature dependent. The distribution of lipase in milk depends primarily on the lipid phase.

The effect of the treatment on blood cholesterol

Milk fat should only refer to the pure fat, but since the fat is associated with other fat-like substances, such as lecithine and cholesterol, the term lipids is often used for all fatty components that can be extracted from the milk by ether. Cholesterol is an alcoholic compound of complex structure. In milk, most of it is found in the fat globules. Unfortunately, milk fat has been suspected of being injurious to health. Particular attention has been given to its cholesterol content. It has been assumed that the consumption of milk fat will increase the cholesterol content of the blood.

In Table 2, presents the cholesterol content in mice blood cholesterol.

Table 2. Blood cholesterol content in mice (mg/100 ml) after 7 weeks treatment

Dosage (%)	Yoghurt			
	A	A	B	B
	Male	Female	Male	Female
1.25	172	147	153	144
2.00	166	140	143	142

Notes : A = Lactobacillus bulgaricus : Streptococcus thermophilus = 1 : 1
B = Bifidobacterium : Lactobacillus acidophilus = 1 : 1

It is assumed that a high concentration of cholesterol in the diet affects the cholesterol level in the blood serum. The cholesterol content of milk fat is relatively low compared to that of other animal foods. The average cholesterol content of milk is 13 mg/100 ml (van den Berg, 1988).

After 7 weeks treatment with 1.25% and 2.00% dosage in male and female mice, the average of blood cholesterols are varied between 140 mg/100ml and 172 mg/100 ml. The blood cholesterol content from the mice (male and female) from both dosage (1.25 and 2.00%), that consumed with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* yoghurt are higher than the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* yoghurt in both sexes. And between sexes, the male are higher than the female; and when the dosage are higher, the blood cholesterol will lower too. The yoghurt with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* starters, has lower cholesterol content, because the cholesterol in the diet has only a limited effect on the level of cholesterol in the blood plasma, since the body has a control mechanism which ensures that the synthesis of cholesterol by the body is reduced when the amount of cholesterol consumed increases.

CONCLUSIONS

The blood cholesterol content that consumed with Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus yoghurt are higher than the Bifidobacterium and Lactobacillus acidophilus yoghurt. The yoghurt with Bifidobacterium and Lactobacillus acidophilus starters, has lower cholesterol content, because the cholesterol in the diet has only a limited effect on the level of cholesterol in the blood plasma, since the body has a control mechanism which ensures that the synthesis of cholesterol by the body is reduced when the amount of cholesterol consumed increases.

REFERENCES

1. Bergmeyer, H.U., J. Bergmeyer and M. Grab. 1981. Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie. Florida.
2. Cross, H.R. and A. J. Overby, 1988. Meat Science, Milk Science and Technology. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. pp. 191, 293, 394
3. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams and Williams. Baltimore. p. 566.
4. van den Berg, 1988, Dairy Technology in the tropics and subtropics. Pudoc, Wageningen. pp. 9, 11, 15, 40, 153.

CERCETĂRI PRIVIND EVOLUŢIA ANEMIEI INFECŢIOASE ECVINE PE TERITORIUL MARAMUREŞULUI ISTORIC

RESEARCHES CONCERNING EVOLUTION OF EQUINE INFECTIONS ANEMIA IN MARAMUREŞ REGION

IVANCIUC ILEANA[1], VASIU C.[2]

[1]DSVSA Maramureş, Laboratorul Sanitar Veterinar Sighetu Marmaţiei, lsvsighet2008@gmail.com
[2]FMVCluj-Napoca,vasiucon@yahoo.com

The aim of this paper was to monitor the evolution of Equine Infectious Anemia (EIA) on Historical Maramures teritory during 1999 – 2008. This study had focused on the incidence of EIA during this period on diferent region and cities and also the geographic repartition of the positive cases. The samples were processed in the Sighetu Marmatiei Official Veterinary Laboratory, Virology unit. We have procesed a number of 86 549 equine blood/serum samples using the agar immunodiffusion technique – Coggins test. The results have showned that during 1999 – 2008, in the region of Historical Maramures, EIA have had a endemic evolution and a high contagiuosness with a prevalence of the infection equal to 5.24%. Equine Infectious Anemia was diagnosed each year and since 2004 was noted in every region and/or urban settlements. We have observed 2 periods in the evolution of the disease, the first one from 1999 untill 2005 when the number of positive cases had risen constantly and the second period from 2005 untill 2008 when the incidence had decreased.

Key words: antibodies, immunodiffusion, incidence, endemic evolution

Anemia infecţioasă ecvină (AIE) este o boală infectocontagioasă, specifică solipedelor, produsă de un virus din familia Retroviridae, genul Lentivirus, răspândită pe toate continentele (excepţie Antarctica) (12). Prevalenţa infecţiei variază în funcţie de mai mulţi factori dintre care menţionăm densitatea populaţiei de ecvidee şi de vectori transmiţători (insecte hematofage) şi eficienţa măsurilor de control (2, 7, 12). Boala are un impact puternic socio-economic şi sanitar veterinar, fiind cuprinsă în lista B a OIE, încă din anul 1964.

Pentru stabilirea diagnosticului AIE se recurge la metode serologice, respectiv la reacţia de imunodifuzie în gel de agar (ID) şi la testul ELISA (C-ELISA şi SA-ELISA), rezultatul pozitiv certifică infecţia cu virus AIE, ceea ce este suficient pentru statusul de animal bolnav (1, 2, 3, 5). Testul de imunodifizie în gel de agar (testul Coggins), recomandat de Oficiul Internaţional de Epizootii (OIE) pentru comerţul internaţional şi supraveghere, este cel mai utilizat pe plan internaţional, inclusiv în România (10). Testul Coggins şi C-ELISA detectează anticorpii împotriva proteinei majore interne (p26) a virusului, în timp ce SA-ELISA pe cei faţă de gp45 (1, 9, 11). Testul Coggins este un test rapid, ieftin şi cu o înaltă sensibilitate şi specificitate (2, 4, 5, 8). Probele pozitive la testele ELISA trebuie confirmate prin testul Coggins având în vedere cota mare de reacţii fals pozitive (6). Titrul anticorpilor maternali (transmişi pasiv) descreşte până la un rezultat negativ, prin testul Coggins, la vârsta de 6-8 luni.

MATERIALE ŞI METODE

Datele epidemiologice prezentate în lucrare s-au obţinut prin examinarea, prin testul Coggins, a unui număr de 86.549 probe de sânge (ser sanguin) provenite de la cabaline, în perioada 1999-2008. Testările s-au efectuat în cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar Sighetu Marmaţiei, secţia Virusologie. Numărul probelor examinate în fiecare an a fost stabilit în conformitate cu „Programul de supraveghere, profilaxie şi combatere a bolilor la animale, de prevenire a transmiterii de boli de la animale la om şi de protecţia mediului". Testul de imunodifuzie în gel de agar este testul oficializat în România pentru diagnosticul anemiei infecţioase la solipede (cal, asin, catâr, bardou), la care infecţia poate fi clinic manifestă sau latentă.

Principiul testului constă în migrarea în gelul de agar a antigenului şi anticorpilor, care la locul de contact se combină specific formând un precipitat vizibil în grosimea gelului de agar sub forma unei linii caracteristice.

În secţia de Virusologie din cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar Sighetu Marmaţiei, au fost examinate probe provenite din 30 de circumscripţii împărţite în 3 circumscripţii saniatre veterinare zonale: **CSV zonală Sighet** cu circumscripţiile Sighetu Marmaţiei, Giuleşti, Vadu Izei, Bocicoiu Mare, Rona de Jos, Rona de Sus, Câmpulung la Tisa, Săpânţa, Remeţi; **CSV zonală Ocna Şugatag** cu circumscripţiile Ocna Şugatag, Deseşti, Budeşti, Călineşti, Rozavlea, Strâmtura, Bogdan Vodă, Botiza, Dragomireşti, Săliştea de Sus, Săcel; **CSV zonală Vişeu** cu circumscripţiile Petrova, Bistra, Leordina, Ruscova, Repedea, Poienile de sub Munte, Moisei, Vişeu de Jos, Vişeu de Sus şi Borşa.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În perioada 1999-2008 s-au examinat prin testul Coggins un număr total de 86.549 probe, repartizarea pe ani fiind prezentată în figura 1.

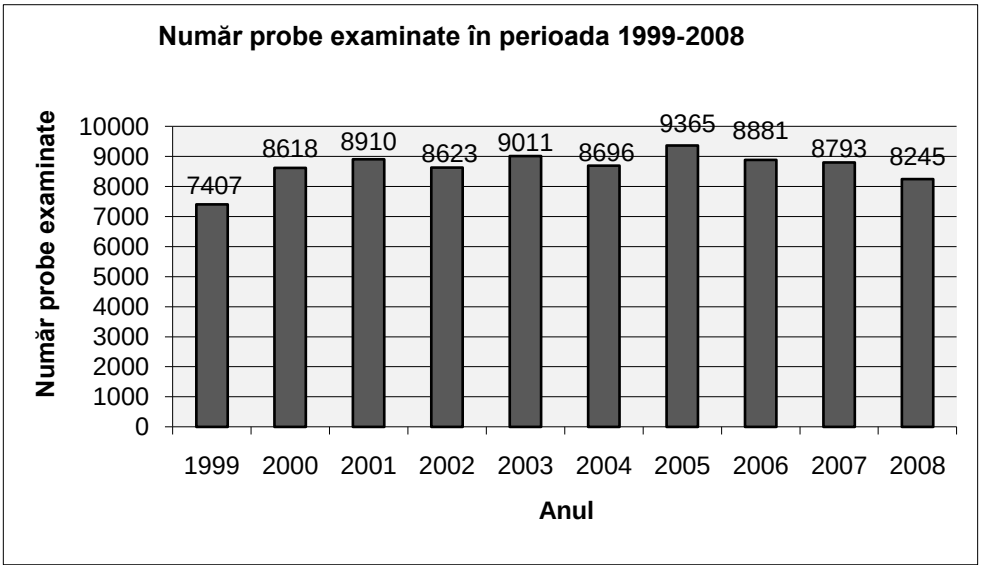


Fig. 1. Număr probe examinate în perioada 1999-2008.

Din figura 1 se observă că numărul probelor examinate în perioada luată în studiu nu variază foarte mult. Cele mai multe probe au fost examinate în anul 2005 iar cele mai puţine în 1999.

Rezultatele testului de imunodifuziune sunt prezentate în fig. 2.

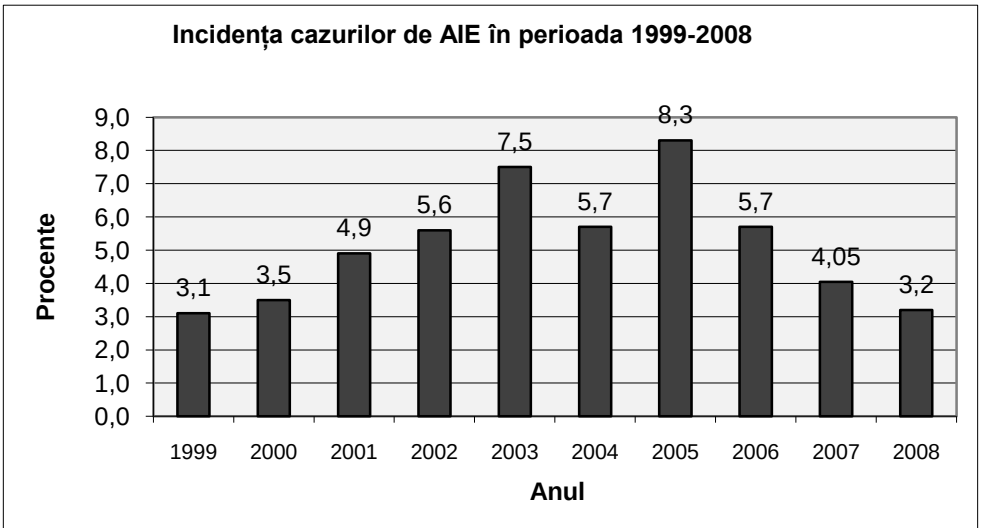


Fig. 2. Procentul probelor pozitive la AIE în Maramureşul Istoric în perioada 1999-2008.

Din figura 2 rezultă că cele mai multe cazuri de AIE s-au diagnosticat în anul 2005, respectiv 773 din 9365 cabaline testate, procentul de morbiditate fiind de 8,3%. Urmează apoi anul 2003 cu 678 (7,5%) cazuri pozitive din 9011 cabaline testate. Anul cu cele mai puține cazuri diagnosticate şi cu cele mai puține probe examinate, este anul 1999 când s-au diagnosticat 235 (3,1%) cazuri pozitive din 7407 cabaline testate. Începând din anul 2002 se observă o scădere bianuală a cazurilor pozitive iar după anul 2005, o scădere graduală a procentului de cazuri pozitive la AIE.

În perioada 1999-2008 s-au diagnosticat 4538 cazuri seropozitive la AIE, jumătate dintre acestea sunt concentrate în CSV zonală Sighet, restul cazurilor pozitive fiind înregistrate aproape egal în celelalte două CSV zonale (Fig. 3).

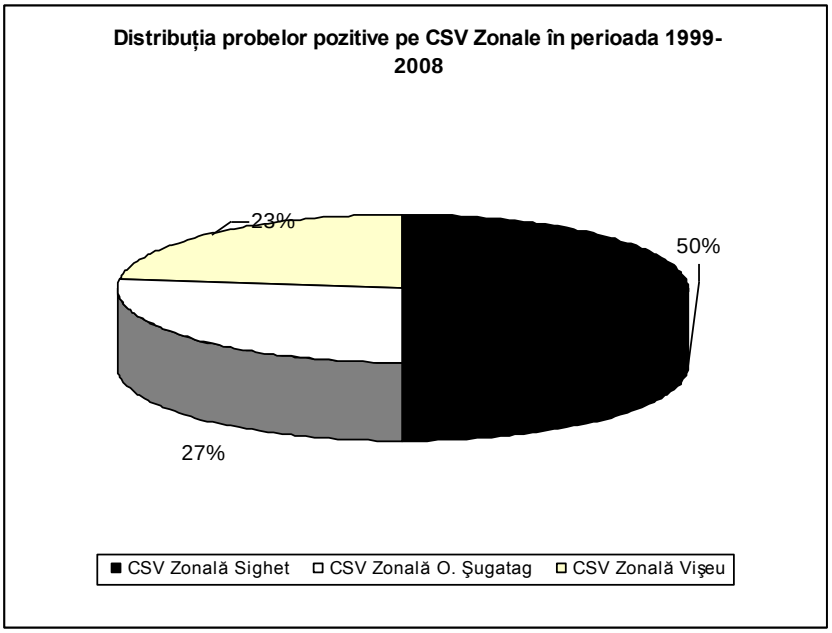


Fig. 3. Distribuția probelor pozitive pe CSV zonale în perioada 1999-2008.

În figura 4 sunt prezentate circumscripţiile sanitare veterinare cu cele mai multe cazuri de AIE în perioada 1999-2008.

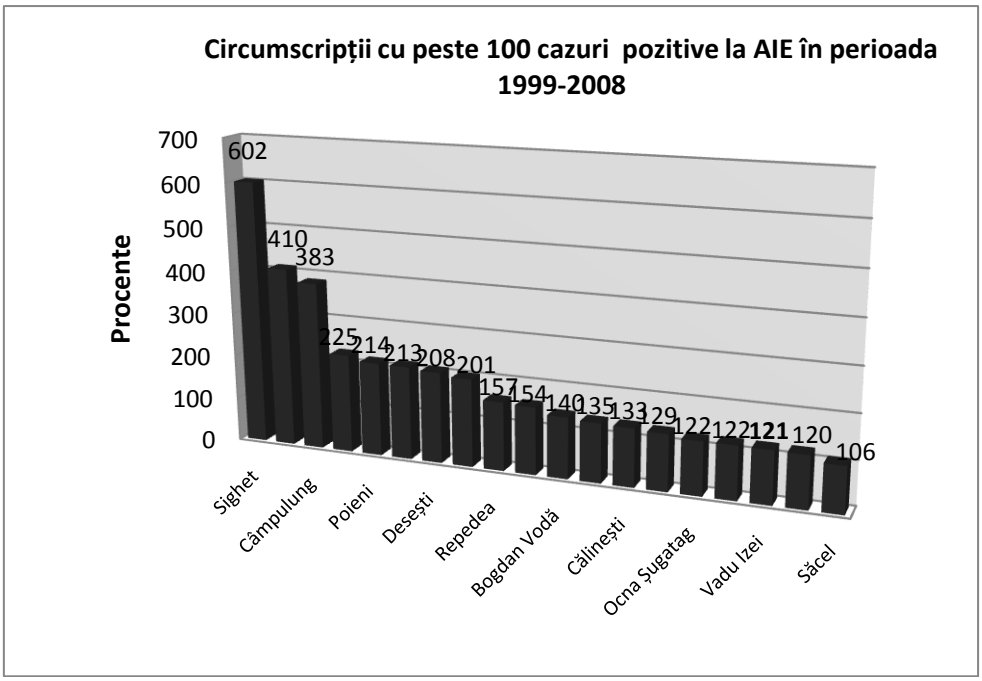


Fig. 4. Circumscripţiile sanitare veterinare cu peste 100 cazuri pozitive diagnosticate în perioada 1999-2008.

Din figura 4 rezultă că pe primul loc se situează CSV Sighetu Marmaţiei cu 602 probe pozitive, apoi CSV Săpânţa cu 410 probe pozitive, CSV Câmpulung la Tisa cu 383 probe pozitive, CSV Giuleşti cu 225 probe pozitive, CSV Poieni cu 214 probe pozitive, CSV Remeţi cu 213 probe pozitive. De remarcat faptul că în toate circumscripţiile care fac parte din CSV zonală Sighet s-au diagnosticat peste 100 cazuri pozitive la AIE în perioada luată în studiu.

CSV zonală Sighet este dispusă geografic de la nord-vest spre centrul regiunii studiate, în zona de luncă a celor două cursuri de apă, Tisa şi Iza, care o străbat. Solurile existente sunt lutos-aluvionare şi podzolice. Datele din literatură precizează că factorii pedologici intervin favorabil în apariţia şi extinderea focarelor de AIE (2, 8). Se apreciază că există o corelaţie între conţinutul în fosfor al solurilor, dezechilibrele fosfo-calcice în raţie şi incidenţa bolii. Pe baza acestor observaţii s-a ajuns la teoria „solurilor incomplete", teorie care este sprijinită de existenţa „insulelor indemne de boală" în care probabil există un regim echilibrat al diferitelor microelemente.

Fără a putea afirma cu certitudine, deoarece nu au fost analizate biochimic probele de sol din aceste regiuni, putem susţine aceste teorii cu observaţia că gradul cel mai mare de contaminare îl au circumscripţiile aşezate în lunca Tisei, unde există şi bălţi, iar media precipitaţiilor anuale este cuprinsă între 700-1400 mm, favorabilă insectelor hematofage.

Comparând evoluţia AIE în cele 3 circumscripţii zonale observăm că situaţiile sunt diferite în intervalul 1999- 2005. În intervalul 2005-2008 se observă tendinţa de scădere a numărului de cazuri pozitive (Fig. 5).

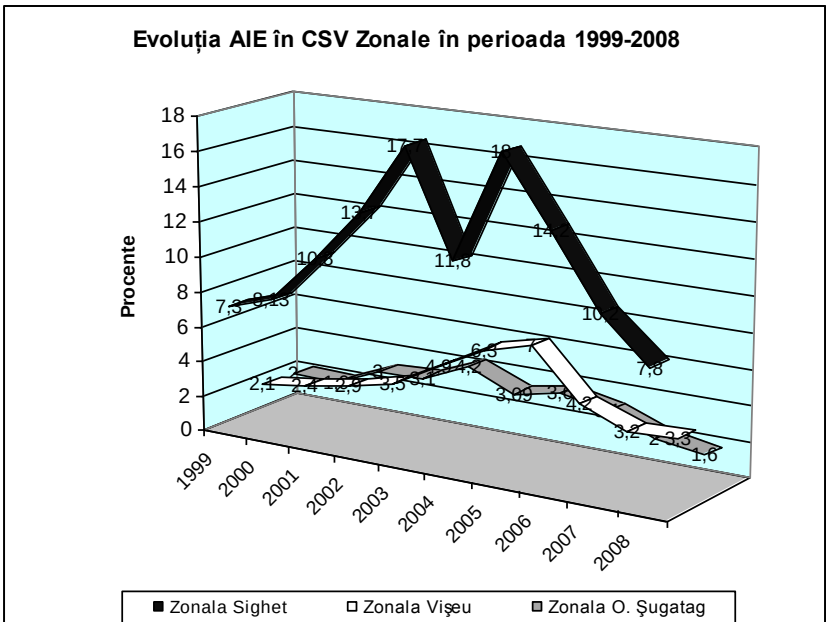


Fig.5. Evoluţia AIE în CSV zonale în perioada 1999-2008.

Se constată că în perioada 1999-2003 în CSV zonală Sighet procentul de cazuri pozitive la AIE a crescut în fiecare an, de la 7,3% în anul 1999 s-a ajuns la 17,7% în anul 2003. În anul 2004 procentul de pozitivitate scade la 11,8% dar creşte din nou în anul 2005, când se înregistrează valoarea cea mai mare (18%) din această CSV zonală şi din întreaga regiune studiată. Din anul 2005 numărul cazurilor pozitive scade cu aceeaşi rată cu care a crescut din anul 2001 până în 2003.

În CSV Zonală Ocna Şugatag procentul cazurilor pozitive la AIE nu depăşeşte valoarea de 4,2 în anul 2003, faţă de celelalte 2 CSV Zonale, în care procentul maxim de pozitivitate s-a înregistrat în anul 2005.

În CSV Zonală Vişeu procentul probelor pozitive la AIE creşte între anii 1999-2005, iar din anul 2005 începe să scadă. Această scădere a procentului de pozitivitate în cele 3 CSV Zonale, o putem explica prin măsurile care s-au luat pentru eradicarea acestei boli, identificarea şi respectiv extragerea cabalinelor pozitive din gospodăriile populaţiei şi abatorizarea lor. Din păcate procesul de extragere a cabalinelor pozitive din gospodăriiile populaţiei s-a desfăşurat doar pe parcursul anului 2005 după care a fost sistat.

Repartiţia geografică a cazurilor pozitive la AIE în Maramureşul Istoric, la începutul şi la sfârşitul perioadei luate în studiu, este redată în figurile 6 şi 7.

Din figura 6 se observă o concentrarea cazurilor cu AIE în partea de nord-vest a regiunii. Această zonă geografică corespunde cu CSV zonală Sighet, astfel că din 9 circumscripţii componente, 7 au un număr mare de cazuri pozitive diagnosticate (între 11-20 şi peste 20) şi doar 2 au un număr de cazuri pozitive între 6-10.

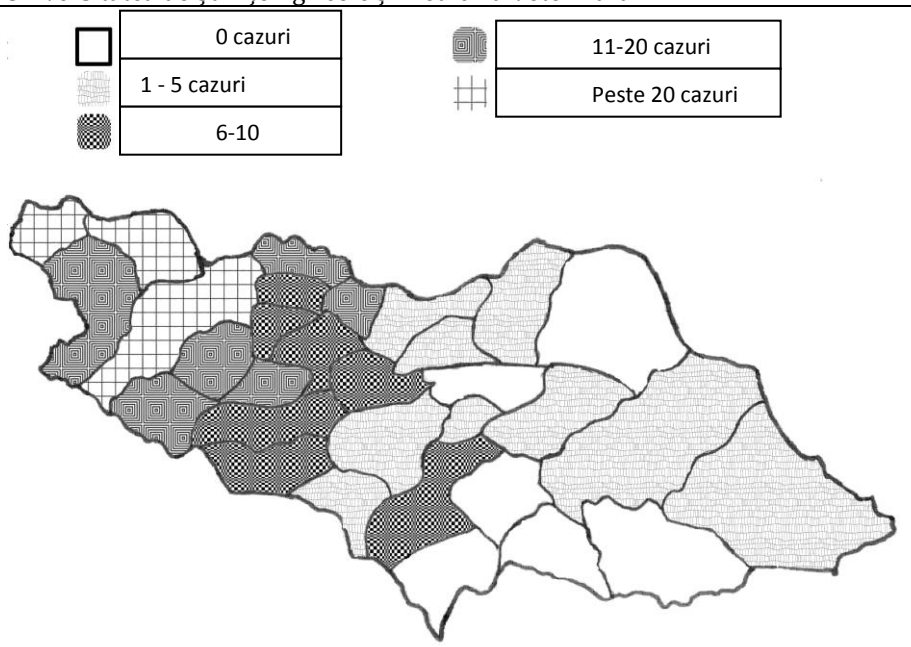


Fig. 6. Repartiţia geografică a cazurilor de AIE în anul 1999.

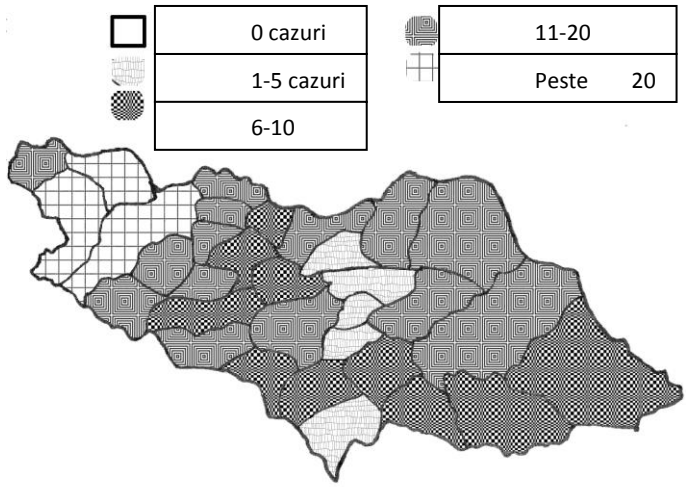


Fig. 7. Repartiţia geografică a cazurilor de AIE în anul 2008.

Se observă (Fig.7) faptul că în anul 2008 nu mai există circumscripţii fără cazuri pozitive depistate. Numărul circumscripţiilor cu 1-5 cazuri pozitive semnalate a scăzut la 4, de la 9 câte existau în anul 1999 iar numărul circumscripţiilor cu 11-20 cazuri pozitive creşte în anul 2008 la 14, faţă de 4 înregistrate în 1999. Reiese că, în perioada 1999-2008, AIE în Maramureşul Istoric a avut o evoluţie endemică şi o contagiozitate ridicată în focar şi în afara acestuia.

CONCLUZII

1. Pe teritoriul Maramureşului Istoric, în perioada 1999-2008, au fost examinate pentru anemia infecțioasă ecvină, prin testul Coggins, 86.549 probe din care au fost pozitive 4.538 (5,24%).
2. Anemia infecțioasă ecvină a fost diagnosticată în fiecare an, iar din anul 2004 a fost semnalată în toate circumscripțiile şi respectiv localitățile.
3. Numărul cel mai mare de probe pozitive (raportat la probe examinate) s-a înregistrat în perioada 2002-2005.
4. În evoluția anemiei infecțioase ecvine se pot distinge 2 perioade, respectiv 1999-2005 când numărul cazurilor pozitive a crescut progresiv şi 2005-2008 când incidența a început să scadă.
5. Circumscripția sanitară vaterinară cu cele mai multe cazuri de AIE diagnosticate în perioada 1999-2008 a fost Sighetu Marmației cu un număr de 602 (16,5%) iar circumscripția cu cu cele mai puține cazuri pozitive a fost Dragomireşti cu 16 cabaline (0,8%).
6. Anul cu cele mai multe cazuri de AIE nou apărute, a fost 2005 cu 773 cabaline seropozitive (8,3%)
7. În anul 1999 s-au diagnosticat 235 cazuri de AIE (3,1%), acesta fiind numărul cel mai mic din perioada studiată.
8. În CSV zonală Sighet numărul cel mai mare de cazuri pozitive la AIE s-a înregistrat în anul 2005, respectiv 367 (18,08%).
9. În CSV zonală Ocna Şugatag anul cu cele mai multe cazuri pozitive (4,2%) a fost 2003.
10. Incidența crescută a cazurilor de AIE în unele circumscripții din CSV zonală Ocna Şugatag, poate fi explicată prin faptul că aceste circumscripții sunt învecinate cu localități din CSV zonală Sighet, unde procentul de morbiditate este mare şi păşunile sunt învecinate.
11. În circumscripția Poienile de sub Munte (CSV zonală Vişeu), în anul 1999 nu s-a înregistrat nici un caz pozitiv la AIE, iar în anul 2007 procentul de pozitivitate a fost de 10%, cu toate că s-a înregistrat o scădere a cazurilor pozitive în toată regiunea.
12. În 1999 în regiunea studiată au fost 6 circumscripții fără cazuri pozitive de AIE, în timp ce din anul 2004 nu mai există localitate în care să nu fie semnalată AIE.
13. În perioada 1999-2008 anemia infecțioasă ecvină a avut, în Maramureşul Istoric, o evoluție endemică şi o contagiozitate ridicată în focar şi în afara acestuia.

BIBLIOGRAFIE

1. **Andrew M.C.,Thomas L.M.Hungtincton P.J.** (1993) – Comparison of ELISA FAST ELISA ADN gel diffusion test for reaction antibody, EIAV veterinary Microbiology.
2. **Boldizsar E.** (2001) – Investigații epidemiologice şi imunologice în anemia infecțioasă ecvină. Teză de doctorat, USAMV Cluj-Napoca.
3. **Castro A.E., Heuschele P.W.** (1997) – Diagnostic virusologic veterinar – ghid practic. – Bul. Inf.ştiinț. LCSVD nr. 2 (uz intern).
4. **Charles J., Issel C.J.** (1993) – A review of techniques for the serologic diagnosis, of equine infectious anemia. J.Vet.Diagn. Invest., 5: 137-141.
5. **Coggins L., Norcross N.L., Nusbaum S.R.** (1972) – Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. Am. J.Vet. Res., 33:11-18.
6. **Dos Reis J.K., Melo L.M., Rezende M.R., Leite R.C**. (1994) – Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anemia focus. Trop. Anim. Health Prod. 262:65-68.
7. **Foil I.D., Issel C.J.** (1991) – Transmission of retrovirus by arthropods. Ann. Rev.Entomol., 36.
8. **Ivanciu S.L. (2008) –** Cercetări epidemiologice, clinice şi de diagnostic în anemia infecțioasă ecvină. Teză de doctorat, USAMV Iaşi.
9. **Malmquist W.A., Bamett, D., Becvar C.S.** (1973) – Production of equine infectious anemia antigen in a persistenly infected cell line. Arch. Virol., 42:361-370.
10. **OIE** – Manual of Standars for Diagnostic Tests and Vaccines (2004), 542-545.
11. **Toma B., Goret P.** (1974). – Etude serologique de l'anemie infectieuse des equides. II. Etude cinetique des precipitines anti G et anti C. Bull. Acad. Vet., 47:117-131.
12. **Vasiu C.** (2007) – Virusuri, viroze şi boli prionice la animale. Editura Mega-Argonaut, Cluj- Napoca.

STUDIU COMPARATIV PRIVIND TESTELE SEROLOGICE ID ŞI ELISA ÎN DIAGNOSTICUL ANEMIEI INFECŢIOASE ECVINE

COMPARATIVE STUDY BETWEEN ID AND ELISA TESTS IN DIAGNOSTIC OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA

IVANCIUC ILEANA[1] , VASIU C.[2]
[1]DSVSA Maramureş, Laboratorul Sanitar Veterinar Sighetu Marmaţiei
[2] FMV Cluj Napoca
lsvsighet2008@gmail.com
vasiucon@yahoo.com

We have tested 433 blood samples by gel immunodiffusion (Coggins test) and ELISA. The blood was sampled from horses of various age from 290 different households of Historical Maramures region.

The results obtained by Coggins have showed 61 positive samples (14.09%), 12 weak positive samples (2.78%), 5 nonspecific samples (1.15%) and 355 negative samples (81.98%). The ELISA method have showed 78 samples were positive (18.02%) and 355 were negative samples (81.98%).

After the comparison of the results obtained with the two methods we have noticed 12 weak positive samples by Coggins test that have been positive for ELISA. The non-specific samples by Coggins were to be found negative by ELISA. Out of the 355 negative samples by Coggins, 5 samples (1.41%) have been found positive by ELISA.

The data obtained after blood sample examination confirms that both of the testing methods have a good specificity but ELISA offers a higher grade of certainty; this fact is proven by finding an extra 5 positive samples (with a low antibodies level) and by elimination of non-specific samples.

Key-words: samples, horses, Coggins test, ELISA

În România examenul serologic prin imunodifuzie este utilizat încă din 1975 şi a devenit metodă uzuală de supraveghere profilactică a efectivelor şi baza măsurilor de combatere şi eradicare a AIE (2, 11).

Testul imunoenzimatic ELISA prezintă o sensibilitate înaltă , decelând anticorpii la titruri scăzute, la valori sub pragul de detecţie caracteristic altor teste imunologice (1, 4, 8).

Testul de imunodifuzie în gel de agar, conform Legislaţiei Uniunii Europene precum şi a recomandărilor prevăzute în Manualul de Standarde ale OIE, este testul de referinţă în diagnosticul serologic al AIE (10).

MATERIALE ŞI METODE

Investigaţiile s-au efectuat pe un număr de 433 probe de ser sanguin prelevate de la cabaline, de sex şi vârstă diferite, provenind de la 290 gospodării din Maramureşul Istoric. Probele de ser sanguin au fost testate comparativ prin testul de imunodifuzie în gel de agar - ID (testul Coggins) şi testul imunoenzimatic ELISA.

Pentru testul Coggins s-a folosit setul de diagnostic pentru AIE produs de biofabrica INMV PASTEUR. Antigenul este obţinut "in vitro" pe culturi de leucocite ecvine. Serul martor pozitiv conţine anticorpi precipitanţi, respectiv precipitine sau IgG care apar în sângele animalelor infectate în 14-45 zile de la infecţie.

Pentru testul ELISA s-a folosit trusa DyaSistem CELISA EIA-IDEXX, care conţine plăci din material plastic căptuşite cu antigene interne p26, cea mai specifică din grupul de antigene ale virusului AIE. Antigenul p26 fiind conjugat cu o enzimă, încadrează acest test în cele de tip indirect. Serul de cal se incubează în acelaşi timp cu conjugatul p26. Anticorpii serici specifici pentru p26 intră în competiţie cu anticorpii monoclonali p26.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele examenului serologic prin testul de imunodifuzie (Coggins) sunt redate în figura 1 şi tabelul 1.

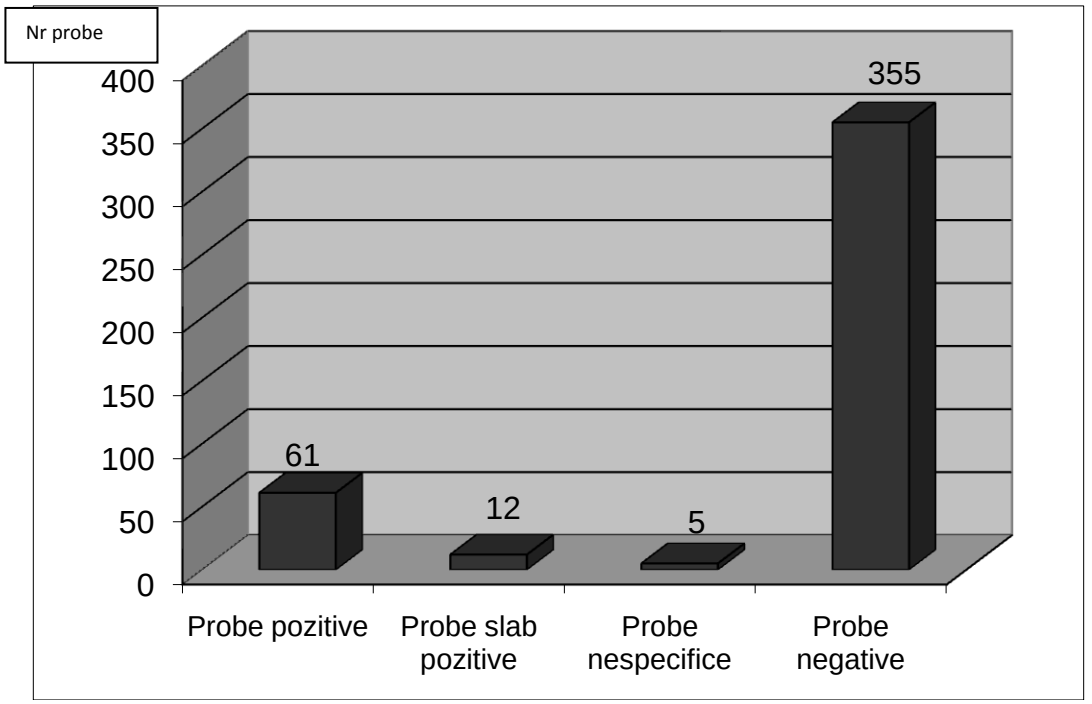


Fig. 1 Rezultatele testului ID (testul Coggins).

Din analiza rezultatelor înscrise în figura 1 şi tabelul 1 se constată că din cele 433 probe examinate, 61 probe (14,08%) au reacţionat pozitiv, 12 probe (2,77%) au reacţionat slab pozitiv, 5 probe (1,15%) au reacţionat nespecific şi 355 probe (81,98%) au fost negative. Testul Coggins detectează anticorpii anti p26 prezenţi în serul animalelor bolnave, proteina p26 este considerată stabilă şi prezentă la majoritatea tulpinilor virale. Prezenţa reacţiilor slab pozitive şi nespecifice se poate explica prin faptul că anticorpii serici precipitanţi sunt de regulă decelaţi târziu după 15-45 zile.

În figura 2 şi tabelul 1 sunt prezentate rezultatele testului ELISA din care reiese, după citirea valorilor densităţii optice de către cititorul liniei ELISA, că 78 (18,01%) probe au fost pozitive şi 355 (81,98%) negative.

Rezultatele obţinute la testarea serurilor prin cele două metode sunt redate în tabelul 1.

Din analiza tabelului 1 se constată că la testul Coggins s-au înregistrat reacţii pozitive şi slab pozitive în procent de 16,85% iar prin testul ELISA reacţii pozitive de 18,01%. De remarcat faptul că cele 12 probe slab pozitive la imunodifuzie în gel de agar, au înregistrat rezultate pozitive la testul imunoenzimatic ELISA.

Din cele 355 probe negative la testul Coggins, un număr de 5 pobe au reacţionat pozitiv la ELISA, iar probele nespecifice au reacţionat negativ la ELISA.

Analizând rezultatele obţinute se poate aprecia că specificitatea a fost bună la ambele metode de diagnostic, folosind aceeaşi secvenţă antigenică, p26, sensibilitatea însă a crescut la testul imunoenzimatic ELISA, prin faptul că a identificat un plus de 5 seruri pozitive datorită titrului scăzut de anticorpi pe care

testul ID nu l-a putut decela iar reacţiile nespecifice care de multe ori sunt confundate cu reacţiile pozitive, au fost eliminate.

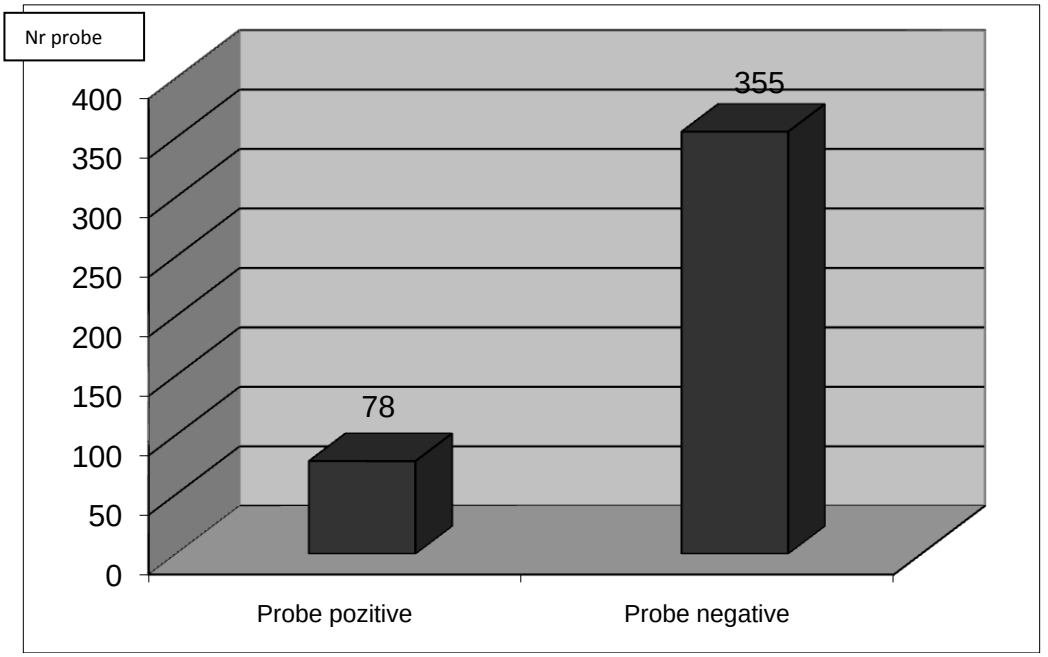


Fig. 2. Rezultatele testului ELISA.

Tabelul 1
Compararea rezultatelor obţinute la testele ID şi ELISA.

ID			ELISA		
Rezultat	Nr probe.	%	Rezultat	Nr. probe	%
P (pozitiv)	61	14,08	P	61	14,08
N (negativ)	355	81,98	N P	350 5	80,83 1,15
SP (slab pozitiv)	12	2,77	P	12	2,77
NS (nespecific)	5	1,15	N	5	1,15
P + SP N + NS	73 360	16,85 83,14	P N	78 355	18,01 81,98

CONCLUZII

1. Din cele 433 probe de ser sanguin examinate prin testul Coggins, 61 (14,08%) au reacţionat pozitiv, 12 (2,77%) slab pozitiv, 5 (1,15%) nespecific şi 355 (81,98%) au fost negative.

3. Prin testul imunoenzimatic ELISA s-au obţinut 78 (18,01%) reacţii pozitive şi 355 (81,98%) reacţii negative.

4. Cele 12 probe reacţionate slab pozitiv prin testul Coogins, au înregistrat reacţii pozitive la ELISA, iar cele 5 reacţii nespecifice la testul Coggins au fost negative la ELISA.

2. Testul Coggins are o specificitate bună, este practic, uşor de realizat, dar sensibilitatea este mai scăzută.

5. Testul imunoenzimatic ELISA prezintă o înaltă sensibilitate identificând un plus de 5 seruri pozitive faţă de ID (titruri scăzute de anticorpi pe care testul Coggins nu le-a putut decela) iar reacţiile nespecifice au fost eliminate.

6. Rezultatele comparative obţinute la testarea celor 433 probe ser sanguin provenite de la cabaline, prin care la testul Coggins s-au înregistrat reacţii pozitive în procent de 14,08% iar la ELISA de 18,01%, justifică necesitatea depistării precoce a cabalinelor pozitive şi folosirea tehnicii ELISA în supravegherea AIE.

BIBLIOGRAFIE

1. Andrew M.C.,Thomas L.M., Hungtincton P.J. (1993) – Comparison of ELISA FAST ELISA ADN gel diffusion test for reaction antibody, EIAV veterinary Microbiology.
2. Baba A.I., Rotaru O., Răpuntean Gh., Cârstean C., Botez Gh., Gaboreau M. (1987) – Diagnosticul morfopatologic corelat cu examenul serologic în anemia infecţioasă. – Bull. IACNZMV, 41.
3. Boldizsar E. (2001) – Investigaţii epidemiologice şi imunologice în anemia infecţioasă ecvină. Teză de doctorat, USAMV Cluj-Napoca.
4. Burki F., Rosmanith E. (1990) – Equine lentivirus, comparative studies on four serological tests for the diagnosis of equine infectious anemia. Vet. Microbiol., 33, 353-360.
5. Castro A.E., Heuschele P.W. (1997) – Diagnostic virusologic veterinar – ghid practic. – Bul. Inf.ştiinţ. LCSVD nr. 2 (uz intern).
6. Charles J., Issel C.J. (1993) – A review of techniques for the serologic diagnosis, of equine infectious anemia. J.Vet.Diagn. Invest., 5, 137-141.
7. Coggins L., Norcross N.L., Nusbaum S.R. (1972) – Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. Am. J.Vet. Res., 33, 11-18.
8. Dos Reis J.K., Melo L.M., Rezende M.R., Leite R.C. (1994) – Use of an ELISA test in the eradication of an equine infectious anemia focus. Trop. Anim. Health Prod. 262, 65-68.
9. Nakajima H., Ushumi C., Fukunaga Y., Hirashaya J. (1973) – Preparation of EIAV antigen immunodiffusion test. Arch. Virol. 42.
10. OIE – Manual of Standars for Diagnostic Tests and Vaccines (2004), 542-545.
11. Oneţ E., Slavcovici N., Oneţ Virginia (1984) – Observaţii asupra imunodiagnosticului în anemia infecţioasă ecvină. – Rev. Creşterea animalelor nr. 7, 39-43.
12. Sugiura T., Nakajima H. (1982) – Indirect hemaglutination test in equine infectious anemie. – Can. J. Comp. Med., 46, 60-64.
13. Toma B., Goret P. (1974) – Etude serologique de l'anemie infectieuse des equides. II. Etude cinetique des precipitines anti G et anti C. Bull. Acad. Vet., 47, 117-131.
14. Vasiu C. (2007) – Virusuri, viroze şi boli prionice la animale. Editura Mega-Argonaut, Cluj- Napoca.

ASPECTE EPIDEMIOLOGICE PRIVIND BOLILE PEŞTILOR DE FERMĂ DIN MOLDOVA

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS REGARDING THE FISH FARM DISEASES FROM MOLDAVIA

M. LAZĂR, V. VULPE, ELEONORA GUGUIANU, O.Z. OPREAN
Faculty of Veterinary Medicine, Alley M. Sadoveanu, no. 8, Iasi
lazar_mircea@yahoo.com

The ihtiopathological research made upon fish camed from some farms of Moldavia leads to the elucidation of some aspects regarding the diagnosis and epidemiological substratum of the existing diseases in the studied farms.

Clinical and laboratory exams made during 2005-2009 have leaded to the identification of 4 infectious diseases: carp eritrodermatitis, silver carp and big head eritrodermatitis, haemorrahagic septicemia, yersiniosis and 12 parasitic diseases: ichthyobodosis, myxozoan infection, trichodinosis, dactylogyrosis, black spot disease, argulus infestation, sinergasilosis, lernaea infestation, proliferative kidney disease, microsporidiosis, saprolegniosis and dermocystidiosis that evolved constantly at the fish species taken in study.

During the research was remarked the season phaenomenon of some parasitic diseases and was made a practical identification of the parasite sources.

Keywords: epidemiology, infectious diseases, parasitic diseases, ciprinids, salmonids

Cercetările ihtiopatologice efectuate pe material piscicol provenit de la câteva ferme din regiunea Moldovei au condus la elucidarea unor aspecte privind diagnosticul şi caracteristicile epidemiologice ale afecţiunilor existente în fermele studiate.

Examenele clinice şi de laborator derulate în perioada 2005-2009 au condus la identificarea a 4 boli infecţioase: eritrodermatita crapului, eritrodermatita sângerului şi novacului, septicemia hemoragică, yersinioza şi a 12 boli parazitare: ichtiobodoza, mixosporidioza, trichodinoza, dactilogiroza, boala petelor negre, arguloza, sinergasiloza, lerneoza, saprolegnioza, dermocistoza, boala proliferativă a rinichiului şi microsporidioza, care au evoluat constant la speciile de peşti luate în studiu.

În cursul cercetărilor s-a remarcat fenomenul de sezonalitate al unor boli parazitare şi s-a efectuat identificarea concretă a surselor de paraziţi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările s-au efectuat în perioada 2005 – 2009 pe populaţii piscicole ce aparţin unor ferme sau amenajări piscicole:

- Ferma A - Podu Iloaiei;
- Ferma B - Larga Jijia;
- Ferma C – Lacul de acumulare Bicaz, Jud. Neamţ;
- alte amenajări piscicole din regiunea Moldovei

S-au examinat un număr de 1455 exemplare peşti din care 551 exemplare aparţin Fermei A, 469 exemplare Fermei B, 175 exemplare Fermei C şi restul de 260 exemplare altor amenajări piscicole din Moldova **(Fig. 1)**.

În cadrul fermelor piscicole s-au examinat următoarele specii de peşti: crap comun *(Cyprinus carpio)*, sânger *(Hypophthalmichthys molitrix),* novac *(Aristichtys nobilis),* cosaş *(Ctenopharyngodon idella),* caras *(Carassius auratus gibelio)* şi păstrăv curcubeu *(Oncorhynchus mykiss)*. Vârsta exemplarelor luate în studiu este diferită, de exemplu la crapul românesc: crap sub un an (C_0), crap peste un an (C_1), crap de doi ani (C_2), crap reproducător (C_r).

Fermele luate în studiu dispun de un sistem de creştere semiintensiv sau intensiv, iar efectivul piscicol este exploatat în bazine şi heleştee, supravegheat în ceea ce priveşte distribuţia procentuală de specii de peşti, şi talia şi greutatea medie a acestora.

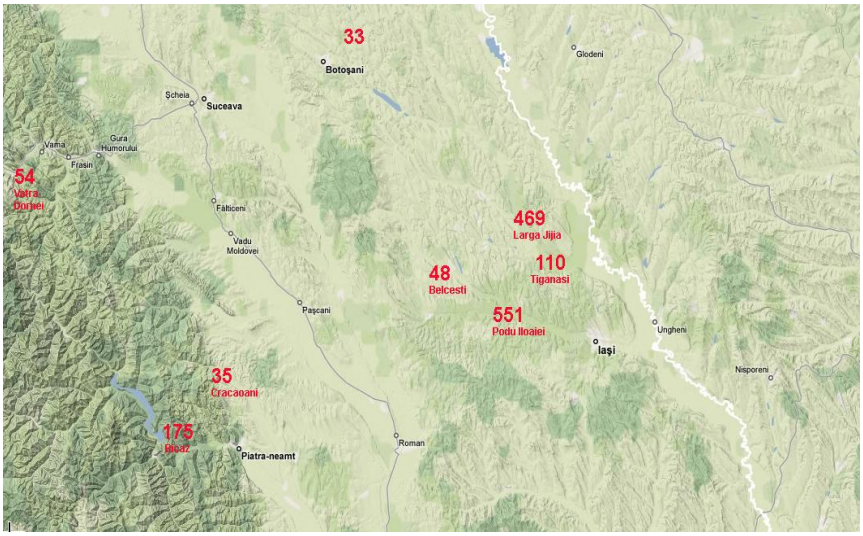


Fig. 1. *Harta localităţilor cu fermele piscicole luate în studiu şi numărul de peşti examinaţi*

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma datelor culese pe această perioadă s-au identificat invazii parazitare, bacterioze şi viroze la peştii dulcicoli, date care se vor regăsi în descriile noastre.

Bolile infecţioase depistate în fermele luate în studiu sunt centralizate în *Tabelul nr. 1* în care sunt evidenţiate boala, agentul etiologic, specia de peşti afectată şi nivelul de localizare organică.

Tabelul nr. 1

Situaţia bolilor infecţioase diagnosticate în perioada 2005-2009

Nr. Crt.	Boala	Agentul etiologic	Specia afectată	Localizare organică	Ferma
1.	Eritrodermatita crapului	*Aeromonas spp.*	Crap 0+, 1+, 2+, 3+	Piele	Ferma A, Ferma B
2.	Eritrodermatita sângerului şi novacului	*Aeromonas spp.*	Sânger 1+, 2+ Novac 1+, 2+	Piele	Ferma A
3.	Septicemia hemoragică	*Aeromonas spp.*	Caras 0+, 1+	Ficat	Ferma A Alte ferme
4.	Yersinioza	*Yersinia ruckeri*	Păstrăv 1+	Piele, cavitate bucală	Ferma C
5.	Necroza hematopoietică infecţioasă	*Rhabdovirus*	Păstrăv 1+	Splină	Alte ferme

Analizând datele din *Tabelul nr. 1* se observă că s-au identificat un număr de cinci boli infecţioase, patru de natură bacteriană (80%): eritrodermatita crapului, eritrodermatita sângerului şi novacului, septicemia hemoragică, yersinioza şi o boală virotică (20%), diagnosticată la peşti din fermele salmonicole din Italia.

Din speciile afectate se observă că, la crap, eritrodermatita a apărut la toate vârstele, iar la ciprinidele asiatice a apărut la vârste cuprinse între un an respectiv doi ani. În ceea ce priveşte păstrăvul se observă că el a fost afectat la vârsta de un an, atât în cazul bacteriozelor cât şi in cazul virozelor.

Studiul datelor evidenţiate în tabel arată de asemenea că organele cele mai afectate sunt reprezentate de piele, peritoneu, cord, ficat, splină, rinichi.

Cercetările au pus în evidenţă invazii ecto- şi endoparazitare ale pielii, înotătoarelor, branhiilor şi a organelor interne *(Tabelul nr. 2)*.

Tabelul nr. 2

Situaţia bolilor parazitare diagnosticate în perioada 2005-2009

Nr. Crt.	Boala	Agentul etiologic	Specia afectată	Localizare
1.	Ichtiobodoza	*Ichthyobodo necator*	Sânger 2+, Păstrăv curcubeu	Piele, branhii
2.	Mixosporidioze	*Myxobolus spp.*	Crap 1+, 2+	Piele, branhii
3.	Trichodinoza	*Trichodina spp.*	Crap 2+	Branhii
4.	Dactilogiroza	*Dactylogyrus spp.*	Crap 0+, 1+	Branhii
5.	Boala petelor negre	*Posthodiplostomum cuticola*	Sânger 1+, 2+	Piele
6.	Arguloza	*Argulus foliaceus*	Crap 1+, 2+	Coadă
7.	Sinergasiloza	*Sinergasilus lieni*	Sânger 1+ Novac 4+ Cosaş 3+	Branhii
8.	Lerneoza	*Lernaea spp.*	Crap, Novac, Sânger, Cosaş, Caras	Piele
9.	Saprolegnioza	*Saprolegnia spp.*	Crap, Novac, Sânger, Cosaş, Caras	Piele, branhii
10.	Dermocistoza	*Dermocystidium erschovi*	Caras	Piele
11.	Boala proliferativă a rinichiului	*Tetracapsuloides bryosalmonae*	Păstrăv curcubeu	Rinichi
12.	Microsporidioza	*Microsporidia incertae*	Păstrăv curcubeu	Branhii

În tabel se evidenţiază speciile de paraziţi în concordanţă cu gazda (specia de peşte) şi localizarea organică a acestora.

Din analiza datelor din *Tabelul nr. 2* rezultă că la examenul parazitologic al pielii, branhiilor şi al unor organe efectuate la peştii din amenajările luate în studiu, s-au identificat 12 specii de paraziţi.

În fermele piscicole specia cea mai afectată (la nivelul pielii şi branhiilor) a fost crapul, la care s-au depistat şase specii de paraziţi (50%). Speciile celelalte de peşti luate în studiu au avut următorul grad de invazie: sângerul – cinci specii (41,6%), novacul, cosaşul, carasul şi păstrăvul curcubeu – câte trei specii (25%).

Rezultatele cercetărilor ilustrează faptul că branhiile constituie organul cel mai afectat, ceea ce este în concordanţă cu datele semnalate de alţi cercetători români şi străini **(3, 7, 10)**.

Din *Tabelul nr. 10* se poate observa că izbucnirea şi punctul de vârf al evoluţiei bolilor infecţioase este după perioada de iernare, primăvara, când din lipsa furajării corecte a peştilor aceştia sunt cu statusul imunitar scăzut iar, dacă densitatea piscicolă este mare, infecţiile se pot întinde pe tot parcursul verii.

Eritrodermatita a fost diagnosticată şi observată cu manifestări clinice (ulcere cutanate) în lunile cu temperaturi mai ridicate, începând din luna mai şi cu prelungire până în lunile septembrie – octombrie (perioade care coincid şi cu datele din literatura de specialitate) în care apa este mai bogată în materie organică, iar cantitatea de oxigen dizolvată în apă este mai scăzută **(4, 6)**.

Septicemia hemoragică bacteriană a fost diagnosticată la caras, la ieşirea din iernat, începând din luna aprilie, persitând până în luna mai, evoluţia acesteia fiind diagnosticată în anul 2009.

În unele cazuri, aşa cum se observă la yersinioză, boala poate evolua aproape pe tot parcursul anului, bacteria rezistând bine şi la temperaturi mai scăzute ale apei (sub 10^0C), aşa cum este menţionat şi în literatura de specialitate **(2, 6)**.

Din cercetările noastre a rezultat că acestă bacterie este încă existentă în apa din lacul Bicaz, boala fiind confirmată şi în anul 2005 la păstrăvăria luată în studiu, acum aceasta evoluând în special la exemplarele slăbite şi tinere.

Necroza hematopoietică infecţioasă a fost diagnosticată la păstrăvi proveniţi de la ferme din Italia, boala apărând în păstrăvării în luna februarie a anului 2008. Probele au fost examinate la Institutul Zooprofilactic din Udine, iar examenele histopatologice au fost executate în cadrul Laboratoarului de Morfopatologie de la Facultatea de Medicină Veterinară din Bologna.

Analizând datele din *Tabelul nr. 11* se observă că majoritatea bolilor parazitare diagnosticate s-au încadrat în limitele normale ale perioadei pe anotimpuri, observându-se clar fenomenul de sezonalitate **(10).**

Astfel, se observă că datorită infestării mari în fermele piscicole cu boala petelor negre, aceasta evoluează pe tot parcursul anului, fenomen observat la sânger la ambele ferme luate în studiu, în timp ce arguloza nu a fost întâlnită decât în lunile iulie şi august (probabil datorită condiţiilor bune de întreţinere ale bazinului).

Sursele primare naturale ale invaziilor şi parazitozelor diagnosticate au fost reprezentate de peştii purtători şi de cei bolnavi.

Una din principalele surse observate a fost cea reprezentată de peştii sălbatici pătrunşi în ferme odată cu apa de alimentare, lucru menţionat şi în literatura de specialitate **(1, 5, 9)**.

Atât în Ferma A cât şi în Ferma B au apărut şi au evoluat la crap invazii ectoparazitare cu ciliate *(Trichodina spp.),* datorită carasului introdus în bazin odată cu apa de alimentare (examinarea parazitologică a pus în evidenţă parazitul iniţial numai la caras, apoi şi la crap).

Cauza existenţei acestor surse o reprezintă alimentarea bazinelor piscicole direct cu apa din râul Jijia, pentru Ferma B şi râurile Prut şi Jijia, pentru Ferma din Ţigănaşi, fără filtrare activă. S-a observat că alimentarea cu apă se face de cele mai multe ori direct, fără amplasarea unui filtru mecanic (plasă sintetică) la gurile de alimentare, aşa cum recomandă tehnologia piscicolă şi unii cercetători în domeniu **(1, 8)**.

Sursa primară mai frecventă a invaziilor parazitare a fost reprezentată de peştii mai în vârstă rămaşi în bazin mai mulţi ani şi care păstrează un număr foarte redus de paraziţi şi în perioada de iarnă.

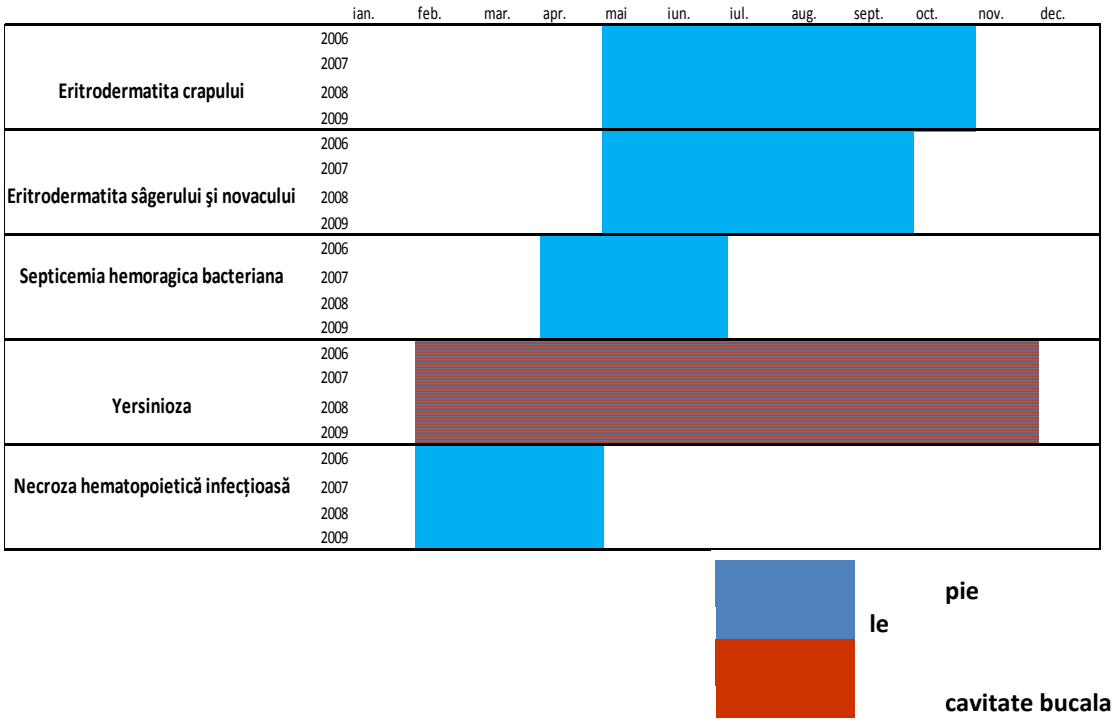
Cercetările au dovedit acest lucru punând în evidenţă invazii cu protozoare (genurile *Trichodina, Trichodinella, Myxobolus,* în exemplare unice la crap şi sânger şi în timpul iernării. De exemplu, infestaţia cu *Sinergasillus* a branhiilor la sânger a fost observată la exemplare mai în vârstă, chiar la examene parazitologice efectuate la sfârşitul perioadei de iernare (martie).

Din observaţiile noastre, existenţa unor exemplare mai în vârstă păstrate timp de mai mulţi ani în heleşteu se datorează în principal pescuitului incomplet ce are cauze în deficienţe de construcţie sau de degradare a bazinului şi fenomenelor de colmatare ale canalului colector pe care se pescuieşte cu năvodul. Astfel, în cazul Fermei A, care are în exploatare şi un lac de acumulare s-a observat că pescuitul nu se poate realiza în totalitate, rămânând astfel numeroşi peşti an după an, care sunt purtători permanenţi de paraziţi.

Tehnologia piscicolă recomandă vidarea perfectă a heleşteelor la o anumită perioadă de ani **(8)**.

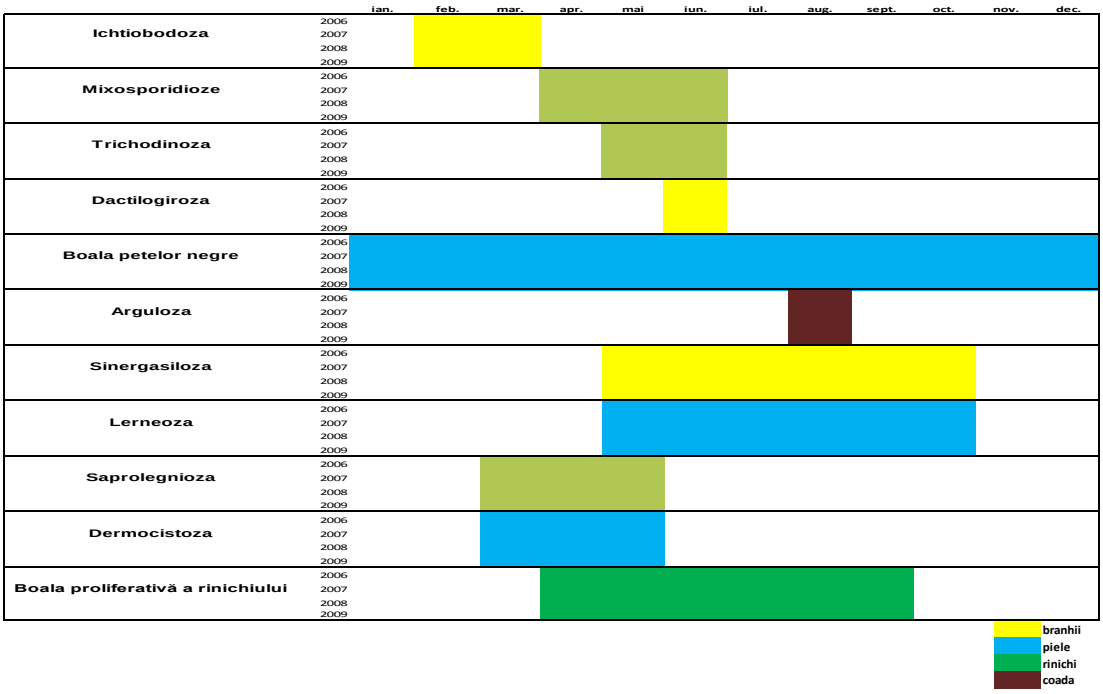
Tabelul nr. 3

Perioada de apariţie a bolilor de origine infecţioasă depistate la peştii dulcicoli din regiunea Moldovei



Tabelul nr. 4

Perioada de apariţie a bolilor de origine parazitară depistate la peştii dulcicoli din regiunea Moldovei



În acelaşi context epidemiologic, menționăm, că şi unele exemplare de peşti ce nu constituie obiect al tehnologiei cum ar fi carasul, poate rămâne în viață în ochiuri de apă datorită problemelor tehnologice de evacuare a apei din bazin. Studiile efectuate de noi, au condus la concluzia că această vidare nu se realizează în mod eficient, iar eliminarea acestor surse de invazie parazitară ar trebui făcute prin tratarea periodică a fundului bazinelor cu clorură de var (ce duce la distrugerea peştilor purtători şi a unor verigi intermediare din ciclul vital).

O altă sursă de invazie şi răspândire a parazitozelor o constituie şi păsările ihtiofage, întâlnite mai ales în cadrul Fermei B, lucru menționat şi în literatura de specialitate **(6, 10)**.

Distrugerea păsărilor ihtiofage se poate realiza doar în sezoanele permise de lege, sau prin aplicarea unor metode de îndepărtare. Melcii acvatici constituie şi aceştia o verigă importantă de transmitere a paraziților, cum ar fi în trematodoza peteşială neagră, iar distrugerea lor nu se poate realiza decât prin lăsarea bazinului pe uscat cel puțin un an de zile şi dezinfecția acestuia **(8)**.

Infestarea în cazul ectoparazitozelor s-a realizat în situații de creştere a peştilor în densitate mare sau prin menținerea îndelungată în bazine de mici dimensiuni - iernare sau stocarea peştelui pentru livrare şi mai rar prin contactul direct al acestora.

Calea cea mai importantă de invazie este apa **(1, 3)**.

Studiile noastre au evidențiat că apa nefiltrată mecanic are un rol important în transmiterea parazitozelor. Astfel, la Ferma B, se remarcă un factor de limitare a infestării prin utilizarea unui filtru plasat în zona de alimentare a heleşteelor pentru creşterea puietului. Acest filtru este alcătuit dintr-o plasă metalică aşezată pe un cadru, acoperită cu pietriş şi care formează un mic „baraj" ce traversează canalul. Astfel se identifică două avantaje ale acestei filtrări: un avantaj mecanic prin reducerea spațiilor de trecere ale apei şi a peştilor sălbatici şi un avantaj biologic datorită perifitonului care se depune ca o pânză pe suprafața pietricelelor, blocând astfel pătrunderea paraziților.

Literatura de specialitate recomandă efectuarea acțiunilor profilactice în timpul transportului sau în momentul efectuării loturilor de peşti, cât şi decontaminarea ustensilelor de pescuit **(8)**.

În decursul cercetărilor noastre am recomandat şi noi aceste acțiuni în fermele luate în studiu, dar nu am înregistrat aplicarea acestor acțiuni, un motiv fiind şi acela că gradul de invazie observat în urma efectuării examenelor parazitologice curente a fost scăzut.

Importanța efectuării tratamentelor profilactice de îmbăiere în cazul pescuirilor ce au ca scop sortarea şi mutarea peştilor de diferite vârste şi specii în alte heleştee considerăm că are o importanță foarte mare în prevenirea izbucnirii unor episoade de boli parazitare **(1)**.

Calea de invazie cea mai des întâlnită a fost cea respiratorie pentru parazitozele branhiale (dactilogiroza, sinergasiloza). S-a mai pus în evidență calea transcutanată, în cazul unor protozooze (trichodinoza), sau a trematodozelor.

CONCLUZII

1. Dintre cele 12 specii de paraziți identificate, 10 specii (83,3%) au fost întâlnite la efectivele piscicole ale Fermei A, fiind urmate de efectivele Fermei B cu 7 specii de paraziți (58,3%) şi de efectivele Fermei C, cu 2 specii de paraziți (16,6%), ceea ce denotă un polimorfism accentuat al invaziilor parazitare în Ferma A.
2. Microflora bacteriană predomină în aceeaşi Fermă A, unde s-au înregistrat evoluția a trei boli infecțioase (70%), spre deosebire de Ferma B în care au evoluat doar două (20%), iar în cazul Fermei C doar un singur caz (10%).
3. Crapul comun *(Cyprinus carpio)* a constituit specia de peşte cea mai parazitată, la care s-au identificat 7 specii de paraziți, fiind urmată de caras *(Carassius auratus gibelio)* cu 4 specii, sânger *(Hypophthalmichtys molitrix)* şi păstrăvul curcubeu *(Oncorhynchus mykiss)* cu 3 specii, novac *(Aristychtis nobilis)* şi cosaş *(Ctenopharyngodon idella)* cu câte 2 specii de paraziți.

4. Factorii epidemiologici cei mai importanți care au favorizat invaziile parazitare în fermele piscicole au fost reprezentați de peştii sălbatici pătrunşi în bazine odată cu alimentarea, peştii în vârstă purtători, creşterea în amestec de specii şi vârste şi creşterea în densitate piscicolă ridicată.
5. Factorii declanşatori ai evoluției infecțiilor naturale diagnosticate pe parcursul studiilor noastre au fost: rezistența scăzută a peştilor în perioada posthibernală, temperatura fluctuantă a mediului înconjurător (aer-apă) şi stresul de adaptare în urma transferurilor.
6. În cazul invaziilor ectoparazitare s-a observat existența fenomenului de sezonalitate, în strânsă legătură cu variațiile temperaturii mediului.

BIBLIOGRAFIE

1. **Bud I., Diaconescu Şt., Mudure M. –** *Creşterea crapului şi a altor specii de peşti,* Ed. Ceres, Bucureşti, 2004
2. **Bravo S. , Kojagura V.** – *First isolation of Yersinia ruckeri from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Peru*, Bulletin of European Association of Fish Pathologists, Vol. 24, pg. 104-108, 2004
3. **Ghittino P.** – *Tecnologia e patologia in acquacoltura* II, Patologia, Ed. Emilio Bono, Torino, Italia, 1985
4. **Guguianu Eleonora -** *Cercetări privind flora bacteriană normală şi patogenă a crapului comun (Cyprinus carpio) şi a păstrăvului curcubeu (Oncorhynchus mykiss) de crescătorie,* Teză de doctorat, USAMV Iași, 1998
5. **Guguianu Eleonora, Miron L. –** *Elemente de ihtiopatologie*, Ed. PIM, Iași, 2002
6. **Munteanu Gabriela, Bogatu D.** – *Tratat de ihtiopatologie*, Ed. Excelsior Art, Timişoara, 2003
7. **Roberts R. J.** – *Fish pathology*, 2nd edition, Ed. Bailliere Tindall, London, 2003
8. **Stan T.** – *Piscicultura,* Lucrări Practice, Centrul de multiplicare, Universitatea Agronomică, Iaşi, 1990
9. **Vulpe V., Oprean O.Z.** – Considerații epidemiologice în parazitozele peştilor dulcicoli, Lucr. Şt. Med. Vet., Vol. 45, Fasc. II, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iaşi, 2002
10. **Vulpe V.** – *Investigații privind epidemiologia, etiologia şi morfologia afecțiunilor parazitare la peştii din amenajările sistematice*. Teză de doctorat, USAMV, Iaşi, 2002

EFECTUL SUPLIMENTĂRII HRANEI CU ZINC ORGANIC LA VACILE DE LAPTE ASUPRA RĂSPUNSULUI IMUN UMORAL

EFFECT OF ORGANIC ZINC SUPPLEMENTATION DIET IN DAIRY COWS ON HUMORAL IMMUNE RESPONSE

LIONIDE A.[1], CURCA D.[2], SAMARINEANU M.[3], CISMILEANU ANA[3], NICA DANIELA[4], TOCA CRISTINA[4], BOTUS DANIELA [3]

[1]Institutul pentru Controlul Produselor Biologice şi Medicamentelor de uz Veterinar
[2]Facultatea de Medicină Veterinară Bucureşti
[3]S.N. "Institutul Pasteur" S.A.
[4]Institutul de Diagnostic şi Sănătate Animală
a.lionide@yahoo.com

In present work it was studied the effect of feeding organic sources of zinc (as Bioplex Zn), in dairy cows on humoral immune response.

The results show a increased bioavailability of zinc, this heaving a positive influence on humoral immune response.

Key words: zinc, humoral immune response, dairy cows

Zincul, element esenţial pentru viaţă, stimulează consumul hranei şi creşterea, intervine în metabolismul proteic şi energetic, este implicat în diferite faze ale organogenezei şi în reproducţie, reduce susceptibilitatea organismului la infecţii, etc. (Harmon et. al., 2003; Mihai, 1996; Underwood şi Suttle, 1999). Acţiunea zincului în organism se exercită în majoritatea cazurilor prin intermediul a peste 300 de metaloenzime dependente de zinc (anhidraza carbonică, superoxid dismutaza, fosfataza alcalină, carboxipeptidaza AB pancreatică, diferite dehidrogenaze, etc.), fiind implicat în replicarea acizilor nucleici (ADN şi ARN), sinteza proteinelor, metabolismul lipidic şi glucidic, reglarea apetitului, etc. (Grun şi Kroneman, 1978; Littledike et al., 1995 ; Schuster et al., 1980, citaţi de Mihai, 1996).

În prezent, în hrana rumegătoarelor, se pot utiliza diferite tipuri de suplimente organice minerale ce conţin zinc, acestea având biodisponibilitate şi funcţii biologice superioare comparativ cu suplimentele minerale anorganice (Cao et. al., 2000; Engle, 2001; Kincaid, 1997; Nunnery et. al., 1996; Spears, 1989 şi 1996). Carenţa în zinc este asociată cu reducerea capacităţii productive, diminuarea creşterii, reducerea apetitului, diaree, hipercheratoză, alopecie, avorturi, hipoplazie/atrofie timică, reducerea cantităţii circulante de insulină şi STH, afecţiuni oculare, afectarea metabolismului vitaminei A, conversie inferioară a hranei, imunosupresie, etc (Chesters, 1997; Graham TW, 1991; Singh et. al., 1994; Spears J. W. and E. B. Kegle, 2002).

În numeroase experimente pe oameni şi animale de laborator, deficitul de zinc în alimentaţie a redus intensitatea răspunsului imun şi rezistenţa la boli (Chesters, 1997 ; Spain 1993).

Rezultatele cercetărilor privind influenţa zincului asupra răspunsului imun umoral la bovine rămân controversate (Salyer et al., 2004; Nunnery et al., 2007 ; Lionide A. et. al., 2005 şi 2007). Studiile privind efectul carenţei în zinc asupra răspunsului imun umoral la vacile de lapte sunt relativ puţine.

În prezenta lucrare s-a cercetat efectul suplimentării raţiei cu zinc organic (Bioplex-Zn) asupra răspunsului imun umoral postvaccinal la vacile de lapte, şi totodată, biodisponibilitatea acestui microelement exprimată prin concentraţia serică.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experimentul s-a efectuat pe un număr de 12 vaci de lapte rasa BNR, aflate în lactaţia a doua (lunile 3-4 de lactaţie), cu o producţie medie de lapte de 21 litri/zi şi o stare de întreţinere corespunzătoare. Animalele, repartizate în 2 loturi a câte 6 vaci/lot, au beneficiat de acelaşi tip de raţie. Ca supliment de zinc organic s-a folosit produsul Biplex-Zn, astfel:

lotul E suplimentat cu 2,5 g Bioplex Zn (echivalent 375 mg Zn)/vacă/zi ;

lotul C (de control) care nu a primit supliment mineral.

Pentru imunizare s-au folosit 2 antigene virale: virusul bronşitei infecţioase aviare (IBV), inactivat, tulpina Massachusetts (1 ml, s.c), şi virusul bolii Aujeszky, inactivat, tulpina Bartha (2 ml, i.m.). Prima vaccinare s-a efectuat, pentru ambele loturi, la 22 de zile de la începutul experimentului, urmată de revaccinare la 14 zile de la a doua vaccinare. În vederea evaluării titrului de anticorpi (Ac) s-au recoltat probe de sânge la momentul primei (T_0) şi celei de a doua vaccinări (T_1), şi la 14 zile după revaccinare (T_f). Concentraţia serică a zincului a fost determinată la începutul (T_0) şi sfârşitul experimentului (T_f). Durata experimentului a fost de 50 de zile.

Determinarea concentraţiei serice de zinc

Materiale: aparatură (spectrometru cu absorbţie atomică echipat cu tub cu catod de zinc, compresor, butelie de acetilenă), soluţie de Brij 35, probe de ser.

Tehnica de lucru: Proba de ser a fost diluată cu o soluţie de Brij 35, iar aceasta s-a pulverizat în flacăra aer-acetilenă a unui spectrometru cu absorbţie atomică, măsurându-se absorbţia radiaţiei la lungimea de undă de 213,9 nm, utilizând ca blanc o soluţie de Brij 35. Conţinutul de zinc s-a exprimat în µg/dl, cu o zecimală şi s-a determinat direct din curba de etalonare.

Evaluarea titrului de anticorpi postvaccinali

Cuantificarea titrului de anticorpi postvaccinali s-a efectuat cu ajutorul tehnicii ELISA.

Materiale: aparatură (incubator/Shaker IEMS, spălător automat Wellwash Ascent, spectrofotometru ELISA Multiskan EX, placă ELISA căptuşită cu antigen - virusul bronşitei infecţioase aviare sau virusul bolii Aujeszky), soluţie de spălare (amestec PBS cu Tween 20), tampon de diluţie pentru seruri (amestec PBS cu Tween 20 şi yeast extract 1% sau BSA 1%), conjugat anti-IgG bovin (Sigma), substrat (amestec tampon citrat pH 4,0 şi perhidrol), cromogen (ABTS), soluţie de stopare (fluorură de sodiu 1,5%), seruri de testat.

Tehnica de lucru: S-au adaugat 100 µl ser de testat diluat (1/200 pentru determinarea anticorpilor anti-IBV şi 1/500 pentru determinarea anticorpilor anti-virus Aujeszky) în godeurile plăcii ELISA căptuşită cu antigenul corespunzător şi s-a incubat o oră la 37ºC. După incubare s-a îndepărtat conţinutul plăcii şi s-a efectuat spălarea acesteia cu 300 µl soluţie de spălare/godeu. S-a adaugat conjugat anti-IgG bovin 50 µl/godeu şi s-a incubat 30 minute la 37ºC. S-a repetat operaţia de spălare şi s-a adaugat amestec substrat-cromogen 50 µl/godeu. S-a incubat 10 minute la temperatura camerei, ferit de lumină. În continuare s-a adaugat soluţie de stopare şi s-au citit densităţile optice (DO) ale reacţiei la lungimea de undă 405 nm.

Prelucrarea statistică a datelor s-a efectuat cu ajutorul testului ANOVA.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Concentraţia serică a zincului este un indicator al biodisponibilităţii acestuia. Majoritatea cercetărilor susţin biodisponibilitatea superioară a zincului de natură organică, comparativ cu sursele anorganice de zinc.

După Wiesner (1970), citat de Mihai (1996), concentraţia plasmatică de zinc la bovine este de 80-110 µg/dl, serul conţinând în medie cu 16% mai mult zinc decât plasma (95 – 130 µg/dl), iar după Ghergariu (1999), concentraţia serică de zinc la viţei este de 166,12 ± 78 µg/dl.

Iniţial, loturile de vaci prezentau carenţă în zinc (tabel 1). În condiţiile experimentale date, s-a observat că, practic, adaosul de zinc organic (Bioplex - Zn) a adus concentraţia serică de zinc în limitele considerate normale pentru vacile de lapte. Astfel, în cazul lotului E (suplimentat cu Bioplex-Zn), concentraţia serică medie a zincului înregistrată la sfârşitul experimentului (106,33 µg/dl) a fost cu 40,83 % mai mare, comparativ cu lotul C (73,83 µg/dl); tabel 1, fig. 1 ($p < 0,001$).

Referitor la **răspunsul imun umoral postvaccinal**, s-a constatat că lotul E, suplimentat cu Bioplex Zn, a înregistrat o valoare medie a densităţilor optice corespunzătoare titrului de anticorpi postvaccinali anti-IBV

de 1240,33, mai ridicată cu 20,18 % faţă de lotul C a cărui valoare a fost 1032,66 (tabel 2, fig. 2), observându-se diferenţe semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,05$). Deşi s-au observat iniţial titruri de anticorpi anti-virus Aujeszky, răspunsul imun postvaccinal anti-virus Aujeszky a fost mai intens în cazul lotului suplimentat cu Bioplex Zn, valoarea medie a densităţilor optice înregistrate fiind 1142,16; mai mare cu 18,00 % comparativ cu lotul C, căruia i-a corespuns o valoare de 1002,83, observându-se o tendinţă de îmbunătăţire a răspunsului imun postvaccinal ($p < 0,1$; tabel 2, fig. 3).

Rezultatele indică influenţa pozitivă a compuşilor organici cu zinc asupra răspunsului imun umoral, fapt semnalat şi de alţi cercetători (Spears, 1991; Clark, 1996).

Tabelul 1

Concentraţia serică a zincului la vacile de lapte suplimentate cu Bioplex Zn

Nr. probă	Lot	Concentraţia serică a zincului (µg/dl)	
		T_0 (ziua 0)	Tf (ziua 50)
1	C	81	83
2	C	68	79
3	C	73	71
4	C	80	82
5	C	78	70
6	C	79	68
Medie		**76,5**	**75,5**
Dev. st.		5,00	6,59
7	E	80	110
8	E	73	115
9	E	71	107
10	E	75	106
11	E	76	96
12	E	68	104
Medie		**73,83**	**106,33*** **
Dev. st.		4,16	6,34
Creştere procentuală faţă de C (%)		-	40,83

Legendă: T_0 - începutul experimentului (ziua 0); T_f = sfârţitul experimentului (ziua 50)

*** - diferenţe foarte semnificative ($p < 0,001$)

Tabelul 2

Titrul anticorpilor postvaccinali la vacile de lapte suplimentate cu Bioplex Zn

Nr. probă	Lot	Titru Ac postvaccinali (DO)					
		anti- IBV			anti-virus Aujeszky		
		T_0	T_1	Tf	T_0	T_1	T_f
1	C	301	601	895	575	828	848
2	C	253	527	851	346	455	811
3	C	236	633	673	446	752	1241
4	C	339	586	776	477	549	1209
5	C	238	678	1207	408	773	1034
6	C	300	658	704	370	792	874
Medie		**277,83**	**613,83**	**1032,66**	**437,00**	**691,5**	**1002,83**
Dev. st.		41,76	54,61	86,47	82,86	151,83	188,45

Nr. probă	Lot	Titru Ac postvaccinali (DO)					
		anti- IBV			anti-virus Aujeszky		
		T_0	T_1	Tf	T_0	T_1	T_f
7	E	264	754	1368	376	637	998
8	E	193	897	1285	400	573	899
9	E	352	654	847	415	583	1410
10	E	323	932	1253	382	711	1120
11	E	354	926	1235	430	901	1386
12	E	321	832	1454	384	956	1040
Medie		**301,1667**	**832,5**	**1240,33***	**397,8333**	**726,8333**	**1142,16**
Dev st		62,17	110,29	209,21	21,22	164,63	210,72
Creştere procentuală faţă de C (%)		-	**35,62**	**20,18**	-	**6,86**	**18,00**

Legendă: T_0 = momentul primei vaccinări (ziua 22); T_1 = momentul celei de a doua vaccinări (ziua 36);T_f = sfârţitul experimentului (ziua 50) ; Ac = anticorpi; DO = densitate optică; IBV – virusul bronşitei infecţioase;* - diferenţe semnificative ($p < 0,05$).

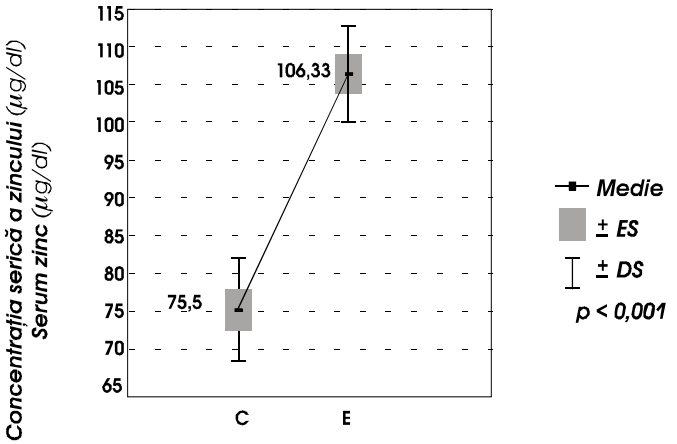


Fig. 1 Concentraţia serică medie a zincului la vacile de lapte suplimentate cu Bioplex - Zn
Fig. 1 The average serum zinc concentration in dairy cows feeded with Bioplex - Zn

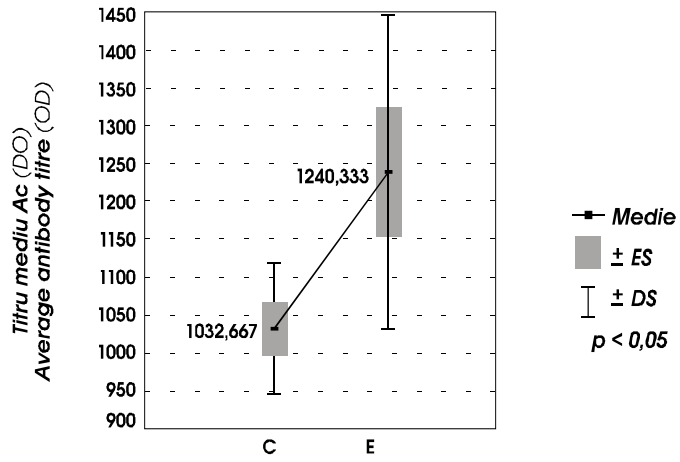


Fig. 2 Răspunsul imun postvaccinal anti - IBV la vacile de lapte suplimentate cu Bioplex - Zn
Fig. 2 Postvaccination immune response anti - IBV in dairy cows feeded with Bioplex - Zn

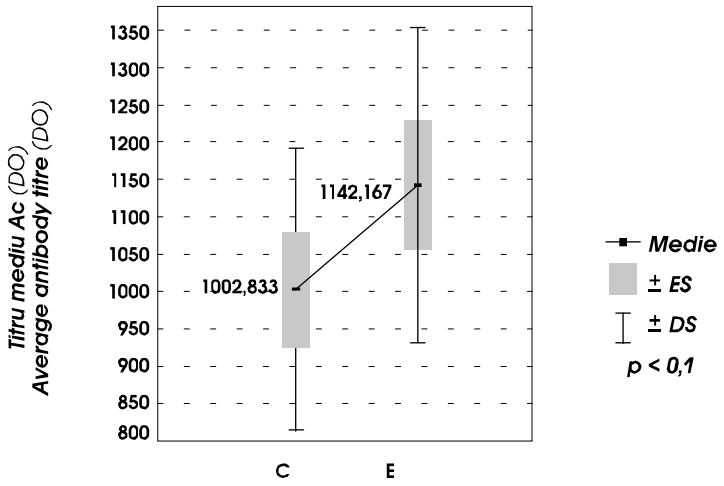


Fig. 3 Răspunsul imun postvaccinal anti-virus Aujeszky la vacile de lapte suplimentate cu Bioplex - Zn
Fig. 3 Postvaccination immune response anti-Aujeszky virus in dairy cows feeded with Bioplex - Zn

CONCLUZII

1. Concentraţia serică a zincului la vacile de lapte suplimentaţe cu Biopplex - Zn (106,33 µg/dl) a crescut cu 40,83 % faţă de lotul de control (73,83 µg/dl), fapt datorat unei biodisponibilităţi ridicate ($p < 0,001$).
2. Consecutiv administrării zincului organic (Bioplex - Zn) în alimentaţia vacilor de lapte, s-a observat o creştere a titrului de anticorpi postvaccinali anti-IBV cu 20,18 % ($p < 0,05$) şi anti-virus Aujeszky cu 18,00 % ($p < 0,1$), comparativ cu lotul C (de control).
3. Aceste observaţii au evidenţiat o biodisponibilitate ridicată a zincului de natură organică şi efectul pozitiv al acestuia asupra răspunsului imun umoral.

BIBLIOGRAFIE

1. *Cao, J., P. R. Henry, R. Guo, R. A. Holwerda, J. P. Toth, R. C. Littell, R. D. Miles, and C. B. Ammerman.*- Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *J. Anim. Sci.* **78**, pp 2039–2054, 2000.
2. *Chesters, J. K.. Zinc. In: B. L. O'Dell, and R. A. Sunde* (ed.) Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. pp 185–230. Marcel Dekker Inc., New York, 1997.
3. *Clark, C. K., R. P. Ansotegui, E. J. Swensson, J. A. Paterson, and A.B. Johnson*. - Influence of trace mineral supplementationon immune response, mineral retention, and reproduction in first-calf beef heifers. *Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci.* **47**, pp 324-327, 1996.
4. *Engle T.E*. - The role of trace minerals in immunity and lipid metabolism in cattle, Department of Animal Science, Colorado State University, USA, 2001.
5. *Ghergariu S., L. Kadar, A. Pop, Marina Spânu* – Manual de laborator clinic veterinar, Editura All Educational, Bucureşti, România, 1999.
6. *Graham T.W.* - Trace element deficiencies in cattle. Vet Clin N Am Food Anim Pract 7:153–215, 1991.
7. *Harmon R.J., P.M. Torre-Economic implications of copper and zinc proteinates: role in mastitis control.* Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposion, 2003.
8. *Kincaid, R. L., B. P. Chew, and J. D. Cronrath*. - Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: Effects on uptake and immunity. *J. Dairy Sci.* **80**, pp 1381–1388, 1997.
9. *Lionide, A., D. Curcă, M. Samarineanu* - Modificările reactivităţii limfocitare la vacile de lapte consecutiv suplimentării raţiei cu forme organice de zinc şi selenium. Simpozionul Facultăţii de Medicină Veterinară Bucureşti, 2005.
10. *Lionide A., D. Curcă, M. Samarineanu, Ana Cişmileanu Daniela Nica, Cristina Ţoca, Daniela Botuş* **-** Efectul suplimentării raţiei cu zinc organic la viţei asupra răspunsului imun umoral. Simpozionul Facultăţii de Medicină Veterinară Bucureşti, 2007.
11. *Littledike ET, Wittum TE, Jenkins TG* - Effect of breed, intake, and carcass composition on the status of several macroand trace minerals of adult beef cattle. J Anim Sci 73:2113–2119, 1995.
12. *Mihai D.- Boli de nutriţie şi metabolism*, ediţia a II-a, Editura Ceres, Bucureşti, 1996.
13. *Nunnery, G. A., G. E. Carstens, and L. W. Greene*. - Feedlot performance and carcass characteristics in steers fed different sources and levels of supplemental zinc. *J. Anim. Sci*. **74**(Suppl. 1), pp 294, 1996.
14. Nunnery G. A., J. T. Vasconcelos, C. H. Parsons, G. B. Salyer, P. J. Defoor, F. R. Valdez, M. L. Galyean - Effects of source of supplemental zinc on performance and humoral immunity in beef heifers. J. Anim Sci., doi: 10.2527/jas.2007-0167, 2007.
15. *Spain, J.*- Tissue integrity: A key defense against mastitis infection: The role of zinc proteinates and a theory for mode of action. In: *T. P. Lyons (ed.) Proc. 10th Ann. Symposium on Biotechnology in the Feed Industry.* pp 53–60, Nottingham University Press, Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY, 1993.
16. *Salyer G. B., M. L. Galyean, P. J. Defoor, G. A. Nunnery, C. H. Parsons and J. D. Rivera*.- Effects of copper and zinc source on performance and humoral immune response of newly received, lightweight beef heifers*. J. Anim. Sci.* **82**, pp 2467-2473, 2004.
17. *Singh AP, Netra PR, Vashistha MS, Sharma SN* - Zinc deficiency in cattle. Indian J Anim Sci 64:35–40, 1994.
18. *Spears, J. W.* - Zinc methionine for ruminants: Relative bioavailability of zinc in lambs and effects on growth and performance of growing heifers. *J. Anim. Sci*. **67**, pp 835–843, 1989.
19. *Spears, J. W.*- Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol*. 58, pp 151–163, 1996.
20. *Spears, J. W., R. W. Harvey, and T. T. Brown, Jr.*- Effects of zinc methionine and zinc oxide on performance, blood characteristics, and antibody titer response to viral vaccination in stressed feeder calves**.** *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 199, pp 1731–1733, 1991.
21. *Spears J. W. and E. B. Kegley* **-** Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. J. Anim. Sci.. 80:2747–2752, 2002.
22. *Underwood, E. J., and N. F. Suttle*. Zinc. In: The Mineral Nutrition of Livestock. 3rd ed. pp 477–512., CABI Publishing, New York, 1999.

TESTING OF A NEW INDIRECT ELISA METHOD FOR THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF WEST NILE VIRUS INFECTION IN HORSES

LUDU LUANDA[1], ANITA ADRIANA [1], ANITA D. [1], TANASE OANA IRINA, LECOLLINET SYLVIE [2], SAVUTA GH[1]
[1] U.S.A.M.V. Iasi
[2]UMR1161 Virology Alfort INRA, AFSSA, ENVA
luanda_elena@yahoo.com

West Nile virus (WNV) infections are still present in Romania, especially in the south east area of the country where the climate is favorable for the vector transmission of the virus in animal and human population.

The serological evaluation of the horses from the areas susceptible to feed the WNV infection gave us important epidemiological data regarding presumptive West Nile encephalitis in humans.

A new indirect ELISA method, based on the use of WNV envelope protein as the well coating antigen has been developed.

The protein has been obtained using a commercial cell line Drosophila Expression System (Invitrogen) and a plasmid p MTBIP/V5-HisA in which has been inserted the sequence coding for the E protein (P_{Ewn}) of West Nile virus (WNV IS-98-ST1 Gen Bank AF 481864).The recombinant P_{Ewn} protein obtained has been used for the development of a new indirect ELISA method.

The new ELISA method has been use in parallel with a commercial standardized ELISA method and we have obtained a very good specificity and a sensibility.

Key words: West Nile virus, horses, recombinant protein, indirect ELISA.

Since the early 1990's, the frequency and severity of WNV infections in human increased, as did the number of reports of WNV in a variety of vertebrates including pets, farm animals and wildlife (1). The increased prevalence of WNV in the last decade resulted in extensive research in human medicine and to a lesser extent, in veterinary medicine.

Nowadays WNV infections are still present in Romania, especially in the south east area of the country where the climate is favorable for the vector transmission of the virus in animal and human population (5).

The serological evaluation of the horses from the areas susceptible to feed the WNV infection gave us important epidemiological data regarding presumptive West Nile encephalitis in humans. Our previous researches showed that the seropositivity in horses is well correlated with the apparition of West Nile encephalitis in humans (3, 4).

The serological evaluation of horses can be performed using different kind of commercially ELISA diagnosis kit, but the main method remains the plaque reduction neutralizing test –PRNT(7).

A new indirect ELISA method, based on the use of WNV envelope protein as the well coating antigen has been developed as described before (2, 6).

The aim of this study was to evaluate the new house made, indirect ELISA in order to use it for the serological diagnosis of West Nile virus infection in horses.

MATERIAL AND METHODS

For the coating of the ELISA micro plates we have designed and produced a recombinant protein based on the nucleic acid sequences coding for the envelope protein of West Nile virus.

The protein has been obtained using Drosophila Expression System (Invitrogen K4110-01) containing the vector pMT/BiP/V5-His A in which has been inserted the sequence coding for the E protein (P_{Ewn}) of

West Nile virus (WNV IS-98-ST1 Gen Bank AF 481864). The construction has been made using the restriction enzymes Bgl II-NotI as described in the producer manual.

The supernatant from S2 cell culture expressing the new recombinant protein was filtered by ultra centrifugation 4°C 1h30/ 5000 rpm using Vivaspin colons (VivaSpin, polyethersulfone – 10 000 MWCO – VS2001, *VivaScience, Sartorius group).*

The recombinant P_{Ewn} protein obtained has been used for the development of a new indirect IgG ELISA method. The micro plates were coated with the P_{Ewn} and kept overnight at 4°C. After that, the protocol followed the classical steps of an indirect ELISA: blocking step, dilution and disposal of the samples, HRPO-conjugated goat serum (against horse IgG), TMB substrate, STOP solution and reading the OD at 450nm. We have used as positive and negative control, the control sera from the commercial kit ID Screen® West Nile Competition and samples from naturally infected and non infected horses.

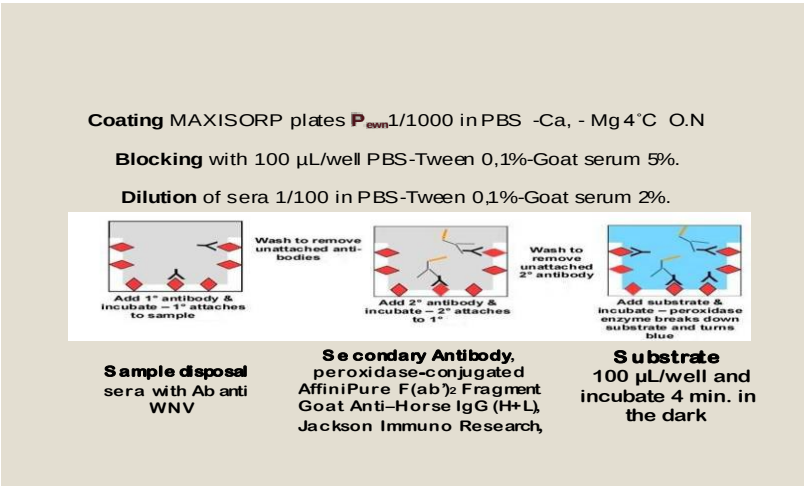


Fig. no.1 Representation of the he P_{Ewn} indirect Elisa protocol

In order to determine and improve the specificity and sensibility of the test we have retested sera samples with a known antibody titre, tested before by a standardized ELISA method and plaque reduction neutralizing test (PRNT) in the laboratory of virology, UMR 1161, Maison Alfort, France.

RESULTS

We have evaluated using the new indirect IgG ELISA method 49 horse sera 32 negative and 17 positive, used with different dilutions in PBS-Tween 0,1%-Goat serum 2%.

From the 32 negative sera, non diluted, we have obtained 6 negative samples, 7 doubtful and 19 positive and from the 17 positive samples we have obtained 13 positive, 1 doubtful and 3 negative (Table no1.and 2)

Table no1. Results obtained using the new ELISA P $_{Ewn}$ in comparison with the reference test (non diluted samples)

Sample		Reference test results	Samples non diluted	Sample		Reference test results	Samples
1	M1	N	N	15	M23	N	*P*
2	M2	P	P	16	M25	N	*P*
3	M3	N	*D*	17	M26	N	*D*
4	M4	N	*D*	18	M27	N	*D*
5	M5	N	*P*	19	M31	N	*P*
6	M7	P	*N*	20	M33	N	*P*
7	M8	N	*P*	21	M35	N	*P*
8	M9	N	*P*	22	M36	N	*P*
9	M12	N	*D*	23	M38	P	P
10	M17	N	*P*	24	M39	N	*P*
11	M18	N	*P*	25	M40	P	P
12	M19	N	*P*	26	M48	N	*P*
13	M20	N	*P*	27	M50	N	*P*
14	M21	N	*P*				

Table no 2. Results obtained using the new ELISA P $_{Ewn}$ in comparison with the reference test (different dilutions)

Sample		Reference test results	Samples non diluted	Samples diluted 1/30	Samples diluted 1/100
28	B1	N	P	N	N
29	B2	P	P	P	P
30	B3	P	P	P	P
31	B4	N	N	N	N
32	B5	P	P	N	N
33	B6	P	P	P	P
34	B7	P	P	P	P
35	B8	P	P	P	P
36	B9	N	D	N	N
37	B10	P	N	P	P
38	B11	P	D	P	P
39	B12	N	N	N	N
40	B13	P	P	P	P
41	B14	P	N	N	N
42	B15	P	P	P	P
43	B16	N	N	N	N
44	B17	N	N	N	N
45	S1	N	D	P	N
46	S2	P	P	P	N
47	S3	N	P	N	N
48	S5	P	P	P	P
49	S6	N	N	P	N

Following the results obtained with the non diluted samples we have considered that the protein is binding non specifically to the horse sera so we have chosen 22 samples, 13 positive and 9 negative (table no.2) to dilute at 1/30 and 1/100.

The results of the samples diluted at 1/30 showed us 7 negative (real negative) and 2 positive (false positive) samples from the real negative ones and 11 positive (real positive) and 2 negatives (false negative) from the real positive ones, meaning a **84,61%** sensibility and a **77,77%** specificity.

With the dilution of 1/100 the results showed 9 negative (real negative) and 0 positive (false positive) samples from the negative ones and 11 positive (real positive) and 2 negatives (false negative) from the positive ones meaning a **76,92%** sensibility and a **100%** specificity.

Table no. 3 Calculation of the specificity and sensibility in the case of samples diluted 1/100

P_{Ewnv} ELISA results	Positive results	Negative results	
+	RP 11	FP 0	Pa 10
-	FN 2	RN 9	12
	Pr 13	9	22

Se= (RP/RP+FN) x100 =>
Se P_{Ewnv} ELISA=76,92%

Sp= (RN/RN+FP) x100 =>
Sp P_{Ewn} ELISA=100%

CONCLUSIONS

The new indirect IgG ELISA P_{Ewn} method used for the serological evaluation of West Nile virus infection in horse sera is sensible and specific in comparison with the plaque reduction neutralizing test (PRNT).

The tests made for the evaluation of the new indirect ELISA P_{Ewn} showed us an 84, 61% sensibility and a 77, 77% specificity with the sera diluted 1/30 and a 76, 92% sensibility and a 100% specificity with the sera diluted 1/100 comparing with the results obtained on the plaque reduction neutralizing test.

The use of the new indirect IgG ELISA P_{Ewn} is less expensive than the commercially available tests and can be used for the preliminary serologic diagnosis of West Nile virus in horses in any laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks are given to Ms. Karine Courbeyrette and Erica Navarro-Sanchez from the Pasteur Institute France for the help and matherials provided on the protein production stage.

BIBLIOGRAPHY

1. Hubalek Z, Halouzka J. 1999. West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. Emerg.Infect.Dis.5:643–50
2. Oliphant, T., Engle, M., Nybakken, G. E., Doane, C., Johnson, S., Huang, L., Gorlatov, S., Mehlhop, E., Marri, A. & other authors (2005). Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. Nat Med 11, 522–530
3. Popovici F, A Sarbu, O Nicolae, A Pistol, R Cucuiu, B Stolica F Furtunescu, M Manuc, M I Popa, West Nile fever in a patient in Romania, August 2008: case report, Eurosurveillance, Volume 13, Issue 39, 25 September 2008
4. Savuța Gh., Aurelia Ionescu, Gina Dragomir, Adriana Aniță, D. Aniță, Luanda Ludu, Serological investigations of WNV infection in horses from the south-east of Romania, USAMV-CN Volume, 64/2007(-)ISSN 1454-2382
5. Savuța Gh, Ludu Luanda, Aniță D, Aniță Adriana, Ionescu Aurelia: West Nile virus infections in Romania – past, present and perspective, Buletin USAMVB, aprilie 2008
6. Seif, S. A., Morita, K. & Igarashi, A. (1996). A 27 amino acid coding region of JE virus E protein expressed in E. coli as fusion protein with glutathione-S-transferase elicit neutralizing antibody in mice. Virus Res 43, 91–96.
7. West Nile fever, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Aquatic Animals, chapter 2.1.2 0.

EVALUAREA EFECTULUI ANTIFUNGIC AL RADIAŢIILOR ULTRAVIOLETE DE TIP C ASUPRA BIOFILMELOR LEVURICE

EVALUATION OF ANTIFUNGAL EFFECT OF ULTRAVIOLET RADIATION TYPE C AGAINST FUNGAL BIOFILMS

MALIC LUMINITA, BOBUTAC MARIA NICOLETA, MORARU RAMONA
Facultatea de Medicină Veterinară Iaşi
luminitamalic@gmail.com

To evaluate the fungicide effect of type C ultraviolet radiation were tested strains belonging to the genus Candida. The selection of strains producing biofilms was made by repeated tests on a number of 150 yeasts strains isolated from acid dairy milk products, different biological samples taken from immunocompromised patients and from the semen collected from breeding boars. Out of the total isolates, were selected 50 species that following repeated tests proved to generate biofilms. All strains were purified and identified to species level using mini API galleries, as the recommended design by the manufacturer.

Each strain was then cultivated on Sabouraud Chloramfenicol agar medium for 24 hours at a temperature of 35 ° C. After finishing the incubation time, there have been made 5 McFarland saline suspension (107 UFC / mL).

To create biofilms were used watch sterile glasses where there have been distributed 100µL yeasts suspension and 900 µL Sabouraud broth glucose 8%, after that being incubated at 35° C. The formed biofilms were UV irradiated after 24 hours and 48 hours of incubation with different doses by positioning the generating UV radiation lamp at different distances from the watch glasses with biofilms and by modifying irradiation times.

The yeasts viability of the cells included in biofilms structure was verified after UV irradiation.

The cid effect of the C type UV radiation appeared after 60 minutes irradiation from 50 cm away for 24 h biofilms, and after 90 min. of irradiation from 50 cm away for 48 h biofilms. In both cases the reducing number of viable cells was in proportion of 99.99%. The obtained results confirmed the resistance of the yeasts included in matrix structure of biofilms.

Key words: yeasts, biofilms, UV radiation

Pentru testarea efectului radiaţiilor ultraviolete de tip C asupra biofilmelor fungice, protocolul experimental a urmărit parcurgerea a doua etape: selecţionarea tulpinilor producătoare de biofilme şi testarea radiaţiilor în condiţii cunoscute.

MATERIALE ŞI TEHNICI DE LUCRU:

În scopul realizării testărilor propuse au fost folosite următoarele materiale:

- **Material biologic:**

Tulpini levurice - Selecţionarea tulpinilor producatoare de biofilme s-a realizat prin teste repetate pe un număr de 150 tulpini levurice izolate din produse lactate acide, diferite prelevate biologice ale unor bolnavi imunocompromişi, precum şi din material seminal recoltat de la vieri de reproducţie. Din totalul de tulpini analizate au fost reţinute 50 de tulpini care, în urma unor testări repetate, s-au dovedit a fi generatoare de biofilme. Au fost identificate 27 tulpini de *Candida parapsilosis,* 5 tulpini de *Candida krusei,* 6 tulpini de *Candida glabrata,* 8 tulpini de *Candida albicans*, o tulpină de *Candida norvegensis*, o tulpină de *Candida catenulata*, o tulpină de *Candida pelliculosa* şi o tulpină de *Candida tropicalis.*

- **Sticlărie şi consumabile de laborator:**
- Microplăci cu 96 de godeuri sterile cu formă plată; Sticle de ceas sterile
- Galerii ID 32C pentru identificarea levurilor (bioMerieux, Franţa)
- Soft de identificare ApiWeb 1.2.1.

- Plăci Petri Ø 90 mm, sterile
- Plăci Petri 120x120mm, sterile
- Anse calibrate 10 µL de unică folosinţă

- **Aparatură:**

- Pipete semiautomate
- Termostat tip Memmert;
- Hotă cu flux laminar tip II;
- Microscop ranversat cu fluorescenţă Olympus IX 51

- **Medii de cultură şi reactivi:**

- Sabouraud Chlormafenicol Agar
- Bulion Sabouraud 8% glucozat
- Ser fiziologic şi apă distilată sterile
- Colorant fluorescent Calcofluor White
- Densimat – Etalon 5 McFarland;

Tehnici de lucru

Pentru testarea efectului radiaţiilor ultraviolete de tip C asupra biofilmelor fungice, protocolul experimental a urmărit parcurgerea a doua etape: selecţionarea tulpinilor producătoare de biofilme şi testarea radiaţiilor în condiţii cunoscute.

Selectarea tulpinilor producătoare de biofilme

Prima etapă a constat în diferenţierea tulpinilor levurice producătoare de biofilme faţă de cele incapabile de a genera această stuctură complexă. În acest scop a fost utilizat un model experimental standardizat, realizat de Shin şi col. (2002). Astfel, a fost supus testării un număr de 150 de tulpini levurice din genurile Candida şi Saccharomyces, izolate din diferite surse: pacienţi imunodeficitari (candidoze orale, candidoze vaginale, balanite candidozice, stomatite de proteze, candidoze orofaringiene), material seminar la vierii de reproducţie şi respectiv produse lactate acide din industria alimentară. Toate tulpinile au fost purificate şi identificate până la nivel de specie cu ajutorul galeriilor miniAPI, conform tehnicii de lucru recomandate de producător. De asemenea, pentru fiecare tulpină luată în studiu au fost realizate frotiuri Gram

Fiecare tulpină a fost apoi cultivată pe mediu Sabouraud Chloramfenicol Agar timp de 24 de ore la temperatura de 35°C. După expirarea timpului de termostatare, s-au realizat suspensii saline folosindu-se ca indicator scara McFarland.

Numărul unităţilor formatoare de colonii a fost stabilit cu ajutorul scării McFarland valoarea 5 (aproximativ 10^7 UFC/ mL). Din fiecare suspensie au fost prelevaţi câte 20 µL şi repartizaţi în câte un godeu al microplăcii cu godeuri sterilă, peste care au fost adăugaţi 180 µL mediu bulion Sabouraud 8% glucoză.

Ca martor şi elemente de comparaţie, în primul godeu (A1) au fost repartizaţi 20 µL apă distilată sterilă şi 180 µL mediu bulion Sabouraud 8% (Fig.1). Acest mediu îmbunătăţit este recomandat de câţiva autori ca sursă nutritivă de stimulare a structurilor matriceale ale biofilmelor levurice.

Microplăcile au fost incubate timp de 24 ore respectiv 48 ore, fără agitare, la temperatura de 35°C. După termostatare, din fiecare godeu a fost aspirat uşor mediul de cultivare apoi microplăcile au fost spălate o singură dată cu apă distilată sterilă. După spălarea cu apă distilată sterilă, s-au adăugat 40 µL colorant „Calcofluor white" pentru fiecare godeu. După 30-40 de minute a fost înlăturat colorantul, iar fiecare godeu a fost examinat la microscopul cu fluorescenţă ranversat Olympus IX 51(Fig. 2). Examinarea microscopică a fiecărui godeu a urmărit următoarele elemente: organizarea celulelor levurice în straturi suprapuse, existenţa matricei polizaharidice, precum şi evidenţierea procesului de burjeonare. Vizualizarea s-a realizat prin întreruperea procesului de formare la 24 de ore şi 48 de ore

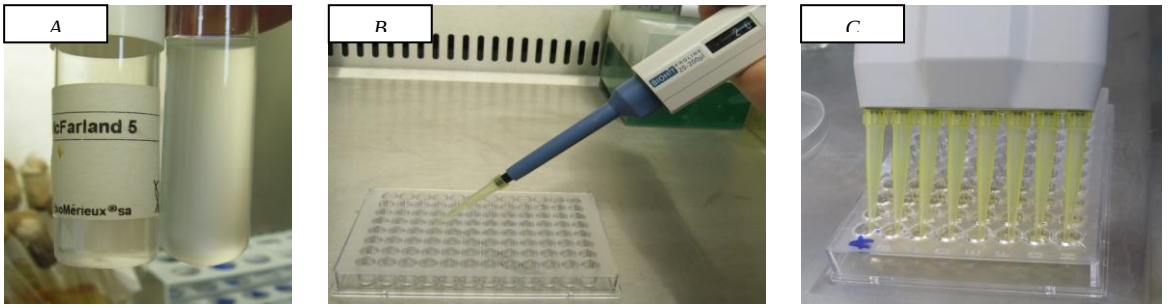


Fig. 1. Etapele realizării biofilmelor levurice
A. Prepararea suspensiei saline (10^7 UFC/ mL),
B. Repartizarea a 20 µL în fiecare godeu,
C. Adăugarea mediului de cultură

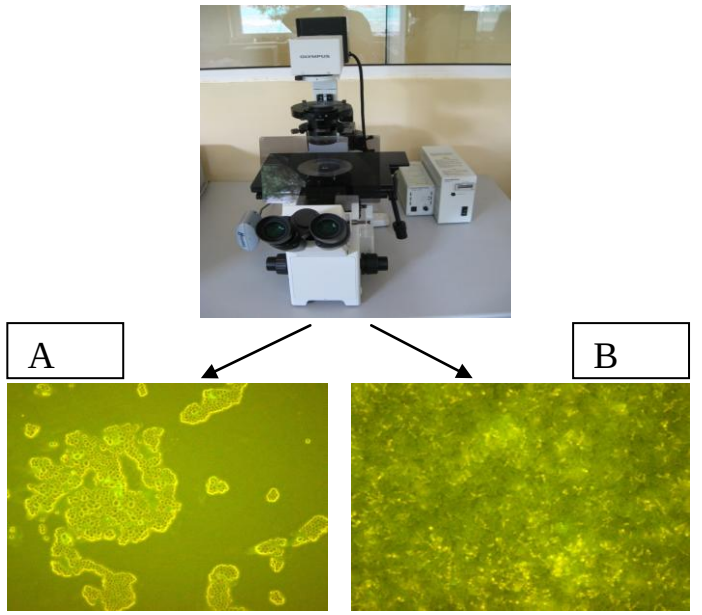


Fig. 2. Microscop ranversat Olympus IX 51
A. Biofilm negativ la Candida krusei prin evidenţierea fazei lichide
B. Biofilm pozitiv la Candida parapsilosis prin evidenţierea matricei polizaharidice

După coroborarea rezultatelor obţinute au fost reţinute 50 de tulpini care s-au dovedit a fi generatoare de biofilme. Au fost identificate 27 tulpini de *Candida parapsilosis,* 5 tulpini de *Candida krusei,* 6 tulpini de *Candida glabrata,* 8 tulpini de *Candida albicans*, o tulpină de *Candida norvegensis*, o tulpină de *Candida catenulata*, o tulpină de *Candida pelliculosa* şi o tulpină de *Candida tropicalis.*

Etapa a II-a a studiului a urmărit efectul radiaţiilor ultraviolete de tip C asupra biofilmelor levurice de 24 ore respectiv 48 ore, formate pe sticle de ceas sterile.

Tulpinile levurice au fost cultivate timp de 24 de ore pe mediu Sabouraud Chloramfenicol Agar la temperatura de 35°C. Au fost realizate suspensiile saline cu o turbiditatea echivalentă tubului nr.5 al scării McFarland (aproximativ 10^7 UFC/ mL.). Din suspensiile levurice realizate au fost repartizaţi câte 100 µL în câte 10 sticle de ceas sterile pentru fiecare tulpină testată. Cele 10 sticle de ceas corespund martorilor (24 şi

48 de ore) precum şi timpilor de contact cu radiaţiile ultraviolete pentru testările în cazul biofilmelor de 24 şi 48 de ore. Peste cei 100 µL de suspensie au fost adăugaţi 900 µL mediu bulion Sabouraud 8% glucoză. Sticlele de ceas au fost introduse în plăci Petri 120x120mm pentru evitarea contaminării externe, apoi acestea au fost incubate timp de 24 respectiv 48 de ore la 35°C.

La expirarea timpului de contact, din sticlele de ceas a fost înlăturat mediul de cultivare după care acestea au fost spălate cu apă distilată sterilă. Biofilmele astfel pregătite au fost expuse la radiaţii ultraviolete de tip C, la distanţele de 20 cm şi 50 cm şi timp de iradiere variabil de 5, 15, 30, 60 şi 90 de minute.

Pentru verificarea efectului radiaţiilor ultraviolete de tip C, după expunerea sticlelor de ceas, s-a adăugat 400 µL ser fiziologic steril peste biofilmul iradiat. Resuspendarea s-a efectuat prin mişcări circulare uşoare. Viabilitatea celulelor iradiate s-a realizat prin dispersarea a 10 µL din această suspensie cu ajutorul unei anse microbiologice calibrate de unică folosinţă pe suprafaţa unei plăci Petri Ø90 mm cu mediu Sabouraud Chloramfenicol Agar, şi incubarea la temperatura de 35°C timp de 3-5 zile. Interpretarea rezultatelor s-a realizat prin compararea gradului de dezvoltare a unităţilor formatoare de colonii iradiate cu cea a celulelor din proba martor.

REZULTATE OBŢINUTE ŞI DISCUŢII

Iradierea sticlelor de ceas cu biofilme s-a realizat prin amplasarea lămpii generatoare de UV la 20 cm şi la 50 cm faţă de acestea. Timpii de iradiere au fost de 5 minute, 15 minute, 30 minute, 60 minute şi 90 de minute.

În figura 3 este prezentat aspectul coloniilor de *Candida albicans* din biofilmele de 24 de ore, iradiate de la o distanţă de 20 cm, comparativ cu placa martor, neiradiată. Analizând aspectele culturale ale coloniilor dezvoltate după iradierea biofilmelor se poate remarca faptul că, nu există diferenţe faţă de placa martor a coloniilor provenite din biofilmele iradiate timp de 5 şi 15 minute. Coloniile apar grupate în gazon pe prima porţiune de însămânţare, după care se evidenţiază colonii izolate, bine delimitate corespunzătoare speciei *Candida albicans.* De asemenea, şi în cazul plăcilor corespunzătoare timpilor de contact cu radiaţia UV de 30 şi 60 de minute, diferenţele sunt nesemnificative, aspectul cultural fiind de cultură în gazon pe liniile de însămânţare şi colonii izolate, caracteristice în restul plăcii Petri. Imaginea evidentă a reducerii nr. UFC este cea corespunzătoare iradierii timp de 90 de minute. Pe suprafaţa mediului de cultivare nu s-a dezvoltat nicio colonie levuriformă, procentul de reducţie a nr. UFC/mL fiind de aproximativ 99.99%.

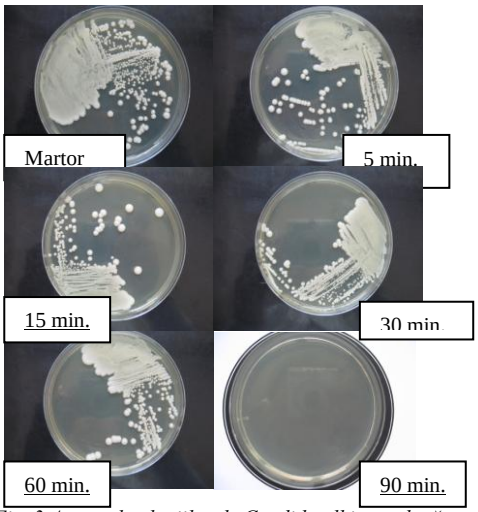


Fig. 3 Aspectul coloniilor de Candida albicans după iradierea de la 20 cm a biofilmelor de 24 de ore

În figura 4 sunt prezentate aspectele culturale ale coloniilor de *Candida albicans* din biofilmele de 48 de ore corespunzătoare fiecărui timp de iradiere de la o distanţă de 20 cm. Plăcile corespunzătoare timpilor de 5, 15 şi 30 de minute de expunere la acţiunea radiaţiilor ultraviolete se prezintă nemodificat, cu aspect de gazon al coloniilor, pe liniile primare de însămânţare şi sub formă de colonie izolată, specifică caracterelor culturale ale speciei, în ultimul sfert al plăcii.

În ceea ce priveşte aspectul coloniilor levurice din placa pe care s-a distribuit suspensie a biofilmului iradiat timp de 60 de minute, se poate observa o reducere a numărului de colonii dezvoltate pe liniile de însămânţare şi rare colonii izolate pe restul suprafeţei mediului. Pe suprafaţa mediului din placa corespunzătoare iradierii timp de 90 de minute nu s-a dezvoltat nicio colonie de tip levuriform.

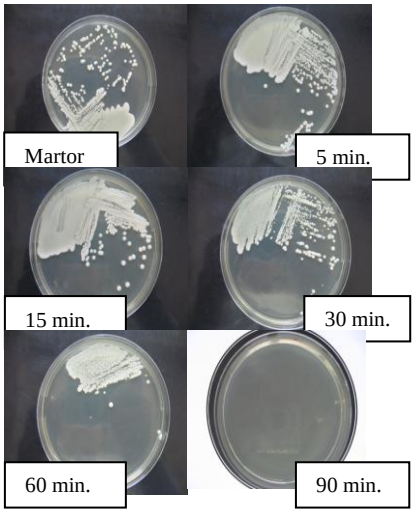


Fig. 4 Aspectul coloniilor de Candida albicans după iradierea de la 20 cm a biofilmelor de 48 de ore

În figura 5 se prezintă imaginile culturilor levurice a speciei *Candida albicans* inclusă în biofilm de 24 de ore. Plăcile au fost însămânţate cu 10 µL suspensii din biofilmele iradiate de la 50 cm timp de 5, 15, 30 şi 60 de minute. Se observă aspectul cultural asemănător din plăcile corespunzătoare primilor trei timpi de iradiere, fără diferenţe semnificative faţă de placa martor neiradiată. Cultura este sub formă compactă, în gazon pentru primele linii de distribuire a suspensiilor şi prezenţa coloniilor izolate, bine delimitate pe suprafaţa ultimului sfert de cultivare. Reducerea numărului unităţilor formatoare de colonii este evidentă începând cu iradierea timp de 60 de minute deoarece pe suprafaţa mediului apar doar colonii izolate. Placa ce corespunde iradierii timp de 90 de minute este lipsită de colonii levurice, efectul UV fiind în acest caz în proporţie de peste 99%.

În figura 6 este prezentat aspectul coloniilor levurice de *Candida albicans* incluse în biofilm de 48 de ore. Se observă aspectul cultural asemănător din plăcile corespunzătoare primilor doi timpi de iradiere, fără diferenţe semnificative faţă de placa martor neiradiată. Cultura este compactă, în gazon pentru primele linii de distribuire a suspensiilor şi prezenţa coloniilor izolate, bine delimitate pe suprafaţa ultimului sfert de cultivare. Placa pentru 30 de minute de iradiere conţine cultură în gazon pe o suprafaţă mică a primului sfert şi multe colonii izolate pe restul suprafeţei. Reducerea numărului unităţilor formatoare de colonii este evidentă începând cu iradierea timp de 60 de minute pe suprafaţa mediului apar doar colonii izolate pe linila de însămânţare. Placa ce corespunde iradierii timp de 90 de minute este lipsită de colonii levurice, efectul UV fiind în acest caz în proporţie de peste 99%.

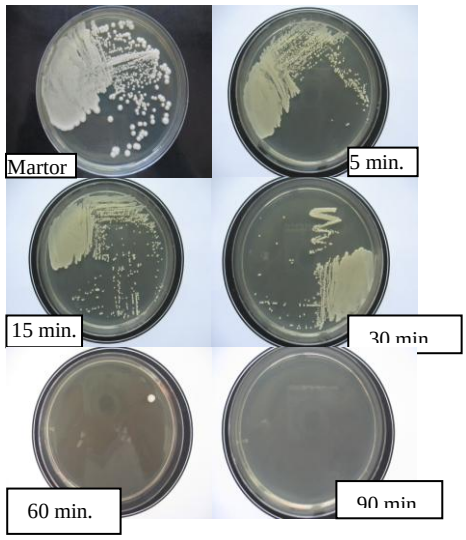


Fig. 5 Aspectul coloniilor de Candida albicans după iradierea de la 50 cm a biofilmelor de 24 de ore

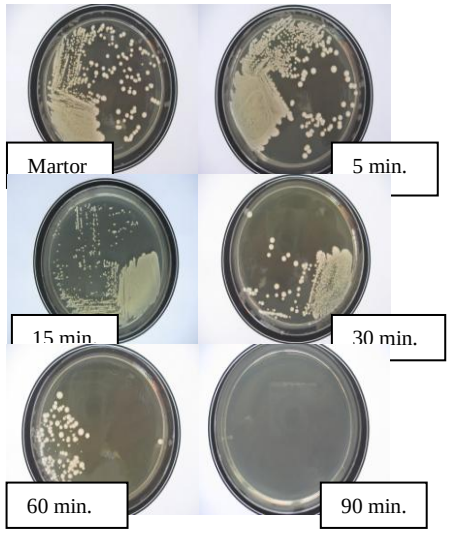


Fig. 6 Aspectul coloniilor de Candida albicans după iradierea de la 50 cm a biofilmelor de 48 de ore

DISCUȚII

Fungii levuriformi se găsesc în mod natural înglobați în structura polizaharidică (matrix) a biofilmelor. Biofilmele pot conține fie o singura specie microbiana dar mai frecvent aceste structuri gazduiesc mai multe tipuri de microorganisme, şi poartă denumirea de biofilme mixte.

Scopul cercetărilor a fost de a studia efectul produs de radiațiile ultraviolete de tip C asupra biofilmelor levurice formate pe diferite suprafețe. Datorită faptului că nu toate tulpinile levurice au capacitatea de a forma biofilme în prima etapă a experimentului s-a urmărit selectarea tulpinilor producătoare de biofilme.

Biofilmele levurice intră în contact cu pacienţii sau cu produsele alimentare prin intermediul instrumentelor contaminate. Aceste obiecte reprezintă substratul solid de formare a biofilmelor. Din păcate, de cele mai multe ori, aceste suprafeţe au forme anfractuoase, forme şi diametre mici şi sunt în contact permanent cu substanţe organice sau nutrienţi. Aceste condiţii sunt ideale pentru dezvoltarea „comunităţilor microbiene" contaminante.

Selectarea tulpinilor producătoare de biofilme s-a realizat dintr-un număr de 150 de tulpini aparţinând genurilor Candida şi Saccharomyces, izolate din diferite surse: fungemii la pacienţi imunocompromişi (candidoze orale, vaginale, balanite candidozice, stomatite de proteze, candidoze orofaringiene), din material seminar la vierii de reproducţie şi din industria alimentară, respectiv din produse lactate acide. Din totalul de levuri analizate au fost reţinute 50 de tulpini care, în urma unor testări repetate, s-au dovedit a fi generatoare de biofilme. Au fost identificate 27 tulpini de *Candida parapsilosis,* 5 tulpini de *Candida krusei,* 6 tulpini de *Candida glabrata,* 8 tulpini de *Candida albicans*, o tulpină de *Candida norvegensis*, o tulpină de *Candida catenulata*, o tulpină de *Candida pelliculosa* şi o tulpină de *Candida tropicalis.*

Modelul experimental efectuat pentru producerea biofilmelor este recomandat de literatura de specialitate şi a fost adaptat pentru suprafeţele folosite. Ca mediu de cultivare şi de realizare a biofilmelor a fost folosit mediul bulion Sabouraud cu 8% glucoză. Îmbunătăţirea cantităţii de glucid în compoziţia mediului de cultivare este recomandată de autori precum Shin şi col. 2002 pentru asigurarea unei cantităţi suficiente de nutrienţi pentru formarea biofilmelor.

Rezultatele obţinute după selectarea tulpinilor producătoare de biofilme sunt în concordanţă cu rezultatele întâlnite în literatura de specialitate. Specia *Candida parapsilosis* este izolată frecvent din structurile glicocalixului matriceal al biofilmelor responsabile de infecţiile *in vivo* mai ales la pacienţii imunosupresaţi.

Printre levurile selectate ca fiind producătoare de biofilme se numără şi tulpinile izolate din produse lactate acide, respectiv *Candida catenulata* izolată din sortimentul caş proaspăt de oaie şi *Candida pelliculosa* izolată din structura sortimentului telemea de vacă. Gradul de patogenitate al acestor tulpini a fost descris în literatura de specialitate (Douglas, 2003) la două cazuri, ambele cu bolnavi imunosupresaţi după intervenţii chirurgicale profunde.

Analiza microscopică a biofilmelor s-a realizat treptat, în funcţie de durata de incubare a biofilmelor (24 şi 48 de ore la 35°C). În cazul speciilor care nu au format biofilme imaginea microscopică a redat aspectul fazei lichide, de picătură sub forma unor grupuri de celule levurice disipate pe toată suprafaţa câmpului microscopic. În ceea ce priveşte imaginea microscopică a celulelor levurice înglobate în structura matriceală a biofilmelor se pot observa diferenţe în ceea ce priveşte gradul de compactizare, densitatea şi modul de aşezare a acestora. În toate cazurile, apar diferenţe ale acestor parametrii la biofilmele de 24 de ore faţă de cele de 48 de ore. Imaginea biofilmelor bine structurate de 48 de ore se caracterizează prin existenţa a numeroase straturi celulare suprapuse şi prin prezenţa matrixului sub forma unei nebuloase fluorescente care acoperă celulele înglobate.

Un alt obiectiv urmărit în acest experiment a fost acela al determinării timpului optim de contact şi a distanţei de iradiere necesare obţinerii unui efect cid total faţă de celulele levurice incluse în structura biofilmelor. Pentru realizarea acestui obiectiv s-au ales două distanţe de iradiere, respectiv 20cm şi 50 cm faţă de sticlele de ceas cu biofilme de 24 şi 48 de ore. Timpii de contact au fost de 5 minute, 15 minute, 30 de minute, 60 de minute şi 90 de minute.

Aprecierea efectului cid s-a realizat prin resuspendarea biofilmelor iradiate şi însămânţarea a 10 µL din suspensiile respective pe mediu Sabouraud Chloramfenicol Agar. După incubarea plăcilor Petri timp de 3-5 zile la temperatura de 35°C s-a apreciat gradul de creştere al celulelor levuriforme comparativ cu plăcile martor neiradiate. În urma analizei comparative a plăcilor termostatate s-a observat apariţia unui efect de reducere a numărului unităţilor formatoare de colonii după iradierea timp de 60 de minute prin amplasarea lămpii UV atât la 20 de cm cât şi la 50 de cm. Efectul cid total a fost obţinut prin prelungirea timpului de contact la 90 de minute indiferent de distanţa de iradiere şi durata de formare a biofilmelor.

Rezultatele obţinute au confirmat datele întâlnite în literatura de specialitate cu privire la rezistenţa manifestată de celulele levurice organizate sub formă de biofilme la acţiunea radiaţiilor ultraviolete de tip C comparativ cu forma planctonică a acestor microorganisme.

CONCLUZII

1. Pentru testarea efectului radiaţiilor ultraviolete de tip C asupra biofilmelor fungice, protocolul experimental a urmărit parcurgerea a doua etape: selecţionarea tulpinilor producătoare de biofilme şi testarea radiaţiilor germicide în condiţii prestabilite.
2. Selectarea tulpinilor producătoare de biofilme s-a realizat dintr-un număr de 150 de tulpini aparţinând genurilor Candida şi Saccharomyces, izolate din diferite surse: fungemii la pacienţi imunocompromişi (candidoze orale, vaginale, balanite candidozice, stomatite de proteze, candidoze orofaringiene), din material seminar la vierii de reproducţie şi din industria alimentară, respectiv din produse lactate acide. Au fost reţinute 50 de tulpini care, în urma unor testări repetate, s-au dovedit a fi generatoare de biofilme. Au fost identificate 27 tulpini de *Candida parapsilosis,* 5 tulpini de *Candida krusei,* 6 tulpini de *Candida glabrata,* 8 tulpini de *Candida albicans*, o tulpină de *Candida norvegensis*, o tulpină de *Candida catenulata*, o tulpină de *Candida pelliculosa* şi o tulpină de *Candida tropicalis.*
3. După iradierea biofilmelor dezvoltate pe suprafaţa sticlelor de ceas apariţia unui efect de reducere a numărului unităţilor formatoare de colonii după iradierea timp de 60 de minute prin amplasarea lămpii UV atât la 20 de cm cât şi la 50 de cm. Efectul cid total a fost obţinut prin prelungirea timpului de contact la 90 de minute indiferent de distanţa de iradiere şi durata de formare a biofilmelor.
4. Rezultatele obţinute ne îndreptăţesc să recomandăm utilizatorilor de surse de decontaminare UV, prelungirea timpului de iradiere la minim 60 de minute în cazul amplasării lămpilor germicide la 50 de cm faţă de suprafeţele supuse decontaminării. De asemenea, recomandăm utilizarea acestui tip de agent fizic în special pentru reducerea încărcăturii micotice din incinte.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

1. Baillie G. S., Douglas L. J. 2000 – Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents; Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 46:397- 403.
2. Chandra J. 2001 – Antifungal resistance of Candida biofilms formed on denture acrylic in vitro; Journal of Dental Research; 80:903-908.
3. Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K 2001- Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance. Journal of Bacteriology ; 183:5385-5394.
4. Donlan R. M., Costerton J. W. 2002 – Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms; Clinical Microbiology Reviews; 15(2):167-193.
5. Douglas L. J. 2003 – Candida biofilms and their role in infection; Trends in Microbiology; 11(1):30-37.
6. Kojic E. M., Darouiche R. O. 2004 – Candida infections of medical devices; Clinical Microbiology Reviews; 17(2):2558-267.
7. Li F., Palecek S. P. 2003 - EAP1, A Candida albicans gene involved in binding human epithelial cells. Eukaryotic Cell; 2:1266-1273.
8. Li X., Yan Z., Xu J. 2003 - Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of Candida albicans; Microbiology; 149:353- 362.
9. O'Toole G. A., Kaplasn H. B., Kolter R. 2002 – Biofilm formation as microbial development; Annual Reviews of Microbiology; 54: 69- 79.
10. Ramage G, Saville S. P., Thomas D. P. 2005 – Candida biofilms: an update – minireview; Eukariotyc Cell; 4(4):633-638.
11. Shin J. H., Kee S. Y., Shin M. G. 2002 – Biofilm production by isolates of Candida species recovered from nonneutropenic patiens: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources; Journal of Clinical Microbiology; 40:1244-1248.

STUDY CONCERNING THE MONITORING OF ENVIRONMENTAL FACTORS' RADIOACTIVITY IN ARGES COUNTY

MITRANESCU ELENA[1], TUDOR L. [1], FURNARIS F. C. [1], TERBEA MARIANA[2], ROTARU ELENA[1], MITRANESCU D. F. [3], SIMION VIOLETA[4]

[1]U.S.A.M.V. Bucharest, Faculty of Veterinary Medicine, mitranescuelena@fmvb.ro

[2]Sanitary Veterinary and Food Safety National Authority

[3]Justice Ministry: Penitentiary General Department

[4]Spiru Haret University, Faculty of Veterinary Medicine

In Romania, environment radioactivity survey started in 1962 when National Network for Environment Radioactivity Monitoring was established. In Arges County in 2008, there was screened the natural radioactivity of air, water in Arges and Doamnei Rivers, vegetation and soil.

The radioactivity was assessed by using gamma-ray spectrometry, having as principle comparing the counting time for the sample impulses generated inside the detector with the counting time for the radioactive standard – strontium 90 – impulses.

The obtained values were compared with the admitted limits provided by both Order 184/2006 (for air, soil and vegetation) and Order 1146/2002 (for water).

The above researches led to the following conclusions:

- *atmospheric radon average values were 86-216 times over the admitted limits;*
- *soil natural radioactivity average values were closed to the admitted limit;*
- *water alpha global activity in Arges and Doamnei Rivers exceeded the admitted limits by 2.2 -10.2 times;*
- *in Doamnei River the radioactive contamination is higher due to its role of collecting sewage and industrial waters from the I.C.N. Colibasi platform;*
- *environment factors' radioactivity in Arges County framed within the variation limits of natural background.*

Key words: environment radioactivity, air, water, soil, vegetation

In Romania, environment radioactivity monitoring started in 1962 when National Network for Environment Radioactivity Monitoring was established.

During the last years a major concern is the natural radioactivity, which could by modified by mankind through excessive using of phosphatic and potassium fertilizers, burning coal in the old technology power stations and so on.

The radiations issue is not just a consequence of the present technological and scientific progress. Some scientists argue that cosmic radiations had also a major importance in the evolution of life on Earth.

The radiations generated by artificial sources are used in different economical branches; in controlling some industrial processes and products' quality; in both human and veterinary medical diagnosis and treatment; in biological, medical and agricultural research; in some pharmaceutical products sterilizing and in some food products preserving.

One of the known areas with both natural and artificial radioactivity is Pitesti area, where the Nuclear Fuel Plant and the Nuclear Research Branch are working.

MATERIALS AND METHODS

In Arges County there was monitored the natural radioactivity of air, surface waters (Arges and Doamnei Rivers), soil and vegetation during 2008.

Natural radioactivity in Pitesti area was monthly assessed on air, soil, plants and water samples by using gamma-ray spectrometry.

The calculation of samples' radioactivity is made by comparing the counting time for the sample impulses generated inside the detector with the counting time of the impulses generated inside the detector by a known radioactive standard source.

In order to calibrate the detector there are used standard surface sources of strontium 90, assembled in a geometry similar to the one for environment samples' assessment. The activity of standard source is periodically reassessed by I.C.I.M. Bucharest using a standard source with a well-known value.

The fixed systems for the measurement of the gamma ray dose rates absorbed are placed at 1 m above the land.

Atmospheric aerosols samples' harvesting was performed by using the PVP 4 pump on filters disc with efficiency of 0.95. For each suction air volumes were measured by using Gallus 2000 gas meter.

The measurement and harvesting of water from Arges and Doamnei Rivers were performed daily at 1 km upstream from the rivers junction.

The assessed values were compared for the air, soil and vegetation with the regulations provided by Order 184/2006, and the ones for water with the limits provided by Order 1146/2002.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Radioactivity monitoring in Pitesti area has as purpose both the detection of any radiological increase of the environment radioactivity level, and the control of the radioactivity sources with consequences on people's health.

Air natural radioactivity has been established in four points.

Radon and thoron average values from air samples in Pitesti area are shown in table 1.

Table 1
Air natural radioactivity in Pitesti area

Sampling points	Assessed radioactive elements – average values (Bq/m3)	
	Radon	Thoron
Sampling point I	64.86	0.1786
Sampling point II	39.09	0.0879
Sampling point III	41.56	0.0748
Sampling point IV	25.99	0.1633
Admitted limits provided by 184/2006 Order	0.3 Bq/m3	

Regarding the average values measured in the four points, it can be observed that radon admitted limits provided by Order 184/2006 were exceeded in all points by 86 to 216 times, and for the thoron all values are below the admitted limit.

In table 2 there are presented the monthly average values regarding soil natural radioactivity in Pitesti area.

Table 2
Soil natural radioactivity in Pitesti area

Sampling points	Average monthly values (Bq/g)											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Center of Pitesti city	0.38	0.44	0.45	0.41	0.41	0.42	0.47	0.50	0.30	0.30	0.53	0.50
Admitted limits provided by 184/2006 Order	0.32 Bq/g											

Analyzing the data in the table it can be noticed an exceeding of the admitted limit by 0.32 Bq/g soil according Order 184/2006 for most of the soil samples.

During September and October the average values were beneath the admitted limit.

For the other samples the exceeding recorded was by 1.18 times in January, 1.28 times in April and May, and by 1.3 - 1.65 times in the other months.

Natural radioactivity level is variable everywhere in the world, with significant variation even within a restricted area, as for example our country.

As it can be noticed, the obtained results are varying according the season, place of harvesting, existing weather conditions, natural background level and the day period when the assessment is made.

α global radioactivity of surface waters (Arges and Doamnei Rivers) in Arges County are shown in table no. 3.

Table 3

Natural radioactivity of surface waters in Pitesti area

Sampling points	Average monthly values (Bq/l)											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Arges River	0.22	0.15	0.35	0.17	0.18	0.18	0.22	0.17	0.15	0.14	0.16	0.15
Doamnei River	0.18	0.37	1.02	0.27	0.39	0.38	0.18	0.27	0.18	0.18	0.30	0.17
Admitted limits provided by 1146/2002 Order	0.1 Bq/l											

The values established based on the samples collected in every month of 2008 were compared with the limits provided by Order 1146/2002 regarding surface waters quality.

Analyzing the average values of natural radioactivity for waters from Arges and Doamnei Rivers, assessed during the 12 months of year 2008, there can be observed that the admitted limits were exceeded by 1.4 to 10.2 times.

For the samples collected from Arges River there were recorded higher overvalues in March - by 3.5 times - and in January and July - by 2.2 times. For the samples collected from Doamnei River the highest overvalues were in March (by 10.2 times), followed by the ones in February, May, June and November (by 3 - 3.9 times). A comparative analysis between the two rivers shows that the samples collected from Doamnei River recorded more and higher exceeding.

The difference between the numbers of significant values from Arges River comparing to Doamnei River is due to the difference of their hydrological regime, but also to the fact that Doamnei River is a collector of all rain waters, alluvial suspensions, house waters and technological waters from ICN Colibasi Platform. Vegetation natural radioactivity during year 2008 in Pitesti area is presented in table no. 4.

Comparing the average values from the table with the limits provided by Order 184/2006 concerning vegetation radioactivity it can be noticed that the established values did not exceed the admitted limits in none of the months.

Environment factors radioactivity in Arges County area ranged within the variation limits of natural background.

Table 4

Vegetation natural radioactivity in Pitesti area

Sampling points	Average monthly values (Bq/g)											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Center of Pitesti city	0.18	0.23	0.19	0.18	0.22	0.23	0.23	0.29	0.26	0.24	0.25	0.23
Admitted limits provided by 184/2006 Order	0.3 Bq/g											

CONCLUSIONS

1. Atmospheric radon average values were 86-216 times over the admitted limits;

2. Soil natural radioactivity average values were closed to the admitted limit;

3. Water alpha global activity in Arges and Doamnei Rivers exceeded the admitted limits by 2.2 -10.2 times;

4. In Doamnei River the radioactive contamination is higher due to its role of collecting sewage and industrial waters from the I.C.N. Colibasi platform;

5. Environment factors' radioactivity in Arges County framed within the variation limits of natural background.

REFERENCES

1. Mitranescu E. et. al. – Din riscurile poluarii mediului si alimentelor, Ed. M.A.S.T., Bucuresti, 1998
2. Sindilaru D. – Dozimeteria si protectia contra radiatiilor, Editura Bren, Bucuresti, 2002
3. Terry A.J., Mc. Coll N.P. – Radiological consequences of food irradiation Londres, National Radiological Protection Board, 1992
4. Teusdea V., Mitranescu E. – Protectia mediului editia a IV-a, Ed. Omega Print, Bucuresti, 2007
5. *** - Sinteza anuala "Evaluarea continutului radioactiv al alimentelor si apei potabile 2003"
6. *** - Ordinul 1146/2002 – Clasificarea calitatii apelor de suprafata
7. *** - Ordinul 184/2006 privind parametrii recomandati pentru estimarea dozelor radioactive

OBSERVATII PRIVIND PREZENTA OMG IN PROBELE DE SOIA. CONSIDERATII ETICE, RELIGIOASE SI JURIDICE IN BIOTEHNOLOGIE

OBSERVATIONS CONCERNING GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN SOJA: ETHICAL, RELIGIOUS AND LEGAL ASPECTS

MOCUTA N., CHINDRIS V.,
DIRECTIA SANITAR VETERINARA SALAJ,
mocutanicolae@yahoo.com
chindris-salaj@ansv.ro

Development, marketing and cultivation of genetically modified organisms (GMOs) are the chapters related to biotechnology, and very controversial implications in many areas.

GMO detection is a necessity due to legislative requirements particularly severe on the marketing of these produse.In this context, it should be tackling methodologies laboratory diagnosis very efficient, accurate and fast. Biotechnology achievements are extremely important and comprise an area of great concern, besides the purely technical and GMO detection, we found that the work presented and to refer to some moral considerations, religious and legal on some biotehnologie.Due to effects of extremely useful achievements of biotechnology but also fears and concerns and objections by the population and by some researchers one would naturally ask him or herself wether it is moral to use these extraordinary achievements, or to ban them, with all their welcome even rescue effects, due to fears and concerns, more or less justified, and of moral and religious beliefs

Key words: genetically modified organisms (GMOs) detection, PCR, moral considerations.

Realizarea,comercializarea si cultivarea Organismelor Modificate Genetic (OMG) au generat opinii si discutii foarte controversate si cu implicatii in multe domenii.

Ingineria genetică cuprinde tehnicile si procedurile care modifică biologia moleculară şi celulară a organismelor prin mijloace care nu sunt posibile în condiţii naturale sau prin procese naturale iar cercetatorii considera ca biotehnologia reprezintă tehnologia-cheie a secolului 21.

Scopul realizarii OMG consta in schimbarea unor insusiri cu altele mai avantajoase cum ar fi rezistenta la erbicide,cresterea capacitatii productive, imbunatatirea continutului nutritiv,rezistenta la strivire si la factorii de mediu nefavorabili,precum si imbunatatirea calitatii unor alimente.

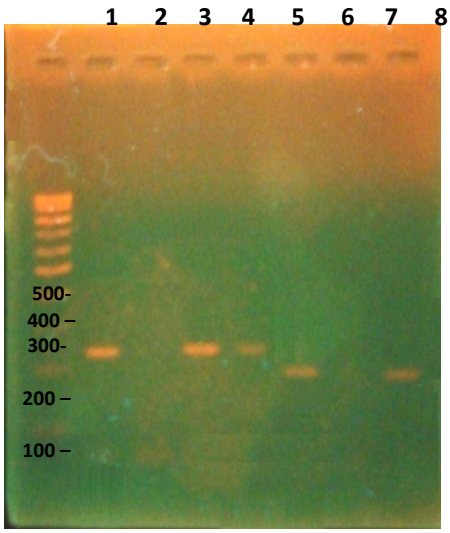
Inca de la fundamentarea agrobiotehnologiei moderne,au aparut primele temeri si ingrijorari legate de evolutia si efectele acestor realizari (impactul asupra sanatatii umane si a mediului, raspandirea genelor modificate in mediu, distrugerea sau reducerea biodiversitatii, considerente de ordin etic,moral,religios) incat s-a impus elaborarea unor norme legislative si efectuarea de studii cu caracter holistic pentru informarea populatiei si au impus etichetarea alimentelor si a produselor comercializate ce contin OMG

Cea mai frecvent folosita metoda pentru detectia OMG este tehnica PCR.

MATERIAL SI METODA.

In cadrul Laboratorului DSVSA Salaj,a fost initiata activitatea de detectie a OMG,prin tehnica PCR-metoda calitativa.In cursul anului 2008 au fost examinate un numar de 149 probe de soia si derivate din soia,porumb si derivate din porumb din care 134 probe alimente,4 probe furaje si 11 probe soia boabe (5 probe teste interlaboratoare) cu rezultat pozitiv pentru 4 probe (1 proba furaj si 3 probe teste de control)

- Aparatura, echipamente,consumabile, necesare efectuarii tehnicii PCR:termalcycler, transilluminator,aparat pentru electroforeza,aparat foto digital, pipete automate,consumabile(tampoane pentru migrare,pentru incarcare,markeri de greutate moleculara, dezinfectante,varfuri pentru pipete etc)
- Kit pentru extractia ADN din alimente si furaje.
- Kit pentru detectia OMG in alimente si furaje.



GEL II – P-35S, NOS
1. Marker de greutate moleculară 100 bp
2. P-35S Amplification Control
3. Blank
4. Proba nr. 25
5. Proba nr. 30
6. NOS Amplification Control
7. NOS Blank
8. NOS proba nr. 25

Plant Master Mix – 190 bp
35S Master Mix – 226 bp
NOS Master Mix – 180 bp
Maize Master Mix – 225 bp
Soya Master Mix – 118 bp

Fig. 1 Imagine electroforeza

Intrucat realizarile biotehnologiilor sunt extrem de importante si cu implicatii intr-o arie larga de preocupari,am considerat ca in cadrul lucrarii sa facem referire si la cateva consideratii morale,religioase si juridice cu privire la biotehnologie.

CONSIDERENTE ETICE SI MORALE

Capitolul privind implicatiile etice si morale ale biotehnologiilor este poate cel mai dezbatut si controversat capitol dintre toate aspectele privind biotehnologiile. Cateva dintre acestea se regasesc formulate in Declaratia Universala a Drepturilor omului, cum sunt:**-dreptul la alimente sigure pentru toti oamenii.** "Foamea constituie o faradelege si o violare a demnitatii umane".

- dreptul la informare si la optiune.Toti consumatorii trebuie sa fie corect si in timp util informati pentru ca optiunea lor sa fie in deplina cunostinta de cauza.

-dreptul la beneficiile derivate din aplicarea biotehnologiei trebuie pe deplin asigurat pentru toata populatia.

-utilizarea noilor biotehnologii trebuie sa contribuie in primul rand la reducerea foametei , saraciei si malnutritiei.

CONSIDERENTE RELIGIOASE SI MORALE

Rolul religiei si eticii cu privire la OMG si biotehnologie si a evolutiei cercetarilor in acest camp de activitate este incontestabil si cu influente uneori decisive in evolutia cercetarilor biotehnologice.

Exista exprimata o parere ca realizarile biotehnologiei se amesteca in "Planul lui Dumnezeu",prin profunzimea efectelor generate de modificarile ADN-ului, desi chiar in cadrul unor pozitii majoritar adoptate exista inca puncte de vedere diferite. Un aspect extrem de disputat,poate cel mai fascinant,se refera la etica xenotransplantului (transplantul de organe de la animale la om) si in mod special la transplantul inimii de porc la om si modificarea genetica a porcului prin inserarea de gene umane in vederea realizarii histocompatibilitatii genetice.

Una din regulile stabilite ar fi aceea ca xenotransplantul poate fi acceptat numai in cazul in care interventia si eficacitatea sa in calitatea si in prelungirea vietii este atat de mare incat alta interventie este inacceptabila.

Pe de alta parte modificarea genetica a porcului si a altor animale in vederea transplantului de inima la om ridica o serie de intrebari pentru care raspunsul este dificil de dat iar urmarile generate si mai dificil de anticipat. In multe culturi cuvantul „inima" are o rezonanta speciala. Ea este locul emotiilor (mai ales a

dragostei) a curajului ,entuziasmului si gandurilor celor mai ascunse si de aceea este considerata ca ceva prea vital pentru ceea ce este uman,incat sa poata fi schimbata cu o inima de animal.

Sub raport fundamental teologic amestecarea soiurilor distincte de plante sau de animale prin incrucisare este interzisa in mod explicit in Vechiul Testament:

„Sa respectati legile Mele.Sa nu impreuni vite de doua specii deosebite;sa nu semeni in ogorul tau doua feluri de seminte",Leviticul 19:19. (BIBLIA SAU SFANTA SCRIPTURA)

Ca urmare unii crestini si unii membri ai credintei evreiesti sau islamice argumenteaza ca amestecarea biologica a omului cu animalele este strict de condamnat. Altii argumenteaza insa ca xenografa nu este o incrucisare intre om si animal,si ca interdictia divina nu poate fi impotriva schimbarii materialului genetic daca ,cel putin la nivelul microorganismelor, asemenea schimb apare in mod obisnuit in natura.

Se pune insa o intrebare tulburatoare:un porc cu gene umane este inca porc sau este om si in ce masura este om si in ce masura este animal (porc)? Pe de alta parte trebuie sa ne intrebam:daca Dumnezeu i-a dat porcului o inima pentru a trai cu ea,cu ce drept omul ii poate lua aceasta inima pentru ca el sa traiasca cu inima primita de porc de la Dumnezeu?O alta intrebare este aceea daca este etic si moral ca noi sa modificam,cu scop experimental, genomul dat de Dumnezeu animalelor, incat acestea sa devina vulnerabile la anumite boli,la care in mod natural sunt rezistente.(De exemplu,soarecele care in mod natural nu face cancer ,poate fi modificat genetic sa dezvolte boala canceroasa)

In aceeasi categorie de preocupari se inscriu cercetarile realizate pe embrioni hibrizi om-animale.Astfel Autoritatea pentru Embriologie si Fertilizare Umana (HFEA), din Marea Britanie a aprobat cercetarile genetice pe embrioni hibrizi, creati din ovocite de animale al caror nucleu a fost inlocuit cu material genetic uman,pentru studierea si eventual tratarea unor boli ca Alzheimer, Parkinson, sau deficientele neuromotorii,iar mai recent s-au realizat embrioni umani pornind de la celule epiteliale adulte, in speranta ca, prin aceasta tehnica, se vor obtine celule nediferentiate,capabile sa trateze maladii incurabile. In fapt ce fel de fiinte sunt acesti embrioni hibrizi om-animal.Mai este fiinta umana animata de spiritual sacru cu care a inzestrat-o Creatorul?

De asemenea clonarea deliberata a animalelor, avand ca scop replicarea contrasteaza cu porunca data de Dumnezeu pentru animale si oameni „sa fiti folositoare si sa va inmultiti"In limitele acestui argument inseamna ca clonarea este absolut ceva rau. Biblia, scrie ca folosirea animalului in modul cel mai potrivit de catre om este o parte a poruncilor lui Dumnezeu dar aceasta nu ne da dreptul la orice fel de folosire a animalelor si in orice scop. Suntem datori ca intotdeauna sa ne intrebam daca este cu adevarat absolut necesar sa folosim animalul in situatia data.

CONSIDERENTE JURIDICE SI MORALE IN BIOTEHNOLOGIE

Cu toate temerile si consideratiile aratate,chiar cu frica unei apocalipse biotehnologice, impactul biotehnologiei asupra naturii umane a fost putin cercetat. Intrucat rezultatul potential al cercetarilor biothenologice poate genera modificarea naturii umane aceasta modificare constituie,in fapt,cea mai semnificativă ameninţare pe care o reprezintă biotehnologia contemporană.De aceea este necesar ca experimentelor efectuate pe fiinta umana sa li se acorde o atentie speciala iar legislatia trebuie sa decida intre o permisivitate acceptabila si intre o limitare riguroasa a cercetării ştiinţifice şi a aplicaţiilor biotehnologiei referitor la fiinta umana. Punctele de vedere ale celor interesati in cercetarile genetice nu coincid: oamenii de ştiinţă doresc să dezvolte cercetarea acestui domeniu,producatorii doresc să plaseze pe piaţă produsele cercetării ştiinţifice, crima organizată încearcă să penetreze zona de maximă rentabilitate, religia apără demnitatea umana si credintele si convingerile religioase. Sub raport juridic documentul fundamental care se refera la acest domeniu îl reprezintă Convenţia Europeană pentru protecţia drepturilor omului şi a demnităţii fiinţei umane faţă de aplicaţiile biotehnologiei şi medicinei, transpusa in legislatia României prin Legea nr. 7 din 22.02.2001 avand ca un principiu fundamental al cercetarilor biotehnologice acela ca „interesul şi binele fiinţei umane trebuie să primeze asupra interesului unic al societăţii sau al ştiinţei".Statutul juridic al embrionului uman a provocat dispute aprinse sub raport filozofic, religios, ştiinţific,juridic. Sub raport juridic si etic embrionul uman este definit ca „un organism în curs de dezvoltare de la oul fecundat până la realizarea unei forme capabile de o viaţă autonomă şi activă",in timp ce unele

religii,ca islamul admit ca cercetările asupra embrionului uman pot fi acceptate daca ele preced momentul în care embrionul capătă un suflet, respectiv a 40-a zi de la fecundaţie,in timp ce religia evreiasca admite ca statutul intreg al fiintei umane este dobandit numai dupa dezvoltarea ce urmeaza fecundarii,incat in afara uterului embrionul nu are statut juridic.

Biserica Catolică consideră că fiinţa umană există din momentul fecundării, iar embrionul este considerat o fiinţă umană care are dreptul la viata nefiind acceptata nici o distincţie între embrionii in vivo şi in vitro iar cercetările asupra embrionului uman trebuie să fie condamnate. In contrast oamenii de ştiinţă consideră că este imposibil să se interzică cercetările asupra embrionului,in primul rand pentru ca prin cercetarea ştiinţifică a acestuia se pot identifica cai pentru tratarea bolilor sistemului nervos (boala Alzheimer, scleroza in plăci), bolilor imunodeficitare, diabetului, infarctelor miocardice etc.

Lipsa de protecţie juridică a embrionului se regăseşte în dispoziţiile legale referitoare la întreruperea voluntară a sarcinii desi nici in acest sens nu există,o poziţie unitară in toate tarile,chiar europene. (prof.C.Voicu).

Este firesc sa ne intrebam daca este moral sa folosim,spre binele nostru, aceste realizari extraordinare sau sa le interzicem, datorita unor temeri si ingrijorari,mai mult sau mai putin justificate,si a unor convingeri morale si religioase, cu toate efectele lor binevenite chiar salvatoare. Situatia este oarecum similara cu folosirea energiei nucleare cu efecte benefice sau devastatoare,in functie de cine si cum o foloseste. „Ca oameni de stiinta,trebuie sa avem intotdeauna in minte avertismentul lui Einstein:progresul tehnologic este ca un topor in mainile unui criminal patologic”

Ca incheiere doua intrebari:oare nu toate aceste plasmuiri s-au savarsit prin voia lui Dumnezeu

“Caci toata darea cea buna si tot darul desavarsit de sus este pogorat de la tine Parintele Luminilor (Iacob 1, 17).

Iar marele poet ne intreaba:

Ah! atuncea ti se pare
Ca pe cap îti cade cerul:
Unde vei gasi cuvântul
Ce exprima adevarul?

CONCLUZII

- S-au examinat un numar de 54 probe de soia si produse din soia pentru detectia prezentei OMG.
- Din totalul de 54 probe examinate un numar de 11 probe s-au dovedit a fi pozitive respectiv 21.3%.
- Limita minima pentru detectie a kitului folosit este 0,1% (comparativ cu limita de 0,9% ce impune etichetarea).
- Cu privire la aspectele morale si etice privind biotehnologia trebuie avut in vedere ca: -este utopic sa credem ca hrana necesara unei populatii de 6 miliarde de oameni (sau 8 miliarde previzibil la nivelul anului 2025) poate fi asigurata practicand doar o agricultura organica,nechimizata,cu o productivitate redusa,renuntand la realizarile agrobiotehnologiilor.
- milioane de oameni se confrunta cu saracia,foametea si malnutritia desi au fost realizate culturi modificate genetic rezistente la seceta ,la insecte,la erbicide,bogate in nutrienti,care ar putea contribui in mod hotarator,la iesirea din aceasta stare.
- multi oameni sufera de boli incurabile ca Sida,Boala Alzheimer,Boala Parkinson,cancer etc. in timp ce avem animale modificate genetic pentru transplantul de organe la om si embrioni hibrizi, pentru studiul stiintific al bolilor respective si posibila lor prevenire si vindecare.
- combustibilii fosili sunt tot mai scumpi si tot mai putini dar deja se cultiva plante modificate genetic care asigura obtinerea de biocombustibili cu randament sporit si la un pret acceptabil.

SUSCEPTIBILITY PROFILE ASSESSMENT OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM THE DIGESTIVE TRACT OF PIGS FROM INDUSTRIAL FARM

Ramona Moraru, Mariana Grecu , Luminita Malic, A. Ignat, Maria Bobutac, V. Năstasă, M. Mareş
UŞAMV *Ion Ionescu de la Brad,* FMV Iaşi
rmoraru82@gmail.com

Intensive farming systems led to a significant increase for the administration of antimicrobial agents to livestock, both for therapeutical and prophylactic purposes and as weight promoters.

The aim of this study is to detect the prevalence of Enterococcus faecium and E. faecalis, Escherichia coli and Staphylococcus aureus strains resistant to usual antibiotics and risk assessment for its transfer on animal – aliment – human chain.

There were collected faeces samples with rectal sterile swabs from 40 pigs from a farm in Neamț county. Samples were cultivated on enrichment broth and then on selective agar, specific to each microorganism. After obtaining the pure strains, these were identified to species level by using conventional methods. Thus there were identified 23 strains of E. coli, 10 strains of S. aureus, 6 strains of E. faecalis and 19 of E. faecium. Antimicrobial susceptibility degree was assessed for the isolated strains as recommended by CLSI standard M2 – A9 and M7 – A7 2006. For the E. coli isolated strains, antimicrobial resistance was between 21.73% for Trimethoprim – Sulfamethoxazole and 47.8% to Ampicillin and 100% susceptible for the rest of tested antibiotics. The antimicrobial resistance for S. aureus ranged from 1% for Ciprofloxacin and 100% for Clindamycin and susceptibility was 100% only for Gentamicin, Cefoxitin (susceptible for Oxacillin) and Vancomycin. E. faecium was resistant 10.52% for Linezolid and Vancomycin, up to 94.73 % for Gentamicin. E. faecalis presented values of resistance ranging between 33.33% for Enrofloxacin and 100% for Erythromycin and 50% resistance to Vancomycin.

Key words: antimicrobial resistance, E. faecalis, Vancomycin, pigs

Intensive farming systems led to a significant increase for the administration of antimicrobial agents to livestock, both for therapeutical and prophylactic purposes and as weight promoters. Any use of these antimicrobial agents represents a public health problem, due to development, selection and increasing incidence of resistance and to the persistence of antimicrobian feed additives residues in food products of animal origin (Anadon and Martinez – Larranaga, 1999). Antimicrobial resistance may become a major problem in veterinary medicine as a consequence of the intensive use and misuse of antimicrobial drugs (Catry B. et al., 2003). The repercussions in human medicine are represented by the appearance of multi-resistant food born pathogens and resistant microorganisms that infect animals and that produce illness to humans. There are studies that underline the fact that there are high rates of ciprofloxacin resistance in *E. coli* which can be associated with the use of fluoroquinolones in poultry. Latest researches in Europe brought out vancomycin-resistant enterococci with the vanA determinant, being believed to be due to the use of avoparcin (a glycopeptide antibiotic) used as growth promoter in food animals (Patrick R. Murray et al,2003).

The main objectives of the research are to identify the bacterial strains isolated from pigs using conventional testing kits and determining the susceptibility profile in conformity with CLSI standards.

MATERIAL AND METHOD

Material

The studied samples were collected from 40 clinical healthy pigs, Hypor triliniar hybrids, aged between 6 and 8 months, belonging to homogenous groups from a farm in Neamț county. The pigs were receiving feed containing nutritive substances and antibiotics in order to stimulate weight gain as they were breeded for meat production.

For the laboratory techniques were used special media, broth and agar, sterile swabs, thermostat, rapid ID 32 STREP (bioMerieux, France) identification kit, human plasma, different antibiotics and disk dispenser for the antibiogram.

Method

There were collected faeces samples with rectal sterile swabs from 40 clinical healthy pigs and the samples were cultivated on enrichment broth at 36±2°C 24h for *Staphylococcus spp*. and *Enterococcus spp.,* and on Lauryl sulphate broth at 44,5°C for *E.coli*. After 24 hours of incubation the samples were passed on selective agar, specific to each microorganism (Levine for *E. coli*, Chapman for *Staphylococcus spp.* and Bile Esculin Azide for *Enterococcus spp*.) also incubated at 36±2°C for 24h.

After obtaining the pure strains, these were identified to species level by using conventional methods. For *Enterococcus spp.* strains are used rapid ID 32 STREP (bioMerieux, France), which is a standardized system for the identification of streptococci and enterococci, and those most related organisms, in 4 hours, which uses 32 miniaturized enzymatic tests, as well as a specific database. Reading and interpretation are carried out automatically or manually. The principle of the methods is that the rapid ID 32 STREP strips consist of 32 test cupules which contain dehydrated test substances. After 4 hours of incubation at 36±2°C, the reactions are read using mini API instruments or visually and the identification is obtained using the identification software. For *Staphylococcus spp.* was performed the citratate plasma coagulation test with human plasma, the results being noted after 4 hours of incubation at 37°C. Were selected only the strains that was coagulaso positive, the *Staphylococcus aureus* strains. The *E.coli* can be distinguished from other coliforms by its growth and color reaction on certain types of culture media. When cultured on an EMB (Eosin Methylene Blue Agar - Levine's Formulation) plate, a positive result for *E.coli* is metallic green colonies on a dark purple media.

After isolating the strains important for the study, the antimicrobial susceptibility degree was assessed for the isolated strains as recommended by CLSI standard M2 – A9 and M7 – A7 2006.

RESULTS AND DISCUSSIONS

After obtaining the pure strains they were identified to species level by using conventional methods. Thus there were identified 23 strains of *E. coli*, 10 strains of *S. aureus*, 6 strains of *E. faecalis* and 19 of *E. faecium*.

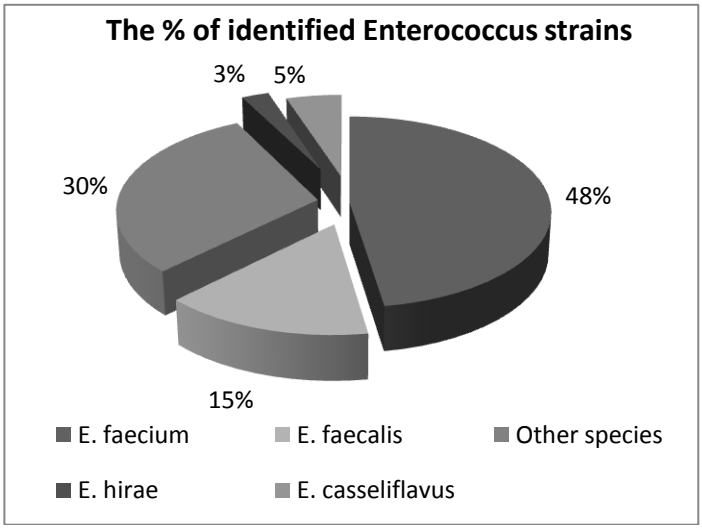
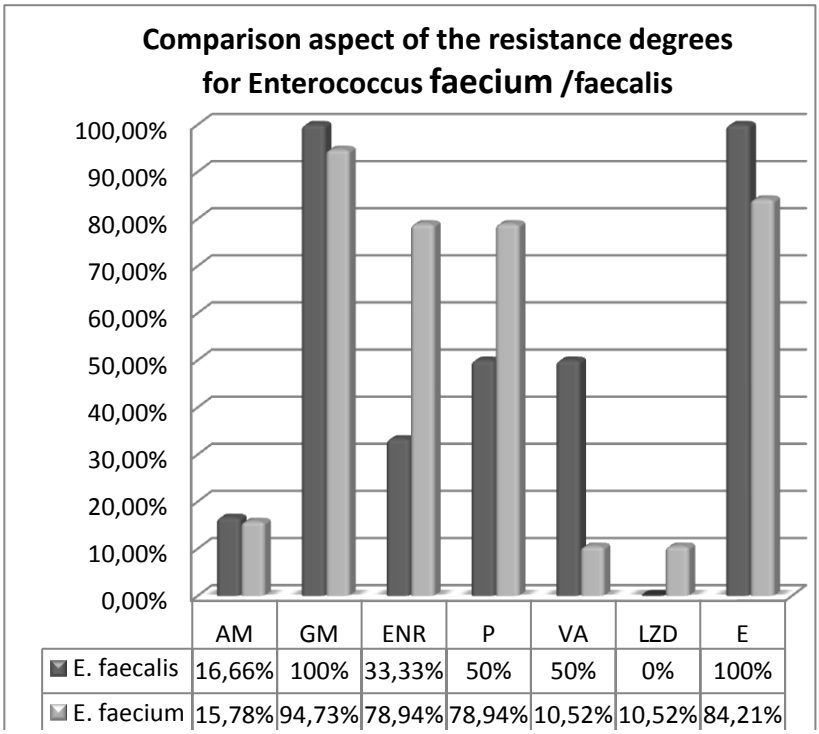


Fig.1. The percentage of identified Enterococcus strains.

Antimicrobial susceptibility degree was assessed for the isolated strains as recommended by CLSI standard M2 – A9 and M7 – A7 2006 . The resistance to antibiotics is tested for the ones that are commonly used for treatment.



	AM	GM	ENR	P	VA	LZD	E
E. faecalis	16,66%	100%	33,33%	50%	50%	0%	100%
E. faecium	15,78%	94,73%	78,94%	78,94%	10,52%	10,52%	84,21%

Fig.2. Comparison aspect of the resistance degree for Enterococcus faecalis/faecium

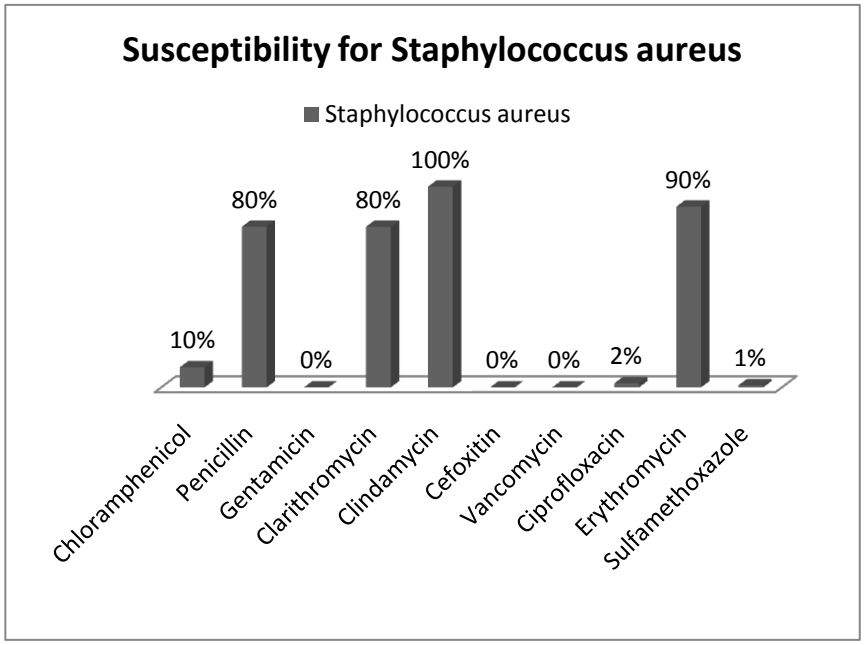


Fig.3. Susceptibility for Staphylococcus aureus

For the E. coli isolated strains, antimicrobial resistance was between 21.73% for Trimethoprim – Sulfamethoxazole and 47.8% to Ampicillin and 100% susceptible for the rest of tested antibiotics. The antimicrobial resistance for S. aureus ranged from 1% for Ciprofloxacin and 100% for Clindamycin and

susceptibility was 100% only for Gentamicin, Cefoxitin (susceptible for Oxacillin) and Vancomycin. E. faecium was resistant 10.52% for Linezolid and Vancomycin, up to 94.73 % for Gentamicin. E. faecalis presented values of resistance ranging between 33.33% for Enrofloxacin and 100% for Erythromycin and 50% resistance to Vancomycin.

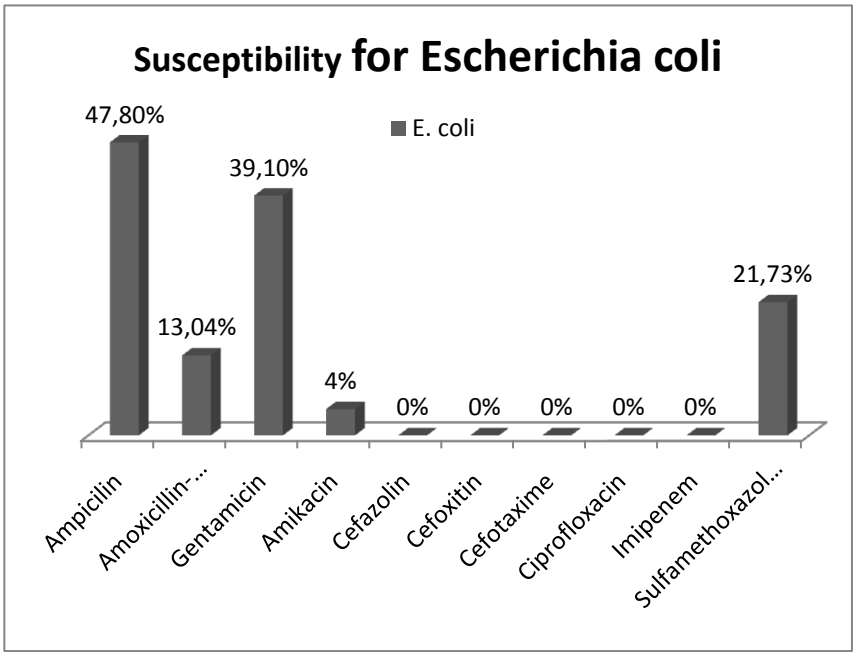


Fig.4. Susceptibility for Escherichia coli

The obtained resistance to the tested antibiotics is considered to be due to weight promoters used in animal feed, creating the possibility for the antimicrobial residues to enter the food and to be consumed by humans. Faye K., 2007 – in the paper Current possition in veterinary use of antibiotics: impact on antibiotic resistence of bacteria in animal and human health: - underlines that the transfer of resistant bacterial strains from the animals treated incorrectly with antibiotics to humans, is possible through the food chain.

CONCLUSIONS

1. The prevalence for Enterococcus faecium was higher than for Enterococcus faecalis,
2. The antimicrobial resistance represents an emergence linked to the clinical (or other) use of the antimicrobial agent against which resistance is directed.
3. The obtained results underline the potential of these bacteria to affect humans through food chain (by consuming products of animal origin).
4. Enterococcus faecalis presented 50% resistance to Vancomycin.
5. The resistance for Staphylococcus aureus and E. coli was mainly to the most common antibiotics used in therapy.

BIBLIOGRAPHY:

1. **Anadon, A., Martinez-Larranaga, M. R. (1999)** – Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects; Livestock Product science; 59:183-198.
2. **Catry B., Laevens H., Devriese L.A. et al, 2003** - Antimicrobial resistance in livestock, J. vet. Pharmacol. Therap. 26, 81-93, Belgium, Blackwell Publishing Ltd.
3. **Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen et al., 2003** - Manual of Clinical Microbiology 8th edition, chapter 68 Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents (Louis B. Rice et al.) USA, 1074-1080.
4. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth informational Supplement M2-A9 and M7-A7.**
5. **Faye K., 2007** – Current possition in veterinary use of antibiotics: impact on antibiotic resistence of bacteria in animal and human health. Antimicrobial resistance in livestock, J. vet. Pharmacol. Therap. 28, 85-88.

OBSERVAŢII PRIVIND PREZENŢA REZIDUURILOR DE PESTICIDE ORGANOCLORURATE ÎN LAPTE ÎN ZONA MOLDOVEI

OBSERVATIONS CONCERNING ORGANOCHLORINATED RESIDUES IN MILK, IN MOLDOVA REGION

Alina MUNTEANU, A. GRĂDINARU, GH. SOLCAN
FMV Iasi

From 131 samples of raw milk, in 38 samples organochlorinated residues were detectable, and from 26 samples of powder milk in 4 samples the residues were detectable. α-HCH, β-HCH, γ-HCH (µg/kg) and DDT were detected, the maximal concentration being of 0,94 µg/kg for β-HCH and 1,8 µg/kg for DDT.

Keywords: organochlorinated residues, milk, moldova

Pesticidele organoclorurate se acumulează şi formează adevărate depozite în ţesutul adipos, depozite care pot fi eliberate în condiţiile în care intervin factori ce duc la slăbirea organismului, astfel putând apărea intoxicaţia acută. Deşi utilizarea pesticidelor organoclorurate este interzisă, datorită remanenţei mari în mediu se mai pot găsi reyiduuri în produsele alimentare.

MATERIAL ŞI METODE

În perioada ianuarie 2007 - decembrie 2008, au fost analizate 184 probe lapte şi 26 probe lapte praf, provenite din judeţele Moldovei, prin **metoda gazcromatografică**.

La produsele lactate cu un conţinut de grăsime mai mic de 2 %, pesticidele organoclorurate şi PCB-urile s-au determinat la produsul ca atare deoarece prin extragerea grăsimii din produs s-ar fi obţinut o cantitate de grăsime mică, prezentând riscul de a nu avea un rezultat corect prin pierderile inevitabile din timpul procesului analitic.

La produsele lactate cu un conţinut de grăsime mai mare de 2 %, determinarea pesticidelor organoclorurate şi a PCB-urile a fost realizată la grăsime.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Limitele maxime admise pentru substanţele organoclorurate sunt stabilite de Ordinul Autorităţii Naţionale Sanitare Veterinare şi pentru Siguranţa Alimentelor nr. 147/2004, cu excepţia PCB-urilor, care nu sunt normate în legislaţia română în vigoare (Tabelul 1).

Tabelul 1

Limitele maxime admise pentru substanţe organoclorurate din lapte şi produse lactate (conform Ordinului ANSVSA nr. 147/2004)

Nr. crt.	Substanţa	Limitele maxime admise (mg/kg)
	Pesticide organoclorurate	
1.	Aldrin	**0,006**
2.	Clordan	**0,05**
3.	Dieldrin	**0,006**
4.	DDT (suma de izomeri DDT, DDE şi DDD exprimată în DDT)	**0,04**
5.	Endrin	**0,0008**
6.	Heptaclor (suma de heptaclor şi heptaclor-epoxid exprimată în heptaclor)	**0,004**
7.	Hexaclorbenzen (HCB)	**0,01**
8.	Hexaclorciclohexan (HCH) - izomer alfa - izomer beta - izomer gamma (Lindan)	 **0,004** **0,003** **0,008**

Valorile obţinute la analiza probelor de lapte pentru determinarea reziduurilor de pesticide organoclorurate sunt prezentate în tabelele 2 şi 3.

Tabelul 2

Concentraţia reziduurilor de pesticide organoclorurate din probe de lapte

Nr. Crt.	Denumire probă	Nr. Probe	α-HCH (µg/kg)		β-HCH (µg/kg)		γ-HCH (µg/kg)		DDT total (µg/kg)	
			Limite	Medie	Limite	Medie	Limite	Medie	Limite	Medie
1.	Lapte crud de vacă materie primă	93	< LOD	-	< LOD	-	< LOD	-	<LOD	-
		38	0, 05 – 0, 97	0, 5	0,67 – 1,01	0,83	0,21 – 1,3	0,98	0,28 – 1,8	0,89
2.	Lapte crud de oaie materie primă	19	< LOD	-	< LOD	-	< LOD	-	<LOD	-
		19	0,037 – 0,089	0,069	0,61 – 0,94	0,76	0,17 – 0,87	0,63	0,35 – 0,46	0,39
3.	Lapte pasteurizat	13	< LOD	-	< LOD	-	< LOD	-	<LOD	-
		2	0,035	0,035	< LOD	-	< LOD	-	0,34	0,34

Notă: LOD = Limit of Detection (Limita minimă de detecţie a metodei)

Din cele 131 de probe de lapte crud de vacă materie primă, la 93 de probe (reprezentând 70,99 % din totalul probelor analizate) nu s-au detectat valori mai mari decât limitele de detecţie ale metodei. Restul de 38 de probe au înregistrat valori mai mari decât limitele de detecţie ale metodei pentru 2 pesticide (17 probe) şi pentru un pesticid (21 probe).

Probele care au prezentat o singură valoare peste limita de detecţie au fost repartizate astfel: 7 probe pentru α-HCH, 5 probe pentru β-HCH, 7 pentru γ-HCH şi 2 probe pentru DDT total.

Parametrii probelor care au prezentat 2 valori mai mari ca limitele de detecţie ale metodei au fost:

- 7 probe pentru α-HCH şi β-HCH;
- 4 probe pentru α-HCH şi γ-HCH;
- 3 probe pentru β-HCH şi γ-HCH;
- 3 probe pentru β-HCH şi DDT total;

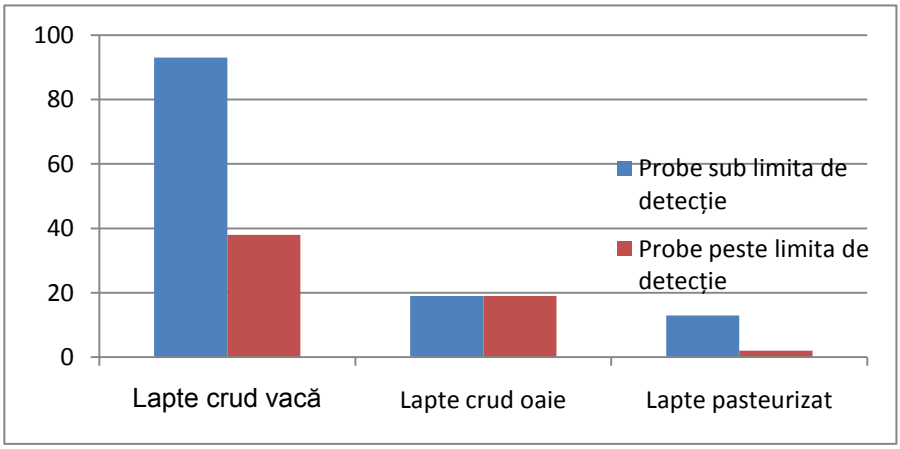


Figura 1

Repartiţia probelor de lapte sub/peste limita de detecţie pentru organoclorurate

Laptele crud de oaie a înregistat valori detectabile mai mari decât limitele de detecţie ale metodei la 19 probe (reprezentând jumătate din probele de lapte de oaie analizate), astfel:

- la 12 probe s-au detectat valori pentru un singur compus organoclorurat: 4 probe pentru α-HCH, 4 probe pentru β-HCH, 2 pentru γ-HCH şi 2 probe pentru DDT total;
- 7 probe au prezentat valori detectabile pentru 2 organoclorurate: 3 probe pentru α-HCH şi β-HCH; 2 probe pentru α-HCH şi γ-HCH; 2 probe pentru β-HCH şi γ-HCH.

Laptele pasteurizat a prezentat la 2 probe valori detectabile pentru un singur compus: o probă la α-HCH şi o probă la DDT total.

La probele de lapte praf s-au detectat 4 probe cu valori mai mari decât limitele de detecţie ale metodei, toate valorile obţinute fiind în cazul β-HCH.

Tabelul 3

Rezultatele determinării reziduurilor de pesticide organoclorurate din probe de lapte praf şi formule sugari

Nr. crt.	Denumire probă	Nr. probe	α-HCH (μg/kg)		β-HCH (μg/kg)		γ-HCH (μg/kg)		DDT total (μg/kg)	
			Limite	Medie	Limite	Medie	Limite	Medie	Limite	Medie
1.	Lapte praf	10	< LOD	-	< LOD	-	< LOD	-	<LOD	-
		4	< LOD	-	0,71 – 0, 73	0,69	< LOD		< LOD	-
2.	Formule pentru sugari	12	< LOD	-	< LOD	-	< LOD		<LOD	-

Notă: LOD = Limit of Detection (Limita minimă de detecţie a metodei)

CONCLUZII

1. Din cele 131 de probe de lapte crud de vacă materie primă, la 93 de probe (reprezentând 70,99 % din totalul probelor analizate) nu s-au detectat valori mai mari decât limitele de detecţie ale metodei. Restul de 38 de probe au înregistrat valori mai mari decât limitele de detecţie ale metodei pentru 2 pesticide (17 probe) şi pentru un pesticid (21 probe).
2. La probele de lapte praf s-au detectat 4 probe cu valori mai mari decât limitele de detecţie ale metodei, toate valorile obţinute fiind în cazul β-HCH.

BIBLIOGRAFIE

1. Crivineanu V., Râpeanu M., Crivineanu Maria - Toxicologie sanitară-veterinară. Editura Coral Sanivet, Bucuresti, 1996.
2. Georgescu Gh. si col - Laptele si produsele lactate. Ed. Ceres, Bucuresti, 2000.
3. Mitrănescu Elena, Savu C., Popârlan N., Lupescu C. - Din riscurile poluării mediului si alimentelor. Editura MAST, Bucuresti, 1998.
4. Oros N.A. - Diagnosticul de laborator in toxicologia veterinara. Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2005.
5. Popa G., Dumitrache S., Apostol C., Segal B., Segal Rodica, Teodoru V. - Toxicologia produselor alimentare. Editura Academiei, Bucuresti, 1986.
6. Solcan Gh., Beschea-Chiriac I.S. - Toxicologie veterinară. Manual practic. Ed. Tehnopress, Iasi, 2005.

RESEARCHES REGARDING THE GENETIC HISTORY OF A ROMANIAN SPOTTED COW POPULATION

NEAGU IULIANA, CULEA C., TAPALOAGA DANA, TAPALOAGA P. R., PAUNESCU ILEANA, MARMANDIU A.
USAMV Bucureşti

Researches upon origin and production of imported Austrian Spotted cow breed in Romania has as aim the assessment of the actual genotypic and phenotypic parameters of the Romanian Spotted livestock in a farm to elaborate a selection plan for this cattle population.

The assessment of the genotypic and phenotypic parameters in the studied population will allow the choosing of the dams and potential bull dams, and also the nominalization of the best bulls, imported or indigenous, which will assure the estimated genetic gain in the future generation.

Such a breeding programme has to be applied in a farm in the research network, which will allow the achieving of all the technical links of this breeding programme due to the actual productive potential but especially to the organizing and technological conditions asked by the specific activities.

The present researches proposes to analyze the breeding stage of the Romanian spotted cow livestock, being established, excepting the reproductive isolation, of some indicators which offer its genetic history: the relationship among the imported Austrian Spotted cows and some important ancestors, generation interval, the selection intensity.

Key wods: Romanian spotted cow, genetic history

MATERIAL AND METHODS

The analyzed farm was established in 1980 and it was populated with 137 heifers in Austrian Spotted Cows, this having a particular position in the breeding pyramid of the breed. It delivers young bulls to selection on descendants and has an important action of founding a line - Senator 36 bull line (by inbred mating of it).

By analyzing the refreshment flow of the reproduction generation and also parameters it results that upon the two analyzed years (2005-2006), the birth and surviving index were the same.

The reproductive isolation range [1, 2, 3, and 4] represents the main criterion to consider a livestock as population. It is estimated as a ratio between the indigenous reproductive animals and immigrants ones during five generations which permit the differentiation of the population:

$$I = \frac{A.A. - (A.I. + I.I.)}{A.A. + A.I. + I.I.}$$

Where:

A.A = number of individuals admitted in the reproductive livestock in the studied interval with both indigenous parents.

A.I. = number of individuals admitted in the reproductive livestock in the studied interval with one immigrant parent.

I.I = number of individuals admitted in the reproductive livestock in the studied interval with both immigrant parents.

Relation with important reproducers

In this paper, to emphasize the genetic relation of the studied livestock with some bulls, there was calculated the inbreeding coefficient of the actual genetic fund with the one of a such important reproducer

(r_{G-R}), making a ratio between the number of appearances achieved by that reproducer and the total number of possible appearances, so the number of pedigrees multiplied by two random lines.

$$r_{G-R} = \frac{numar\_aparitii\_realizate}{numar\_pedigree \times 2}$$

The generation interval

In the actual conception of breeders, the generation interval is defined as the average age of parents at the age of their descendants retained for reproduction birth [1, 2, 3, and 4]. Due to the fact that during the breeding process each generation, theoretically is better than the previous one (sons and daughters are better than parents, parents are better than grandparents), the rhythm of changing the generations is an important way of increasing the genetic gain. There is also the trend of its decreasing, with no changing upon the precision and intensity of the selection.

In this paper there was used information about changing 2005 generation with 2006 generation. To estimate the generation interval there must be known:

the age at first calving

calving succession

the average length of reproduction use

The calving of the descendants retains.

The generation interval per population was calculated as an average of the four variants: TT, TM, MT, and MM.

The selection intensity

The estimation of selection intensity [1, 2, 3, and 4] is made starting from the retained proportion, which could be made for both sexes before the selection and is used to estimate the selection response. The selection intensity depends not only by the proportion of the selected livestock but by the size of the candidates group. For a sufficient number it is waited the normal repartition, but the size of this value could be read from the table of standardized values of the selection differential. So, the measure unit of the selection intensity is the standard phenotypic deviation of the character (σ_F).

RESULTS AND DISCUSSIONS

The reproductive isolation, the reproductive range of a population represents an important factor in organic world evolution, but also in animal breeding. The role of reproductive isolation as an evolution factor was focused by population genetics development, the evolutionist theory and modern systematic. The reproductive isolation permits the genetic rebuilding of the population. The present research, analyzing the actual descendants obtained the following results:

- 21 of the actual cows have both indigenous parents
- 62 of the actual cows have one immigrant and one indigenous parent
- 37 cows have both immigrant parents.

Applying the coefficient of reproductive isolation formula it was notice that this livestock is not a population, but it is in the genetic irradiation area of a population (I = - 0.65).

$$I = \frac{21 - (62 + 37)}{21 + (62 + 37)}$$

Analyzing the results, the imported cows (1980) were inseminated by genetic material of two German Spotted bulls, two Swiss Spotted bulls and an indigenous bull (Senator 36), an indigenous one but of Austrian origin bull. The practiced mating system proved that the actual cows, daughters of the imported ones and the mentioned bulls could not be considered Austrian Spotted cows, but Romanian Spotted cows. Analyzing the pedigrees of the two random lines per two generation, it results that the actual genetic fund had a 1% higher genetic relation with six more important bulls. (Table 1).

Table 1

RELATION BETWEEN IMPORTED AUSTRIAN SPOTTED COWS AND IMPORTANT REPRODUCERS

Important reproducers	r_{G-R} (%)
FELIX	5,83
EDI	2,91
HERO	2,189
QUINN 526	2,189
AGENT 018	2,189
SOLOMON 544	1,82

In the studied livestock, the age at first calving was 29, 5 months, but the average length of reproductive period was estimated at 4, 65 years. The estimated generation interval for the last studied generation (2005-2006) was 4,2 years, being framed within the mentioned limits in the special literature. In Japanese Frisian, Abe and Jimbu, quoted by Draganescu (1979) found an average generation interval of 4, 11 years. After Horn, quoted by Neagu (2007), the generation interval in cattle varies within 4 and 6 years.

The estimation of selection intensity is made starting from the retained proportion, which could be known by both sexes before selection and helps to selection response estimation. The selection intensity depends not only by the proportion of the selected livestock, but by the size of the candidates group. The retained ratio per females selected upon milk yield was 0,1844. the selection intensity was read from the standardized values table.

$i_{♀} = 1,4458\ \sigma_F$

CONCLUSIONS

1. Those 137 imported Austrian Spotted cows were integrated in Romanian Spotted breed, being inseminated continuously with seminal material from German and Swiss spotted bulls.
2. The reproductive isolation coefficient (I) was – 0,65, that proves this livestock was not a population that moment, it was placed in the genetic irradiation area.
3. Analyzing the pedigrees of the last two generation resulted that the actual genetic fund had a 1% higher genetic relation with six important bulls.
4. The estimated generation interval was 4,2 years, it permitting the maximization of the genetic progress, being closed to the inferior level mentioned by the special literature.
5. The standardized selection intensity for female was 1,4458 σ_F, that placed it at a superior level beside the values mentioned by the cattle special literature.

REFERENCES

1. Lush, J.L.- The genetic bases of selection, University of California, Berkley 1965.
2. Draganescu, C. – Ameliorarea animalelor, Ceres Publishing House, Bucharest, 1979.
3. Grosu, H. – Programe de ameliorare, Agrotehnica Publishing House, Bucharest, 2003.
4. Neagu Iuliana, Culea, C. – Cresterea animalelor, Eurostampa, Timisoara, 2007.

CERCETĂRI PRIVIND PREVALENŢA *CAMPYLOBACTER SPP.* ÎN CARCASELE DE BROILERI

RESEARCHES REGARDING THE PREVALENCE OF *CAMPYLOBACTER SPP.* IN BROILER CARCASSES

NICORESCU ISABELA, CRIVINEANU MARIA
Faculty of Veterinary Medicine Bucharest, Bucharest, Romania, isabela_nicorescu@yahoo.com

The aim of this study was to determine the prevalence of Campylobacter spp. in chicken carcasses and to establish the involved Campylobacter species, whereas their impact on human health is different.

Campylobacter jejuni and C. coli are the main etiologic agents of human enteritis in Europe, United States and other industrialized countries. Broiler chickens are mainly contaminated with C. jejuni, less with C. coli and rarely with other species.

In order to detect the presence of Campylobacter spp., in the study there were used chicken carcasses sampled from supermarkets; their provenience was represented by 3 different slaughterhouses in Romania. Isolation, identification and confirmation of Campylobacter spp. was made in accordance with SR EN ISO 10272-1/2006.

The results of this study indicate a high contamination of chicken carcasses with Campylobacter spp.; this contamination could be prevented by a proper hygiene during carcasses processing, their contamination representing a possible risk for consumers.

Overall, the prevalence of Campylobacter spp. in broiler carcasses from the 3 slaughterhouses was 61.4%, value that, although it is at the upper limit, fits the reporting of European Food Safety Authority on the prevalence of Campylobacter spp. in chicken carcasses available for retail sale in the E.U. member states.

Key words: *Campylobacter spp*., prevalence, chicken broilers.

Campylobacter spp. reprezintă la ora actuală principalul agent zoonotic implicat în producerea gastroenteritelor la oameni. Cele mai multe cazuri au fost înregistrate în Marea Britanie şi Germania, iar agentul incriminat a fost *C. jejuni,* acesta fiind confirmat la mai mult de 46 % dintre persoanele bolnave. Conform datelor raportate de Agenţia Europeană pentru Siguranţa Alimentelor (EFSA), majoritatea statelor au înregistrat în ultimii ani niveluri crescute de contaminare cu *Campylobacter spp*. în carnea proaspătă de pui (11). Înlăturarea acestui microorganism din lanţul alimentar sau cel puţin reducerea frecvenţei lui reprezintă la ora actuală un obiectiv major.

Campylobacter spp. este larg răspândit în natură, principalul rezervor fiind tubul digestiv al animalelor domestice sau sălbatice; frecvent, broilerii prezintă infecţii cu *Campylobacter spp*., fără a manifesta semne clinice. În momentul abatorizării păsărilor infectate cu *Campylobacter spp.*, prin distrugerea integrităţii intestinului, acesta poate contamina suprafaţa carcasei (6, 10). De asemenea, contaminarea se poate produce şi direct, prin intermediul aerului, apei, echipamentelor sau de la pasăre la pasăre (3, 7, 8, 9). Practic, există 3 niveluri unde se poate interveni în scopul diminuării frecvenţei *Campylobacter spp.*: în ferma de păsări, pe durata procesării carcaselor şi pe durata manipulării şi pregătirii puilor în vederea consumului. Cu excepţia decontaminării produsului final, rezultatele cele mai bune se pot obţine prin intervenţia directă asupra puilor din fermă; totuşi acest obiectiv este destul de greu de atins, întrucât *Campylobacter jejuni* are condiţii optime de colonizare în intestinul păsărilor (8).

Broilerii sunt în principal contaminaţi cu *C. jejuni*, mai puţin cu *C. coli* şi rar cu alte specii (2, 10). *Campylobacter jejuni* şi *C. coli* reprezintă principalii agenţi etiologici ai enteritelor umane, atât în Europa cât şi în Statele Unite şi alte ţări industrializate (1).

Infecţiile pot apărea pe toată durata anului, însă există un vârf de incidenţă în timpul verii şi la începutul toamnei, respectiv în perioada iunie-septembrie (4). Având în vedere acest aspect, scopul studiului

a fost atât stabilirea prevalenţei *Campylobacter spp.* în carcasele de pui, cât şi stabilirea speciilor implicate; de asemenea s-a urmărit verificarea caracterului sezonier al infecţiilor cu *Campylobacter spp*.

MATERIALE ŞI METODE

Pentru a determina prevalenţa *Campylobacter spp.* în carcasele de broileri, s-a determinat prezenţa acestui microorganism la nivelul carcaselor de pui existente în reţeaua comercială. Astfel, în cadrul studiului s-au analizat 153 de probe constituite din pielea puilor recoltată din zona gâtului şi de pe jumătate din carcasă. Carcasele de pui au fost recoltate din 3 supermarketuri, ele provenind de la 3 abatoare diferite, codate în cadrul studiului ca fiind A, B şi C. Studiul s-a desfăşurat pe parcursul unui an (2008), săptămânal recoltându-se probe de carcase provenite de la fiecare din cele 3 abatoare. Carcasele recoltate se aflau în stare refrigerată, iar data de producere era cu maxim 3 zile înainte de data introducerii în procesul de analiză, întrucât *Campylobacter spp.* nu rezistă la temperatura de congelare, iar după 72 ore de la recoltarea probei este mai dificil de izolat (12). După recoltare, probele au fost ambalate în pungi de plastic, etichetate, transportate la laborator în condiţii de refrigerare şi introduse în lucru în aceeaşi zi.

Izolarea, confirmarea şi identificarea germenilor din genul *Campylobacter* s-a realizat în conformitate cu SR EN ISO 10272-1/2006. Astfel, schema de lucru a cuprins etapa de îmbogăţire, de izolare, de confirmare, iar apoi etapa de identificare. *Campylobacter* termotolerant necesită pentru incubare temperatura de 41,5°C şi condiţii de microaerofilie (5% oxigen, 10% dioxid de carbon, 85% azot) (5, 13).

O cantitate de 25 g din fiecare probă a fost adăugată peste 225 ml bulion Bolton care apoi a fost incubat la 41,5°C pentru 48 de ore; incubarea s-a realizat în atmosferă microaerobă folosind kituri speciale pentru *Campylobacter*, generatoare de gaz (CampyGen). Subculturile au fost striate pe agar cărbune cefoperazona deoxicolat modificat (agar mCCD) după care au fost incubate la 41,5°C pentru 48 de ore, în condiţii de microaerofilie. Coloniile tipice ca fiind *Campylobacter* au fost examinate în vederea confirmării urmărind morfologia şi motilitatea germenilor izolaţi, detecţia oxidazei şi capacitatea de dezvoltare a acestora la 25°C în condiţii de microaerofilie şi la 41,5°C în condiţii de aerobioză.

Pentru identificarea speciei s-au realizat următoarele teste: detecţia catalazei, detecţia sensibilităţii la acid nalidixic şi cefalotină, detecţia hidrolizei hipuratului, detecţia hidrolizei indoxyl-acetatului (tabelul 1). Diagrama modului de lucru este prezentată în figura 1.

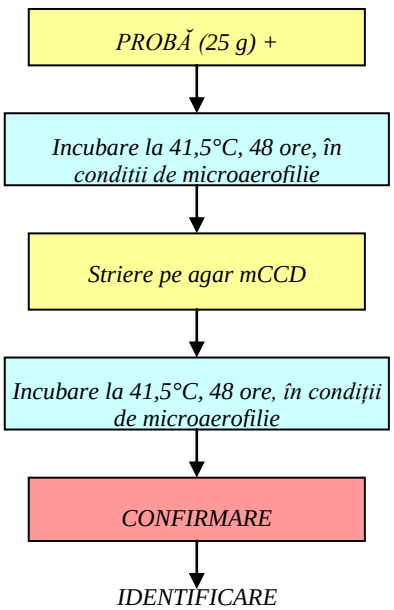


Fig. 1. Schema modului de lucru utilizată în cadrul studiului

Tabelul 1
Testele de identificare a speciei de Campylobacter, conform SR EN ISO 10272-1/2006

Caracteristică	*C. jejuni*	*C. coli*	*C. lari*	*C. upsaliensis*
Detecţie catalaza	+	+	+	-
Sensibilitate acid nalidixic	S	S	R/S	S
Sensibilitate cefalotină	R	R	R	S
Hidroliză hipurat	+	-	-	-
Hidroliză indoxyl acetat	+	+	-	+

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele privind prevalenţa *Campylobacter spp.* în carcasele de broiler examinate sunt prezentate în tabelul 2.

Din cele 51 de probe provenind de la abatorul A, în cazul a 5 probe s-a detectat prezenţa *Campylobacter spp.*, ceea ce relevă un procent de probe pozitive de 9,8 %. În urma identificării speciei, s-a constatat că toate tulpinile izolate au fost reprezentate de *Campylobacter coli.* Aceste tulpini au fost izolate de la probe recoltate în lunile iulie şi august 2008.

În ceea ce privesc probele provenind din abatorul B, din cele 51 de probe, 47 au fost pozitive, reprezentând 92,2 % din total. Dintre acestea s-au izolat 31 de tulpini de *Campylobacter jejuni,* 15 tulpini de *Campylobacter coli* şi 1 tulpină provenind de la o altă specie de *Campylobacter* (*C. lari*).

Pentru abatorul C, rezultatele au fost următoarele: 42 de probe pozitive reprezentând 82,3% din total, din care 36 de tulpini de *Campylobacter jejuni* şi 6 tulpini de *Campylobacter coli.*

În cazul abatoarelor B şi C, probele pozitive identificate au fost repartizate uniform pe toată perioada anului 2008.

Tabelul 2
Prevalenţa Campylobacter spp şi identificarea tulpinilor izolate

Proveniența Abatorul	Nr. probe recoltate	Rezultate obţinute						
		Campylobacter spp.				Probe pozitive *C. jejuni* (nr.)	Probe pozitive *C. coli* (nr.)	Probe pozitive altă specie (nr.)
		Probe pozitive		Probe negative				
		Nr.	5	Nr.	%			
A	51	5	9,8	46	90,2	0	5	0
B	51	47	92,2	4	7,8	31	15	1
C	51	42	82,3	9	17,7	36	6	0

În cazul probelor provenite din abatorul A, prevalenţa scăzută a *Campylobacter spp.* poate fi explicată atât prin menţinerea unei stări stricte de igienă în timpul abatorizării şi procesării carcaselor, cât şi prin proveniența acestora dintr-o fermă având un grad scăzut de contaminare cu *Campylobacter spp.* al puilor; acest aspect poate fi dovedit printr-un studiu care să vizeze stabilirea incidenţei *Campylobacter spp.* la nivelul cecumurilor puilor abatorizaţi.

În cazul probelor provenite de la abatoarele B şi C, se observă că cel mai frecvent a fost izolat *Campylobacter jejuni* (65,9 %, respectiv 85,7 % din totalul probelor pozitive), acest lucru fiind cu atât mai important cu cât această specie este cel mai frecvent izolată în cazul enteritelor bacteriene la oameni.

Deşi cele 5 probe pozitive provenite din abatorul A au fost recoltate în lunile de vară, totuşi frecvenţa mare a *Campylobacter spp.* în carcasele provenind din abatoarele B şi C nu a fost corelată cu o anumită perioadă a anului, acest aspect nepermiţând formularea unei concluzii privind caracterul sezonier al infecţiilor cu acest germen.

Rezultatele acestui studiu indică un grad ridicat de contaminare a carcaselor de pui cu *Campylobacter spp.*, contaminare care ar putea fi prevenită printr-o igienă corespunzătoare în timpul abatorizării şi procesării carcaselor.

În ansamblu, prevalenţa *Campylobacter spp.* în carcasele de broileri provenind din cele 3 abatoare a fost de 61,4 %, valoare care, deşi se află la limita superioară, se încadrează în raportările Agenţiei Europene pentru Siguranţa Alimentelor privind prevalenţa *Campylobacter spp.* în carcasele de pui aflate spre vânzare cu amănuntul în statele membre (11).

CONCLUZII

1. Prevalenţa *Campylobacter spp.* în carcasele de pui aflate în reţeaua comercială se încadrează în limitele existente în celelalte state membre ale Uniunii Europene.
2. *Campylobacter jejuni* a reprezentat specia de *Campylobacter* cel mai frecvent izolată în carcasele de broileri provenite din 3 abatoare din România.
3. Stabilirea unui caracter sezonier al infecţiilor cu *Campylobacter spp.* la broileri nu a fost posibilă, întrucât frecvenţa contaminării carcaselor a fost relativ constantă pe tot parcursul anului.

BIBLIOGRAFIE

1. Barros-Velazquez J., Jimenez A., Villa T.G. – Isolation and typing methods for the epidemiologic investigation of thermotolerant campylobacters. Internatl. Microbiol., 2, 217-226, 1999.
2. Bărzoi D., Apostu S. – Microbiologia produselor alimentare. Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2002.
3. Corry J.E., Atabay H.I. – Poultry as a source of Campylobacter and related organisms. Journal of Applied Microbiology, 90, 96S-114S, 2001.
4. Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L. – Principiile medicinii interne. Ed. Teora, Bucureşti, 2003.
5. Gavrilă G.C. – Campilobacterioze transmisibile la om prin alimente. Ed. Arvin Press, Bucureşti, 2003.
6. Jorgensen F., Bailey R., Willams S., Henderson P., Wareing D.R., Bolton F.J., Frost J.A., Ward L., Humphrey T.J. – Prevalence and number of Salmonella and Campylobacter spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbilogy, 76, 151-164, 2002.
7. Newell D.G., Fearnley C. – Sources of Campylobacter colonization in broiler chickens. Apllied and Environmental Microbiology, 69(8), 4343-4351, 2003.
8. Newell D.G., Wagenaar J.A. – Poultry infections and their control at the farm level, p.497-509. In: Nachamkin I. and Blaser M.J. – Campylobacter, 2nd edition. ASM Press, Washington D.C., 2000.
9. Rahimi E., Tajbakhsh E. – Prevalence of Campylobacter species in poultry meat. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 11(4), 257-262, 2008.
10. Son I., Englen M.D., Berrang M.E., Fedorka-Cray P.J., Harrison M.A. – Prevalence of Arcobacter and Campylobacter on broiler carcasses during processing. International Journal of Food Microbiology, 113, 16-22, 2007.
11. XXX – EFSA – The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005, p. 83-102, 2007.
12. XXX - Commission Decision 516/2007 concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. and Salmonella spp. in broiler flocks and on the prevalence of Campylobacter spp. and Salmonella spp. in broiler carcasses out in the Member States, 2007.
13. XXX – SR EN ISO 10272-1 – Microbiologia alimentelor şi nutreţurilor. Metode orizontale pentru detectarea şi enumerarea Campylobacter spp., p. 4-8, 2006.

PROPRIETAŢILE ANTOMICROBIENE ALE UNOR PLANTE DIN FAMILIA LAMIACEAE ŞI APLICAŢIILE LOR POTENŢIALE IN TERAPIE

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF SOME *LAMIACEAE* PLANTS AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS IN THERAPY – A REVIEW

NICULAE MIHAELA[1], SPINU MARINA[1], SANDRU CARMEN DANA[1], BRUDASCA F. [1], PUSCAS LELIA[1], SCURTU I. [1], SZAKACS BIANCA[1], MATES C. I. [1], RINDT IULIA[1], TAUTAN M. [1], NICULAE CATALINA[2], MOTOC NICOLETA[2]

[1]FMV Cluj-Napoca

[2]UMF Cluj-Napoca

nicmisi23@yahoo.com

The increasing occurrence of antimicrobial resistance represents a worldwide major concern for both human and veterinary medicine. Although several strategies have been proposed to overcome and control this situation, still a clear solution has not been found due to the antibiotic resistance complexity and consequences and also considering the side effects of classic antimicrobial drugs. A powerful trend recommends the herbal preparations to be investigated for their antimicrobial activity. Therefore, nowadays, there is a growing interest in the antimicrobial screening of extracts and essential oils from plants in order to discover new antimicrobial agents.

The Lamiaceae is one of the most diverse and widespread plant families in terms of ethnomedicine and its medicinal value is manly based on the volatile oils concentration.It is well documented that some plants belonging to this family possess antimicrobial properties, however the reported aspects are not constant.

Key words: lamiaceae plants, antimicrobial

În prezent, studiul extractelor vegetale în vederea izolării unor compuşi care ar putea fi utilizaţi în terapeutică este o preocupare larg întâlnită în lumea medicală. Această strategie de abordare, în scopul soluţionării fenomenului de antibioticorezistenţă, este una dintre cele mai moderne.

Sunt numeroase ţările în care se află în curs de derulare ample programe de cercetare privind screeningul activităţii antimicrobiene al plantelor tradiţionale (India, Palestina, Cuba, Italia, Iordania, Brazilia, Columbia, Turcia, ţări ale continentului african) (Sartoratto şi col., 2004; Delamare şi col., 2007; Dulger şi Gonuz, 2004; Rojas şi col., 2006). Au fost realizate numeroase studii privind efectul extractelor vegetale asupra multiplicării bacteriene. Astfel**,** diferiţi autori au arătat că plantele medicinale valorificate sub diferite forme galenice, afectează substanţial procesele de proliferare bacteriană, chiar şi în cazul unor specii bacteriene recunoscute pentru capacitatea de a se sustrage acţiunii substanţelor antibiotice (*Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella spp*., *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* etc). Utilizând diferite tehnici şi metode, aceste teste screening nu fac decât să confirme potenţialul terapeutic antimicrobian deţinut de unele plante. Thuille şi col. au semnalat activitatea bactericidă a extractului alcoolic de *Evodia rutaecarpa*, manifestată faţă de coci gram pozitivi şi tulpini de *P. aeruginosa*; concentraţia minimă inhibitorie (CMI) a extractului a avut valori cuprinse între 0,25 - 1 mg/ml. Cocii au fost distruşi după 30-90 de minute de incubare în diferite diluţii ale extractului (0,5-1,5 mg/ml) (metoda diluţiilor seriate). În cadrul unui studiu mai amplu, Zaidan şi col**.** au efectuat screeningul efectelor *in vitro* a 5 extracte vegetale (*Andrographis paniculata*, *Vitex negundo*, *Morinda citrifolia*, *Piper sarmentosum* şi *Centella asiatica*) asupra unor tulpini bacteriene cu antibioticorezistenţă demonstrată: stafilococi methicilin-rezistenţi (MRSA), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* şi *Escherichia coli*, metoda fiind similară celei de realizare a antibiogramelor.

Extractele metanolice obţinute din *M. citrifolia, P. sarmentosum*, *A. paniculata* şi *C. asiatica* au demonstrat reale proprietăţi antistafilococice. Exceptând extractele alcoolice derivate din plantele *A. paniculata* şi *P. sarmentosum*, biologic active faţă *P. aeruginosa*, efectele asupra bacteriilor Gram negative

nu au prezentat semnificaţie. Pentru *A. paniculata* s-a determinat ulterior şi concentraţia minimă inhibitorie (CMI =2 g/disc).

Cercetări similare au fost efectuate şi de către alţi cercetători, scopul general fiind acela de identificare şi izolare a componentelor antimicrobiene. Cercetătorii germani au determinat în compoziţia chimică a speciilor de *Echinacea* un compus cu proprietăţi antimicrobiene, denumit echinacosid; acesta prezintă un spectru larg de activitate antibacteriană şi adesea este comparat ca potenţă cu penicilinele. În Germania, *Echinacea* este recomandată în terapia bronşitelor, tonsilitelor, otitelor cu etiologie bacteriană.

După Cowen, fitocompuşii antimicrobieni se pot include în mai multe grupe din punct de vedere al structurii chimice:

- fenoli, polifenoli şi acizi derivaţi; cei mai importanţi reprezentanţi sunt acizii cinamic şi cafeic (cu acţiune antivirală, antibacteriană şi antifungică), catecholul, pirogalolul, eugenolul (efect intens anti - *Helicobacter pylori*), carvacrolul (efect intens anti - *Pseudomonas aeruginosa* şi *Staphylococcus aureus*), mentholul.
- quinone; sunt importante pentru capacitatea evidenţiată *in vitro* de inhibare a colonizărilor bacteriene (exemplu hypericina, izolată de la *Hypericum perforatum*).
- flavone, flavonoide şi alcooli derivaţi din flavone, respectiv flavonoide
- taninuri
- cumarine: warfarina
- alcaloizi
- lectine şi polipeptide
- terpenoide, uleiuri esenţiale
- poliacetilene
- alţi compuşi

Compuşii încadraţi în grupa fenolilor prezintă un real interes pentru diverşi cercetători; în acest sens este demonstrat faptul că eficienţa antibacteriană a uleiurilor esenţiale obţinute din speciile *Thymus vulgaris, Origanum vulgare* şi *Eugenia caryophyllus* este asigurată de prezenţa thymolului, carvacrolului şi a eugenolului. Mecanismul prin care acest tip de compuşi chimici îşi exercită efectul inhibitor asupra proliferării bacteriene este determinat fundamental de structura chimică, respectiv prezenţa grupării hidroxil (-OH) care conferă caracterul hidrofob şi care permite alterarea permeabilităţii membranei bacteriene şi implicit moartea celulară prin extruzia unor elemente citoplasmatice (ioni de fosfor şi potasiu) (Delamare şi col., 2007).

Rămân însă neelucidate numeroase aspecte alte mecanismelor de acţiune în cazul extractelor de natură vegetală, deşi proprietăţile lor antimicrobiene sunt net demonstrate.

a) Acţiunea antimicrobiană a extractelor de *Thymus vulgaris*

Efectul antagonic exercitat de extractele uleioase şi alcoolice obţinute din *Thymus vulgaris* asupra dezvoltării bacteriene a fost demonstrat de numeroşi cercetători (Cosentino şi col., 1999; Cowan, 1999; Nascimento şi col., 2000; Faleiro şi col., 2003; Sartoratto şi col., 2004). "Spectrul" de acţiune antimicrobiană al acestei plante se răsfrânge atât asupra bacteriilor gram pozitive, cât şi a celor gram negative.

Acţiunea bacteriostatică a uleiurilor esenţiale de *Thymus vulgaris* a fost observată pe tulpini de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *B. cereus* şi *Listeria monocytogenes* (Cosentino şi col., 1999).

De asemenea, în cadrul unui studiu extins (10 plante, 4 principii bioactive, 13 specii bacteriene cu antibioticorezistenţă multiplă cunoscută, utilizând metoda de difuzie), Nascimento şi col. au observat că extractul alcoolic obţinut din *Thymus vulgaris* a acţionat inhibitor şi asupra tulpinilor de *Pseudomonas aeruginosa*, acestea fiind responsabile de infecţii nosocomiale dificil de controlat prin antibioticoterapia clasică. Extractul alcoolic a fost ulterior evaluat de aceeaşi autori în ceea ce priveşte utilitatea asocierii lui cu substanţe antibiotice faţă de care *Pseudomonas aeruginosa* nu este susceptibil (tulpinile respective şi-au manifestat rezistenţa faţă de 19 antibiotice, din care au fost selecţionate pentru acest test doar 3: cloramfenicolul, ampicilina şi tetraciclina). Asocierea extract alcoolic de *Thymus vulgaris* – antibiotic a prezentat efecte antimicrobiene, acest efect sinergic fiind optim pentru concentraţia de 10µg/mL extract

(Nascimento şi col., 2000). Studii privind posibilităţile de potenţare a acţiunii terapeutice a unor antibiotice uzuale prin asocierea acestora cu extracte vegetale au fost intreprinse şi de alţi autori (Fujita şi col., 2005; Yang şi col., 2005).

Rezultatele studiului lui Burt şi Reinders (2003) au sugerat faptul că uleiurile esenţiale ale cimbrului de câmp (*Thymus vulgaris*) posedă faţă de *Escherichia coli* tulpina O_{157}:H_7 activitate antimicrobiană, bacteriostatică (625µl/l) şi bactericidă (1250 µl/l). De asemenea, a fost evidenţiat şi efectul anti - *Helicobacter pylori* al extractului apos de *Thymus vulgaris* (CMI = 3,5 mg/ml) (Thuille şi col., 2003).

O remarcabilă sinergie între un compus chimic identificat şi izolat de la *Thymus vulgaris*, denumit baicaleină) şi tetraciclină, respectiv antibiotice beta – lactamice a fost semnalată în 2005 de colectivul coordonat de Fujita. Sinergismul de acţiune antibacteriană s-a manifestat faţă de tulpini methicillin – rezistente de *Staphylococcus aureus* (MRSA) la care s-au identificat prin analiza PCR gene *tetK* (codifică pompe de eflux activ pentru tetracicline). Rezultatele studiului *in vitro* au arătat că extractul preparat din frunze de *Thymus vulgaris L.* a determinat reducerea semnificativă a concentraţiei minime inhibitorii a tetraciclinei faţă de tulpinile MRSA testate (de la 4 µg/ml la mai puţin de 0,064 µg/ml). Compusul, care din punct de vedere chimic este o trihidroxiflavonă, exercită el însuşi uşoare efecte anti – MRSA (Fujita şi col., 2005).

Un studiu complex asemănător a realizat Nascimento şi col. (2000) testând eficacitatea extractelor uleioase asupra unui număr important de tulpini bacteriene din speciile: *Staphylococcus, Salmonella, Pseudomonas, Bacillus, Candida, Proteus, Klebsiella, Shigella, Enterobacter* şi *Escherichia* printr-o metodă difuzimetrică cu discuri. Efectul antibacterian a fost constatat doar împotriva a trei dintre tulpinile cercetate (*Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans* şi *Proteus spp.)*

b) Acţiunea antimicrobiană a extractelor de *Salvia officinalis*

O serie de studii screening au relevat proprietăţile antimicrobiene ale extractelor alcoolice şi ale uleiurilor esenţiale obţinute din diferite specii ale genului *Salvia* (Delamare şi col., 2007). Conform acestora, spectrul de acţiune antimicrobacteriană este relativ vast, incluzând numeroase tulpini de referinţă, dar şi tulpini izolate din diverse procese patologice (*S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739, *P. mirabilis* ATCC 14153, *K. pneumonia* ATCC 4352, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC 29212, *C. albicans* ATCC 10231 *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium, Bacillus subtilis, Aeromonas hydrophila, Aeromonas sobria*, şi *Klebsiella oxytoca*).

c) Acţiunea antimicrobiană a extractelor de *Rosmarinus officinalis*

În ceea ce priveşte potenţialul antimicrobian al speciei *Rosmarinus officinalis*, au fost raportate date concludente. Astfel, Dulger şi Gonuz (2004), utilizând metoda difuzimetrică cu discuri, au observat un pronunţat efect antagonic al extractelor etanolice faţă de dezvoltarea unor germeni ca: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces fragilis* şi *Rhodotorula rubra*.

A fost evidenţiat potenţialul antibacterian şi în cazul uleiurilor esenţiale de *Rosmarinus officinalis* L, fiind izolate şi principalele componente bioactive: α-pinen, 1,8-cineol, camfor, verbenon şi borneol (Santoyo şi col, 2005). Rezultatele obţinute de aceştia sunt în concordanţă cu cele raportate ulterior de Dulger şi Gonuz, concluzia fiind că spectrul antimicrobian al extractelor şi uleiurilor esenţiale este complex (numeroase specii standard gram pozitive şi gram negative). Santoyo şi col., recurgând la metodele difuzimetrică cu discuri şi de diluţie în bulion, au determinat valorile minime bactericide şi fungicide faţă de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* (0,25–2,25 mg/ml). Faţă de extractele de rozmarin, cea mai susceptibilă specie bacteriană s-a dovedit a fi *Staphylococcus aureus*.

d) Acţiunea antimicrobiană a extractelor de *Mentha piperita*

În cazul diferitelor varietăţi ale genului *Mentha* au semnalate proprietăţi antimicrobiene notabile. Uleiurile esenţiale de *Mentha piperita* L, *Mentha spicata* L şi *Mentha arvensis L*. sunt capabile să inhibe dezvoltarea unor specii ca *Helicobacter pylori, Salmonella enteritidis, Escherichia coli* O157:H7,

Staphylococcus aureus meticilin-rezistent (MRSA) şi *Staphylococccus aureus* meticilin- susceptibil (MSSA) într-o manieră dependentă de doză (Santoyo şi col., 2005), iar *Mentha aquatica* L., *Mentha longifolia* L. şi *Mentha piperita L*. sunt deosebit de active mai ales faţă de tulpini de *Esherichia coli*, cel mai intens acţionând uleiul esenţial de *M. piperita* faţă de tulpini multirezistente de *Shigella sone*i şi *Micrococcus flavus* ATTC 10240 (Settineri şi col., 2003). *Mentha piperita* şi *Myrtus communis* au exercitat efecte antimicrobiene considerate excelente împotriva germenilor din speciile *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* şi *Candida albicans*, sugerând posibilitatea aplicării acestora în terapia infecţiilor determinate de *C. albicans* şi *E. coli* (Santoyo şi col., 2005).

e) Acţiunea antimicrobiană a extractelor de *Lavandula angustifolia*

Eficacitatea uleiurilor esenţiale obţinute din: *Lavandula latifolia*, *Lavandula angustifolia*, trei hibrizi *Lavandula latifolia* × *Lavandula angustifolia*, *Thymus vulgaris*, *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis*, *Salvia lavandulifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Hissopus officinalis* şi *Satureja montana* a fost demonstrată şi în controlul dezvoltării microorganismelor patogene cu semnificaţie pentru igiena alimentară: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* serovar 4b şi *Staphylococcus aureus*. Aceste uleiuri pot constitui o alternativă pentru aditivii antimicrobieni convenţionali din industria alimentară **(**Rota şi col., 2004).

f) Acţiunea antimicrobiană a extractelor de *Mellisa officinalis*

Proprietăţile antibacteriene ale *Mellisa officinalis* au fost investigate în proiecte de cercetare din lumea întreagă dar mai ales în America latină, Argentina. Testând uleiul esenţial de *Mellisa officinalis* pe 10 tulpini bacteriene cu implicaţii clinice patogene importante în zona respectivă (*Staphylococcus aureus, Salmonelle choleraesuis, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Candida albicans, Proteus spp., Klebsiella pneumoniae, Shigella spp., Enterobacter aerogenes, Escherichia coli*) efectul antibacterian s-a constatat prin prezenţa unei zone de inhibiţie cu diametru mai marte de 7 mm doar în cazul a trei tulpini bacteriene: *Staphylococcus aureus, Salmonella choleraesuis* şi *Klebsiella pneumoniae* (Muroi şi Kubo, 2001).

REFERENCES

1. Burt S.A., Reinders R.D. -2003- Antibacterial activity of selected plant eesential oils against Escherichia coli O157:H7, Letters in Applied Microbiology, 36, 162-167
2. Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., et al. -1999- In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils, Lett Appl Microbiol, 29(2):130-5.
3. Cowan Marjorie Murphy -1999- Plant Products as Antimicrobial Agents, Clinical Microbiology Reviews Vol. 12, No. 4 p. 564–582
4. Delamare A. P. L., Pistorello I. T. M., Artico Liane, Serafini L. A., Echeverrigaray S. -2007- Antibacterial activity of the essential oils of Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil, Food Chemistry, 100:603-608
5. Dulger B., Gonuz A. -2004- Antimicrobial activity of certain plants used in turkish traditional medicine, Asian Journal of Plant Sciences, 3(1):104-107
6. Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Fujita M., Shiota S., Kuroda T., Hatano T., Yoshida T., Mizushima T., Tsuchiya T.-2005- Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Microbiol Immunol., 49(4):391-6.
7. Muroi H, Kubo I. –1996- Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, 80(4):387-94
8. Nascimento G.G.F., Juliana Locatelli, Freitas P.C., Giuliana L.Silva -2000- Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, Brazilian Journal of Microbiology, 31:247-256
9. Rojas J.J., Veronica J.Ochoa, Ocampo S.A., Munoz J.F. -2006- Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections, BMC Complementary Medicine, 6:2
10. Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibañez E., Señoráns F.J., Reglero G.-2005- Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction, 68(4):790-5
11. Sartoratto A., Ana Lúcia Machado, Camila Delarmelina -2004- Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, Braz. J. Microbiol., vol.35, no.4, p.275-280
12. Settineri R. A., Krassner S. M. -2003- Antimicrobial Effects of Plant-Derived Essential Oil Formulations on Pathogenic Bacteria, The Journal of the American Nutraceutical Association, Vol. 6, No. 3
13. Thuille N., Fille M., Nagl M.. -2003- Bactericidal activity of herbal extracts., Int J Hyg Environ Health., 206(3):217-21
14. Yang Z.C., Wang B.C., Yang X.S., Wang Q., Ran L. -2005- The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of Staphylococcus aureus, Colloids Surf B Biointerfaces, 41(2-3):79-81
15. Zaidan M.R., Noor Rain A., Badrul A.R., Adlin A., Norazah A., Zakiah I. -2005- In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method, Trop Biomed, 22(2):165-70.

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS ISOLATED FROM DOGS WITH OTITIS EXTERNA

NICULAE MIHAELA[1], SPINU MARINA[1], SANDRU CARMEN DANA[1], BRUDAŞCĂ F. [1], PUSCAS LELIA[1], SCURTU I. [1], RINDT IULIA[1], SZAKACS BIANCA[1], CADAR D. [1], MATES C. I. [1], TAUTAN M. [1], NICULAE CATALINA[2], MOTOC NICOLETA[2], MOALE ROXANA[2]

[1]FMV Cluj-Napoca

[2]UMF Cluj-Napoca

nicmisi23@yahoo.com

The antimicrobial susceptibility profile of 56 clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa obtained from dogs with otitis externa (OE) was determined using the disc diffusion method and considering several antimicrobials, most of them available as commercial otic preparations or recommended for systemic therapy. Our results suggested a remarkable antibiotic resistance, as 100% of the isolates were resistant to oxacillin, chloramphenicol, erythromycin, neomycin, highly resistant to amoxicillin-clavulanic acid, tetracycline, cefalexin, cephalotin, gentamicin and ampicillin (96,43%), polymyxin B (91,08%) and trimethoprim-sulphamethoxazole (87,5%) and susceptible only to 2nd generation quinolones, norfloxacin (100%), followed by ciprofloxacin (96,42%) and enrofloxacin (67,85%) and, to a lesser degree, ceftazidime (42,85%). Because of multidrug-resistant profiles for P. aeruginosa isolates empirical treatment of P. aeruginosa infections is not advisable. Under the circumstances described here, norfloxacin or ciprofloxacin would be the antibiotics of choice when Pseudomonas aeruginosa is involved as a perpetuating factor of OE.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic susceptibility, otitis externa, dog

Pseudomonas aeruginosa is an important pathogen for both human and veterinary medicine, well known for its elevated level of antibiotic resistance. In dogs, *Pseudomonas aeruginosa* was associated with otitis externa, cystitis, endocarditis, dermatitis, wound infections and conjunctivitis (Rubin et al., 2008; Seol et al., 2002).

Concerning the otitis externa (OE), the most common disease of the canine ear canal, several studies have incriminated this opportunistic bacteria as responsible for the chronic, recurrent state of the inflammatory process and also for the difficulty of electing a proper antimicrobial therapy (Wildermuth et al., 2007; Lyskova et al., 2007; Seol et al., 2002). As suggested by previous reports, the most important problem in the treatment of OE caused by *P. aeruginosa* strains is the development of fast and high antibacterial resistance. Therefore, the information about the level of resistance and antibiotic susceptibility profile in case of *P. aeruginosa* is an important issue influencing the therapeutic approach.

The objective of this retrospective study was to evaluate the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates towards antimicrobial agents currently used when treating otitis externa in dogs.

MATERIALS AND METHODS

Collection and Processing of Samples: From 2005 to 2008, a total of 130 ear exudates samples were aseptically collected from the external auditory canal of canine patients showing clinical signs of otitis externa (erythema, otorrhoea, pain, itch, lesions of the ear tegument). No antibiotic treatment was administered to the dogs 3 days before ear swabs were obtained.

Identification of Isolates: The *Pseudomonas aeruginosa* isolates (n=56) were identified using colony morphology on blood agar, MacConkey agar, Gram stain characteristics, positive reaction to oxidase, pyocyanin production and by API 20NE system (BioMerieux, France).

Susceptibility to antimicrobials was assessed on Mueller Hinton agar by Bauer – Kirsby disk diffusion method following NCCLS recommendations. The antibiograms included 16 antibiotic agents of different

groups: gentamicin (GM,10 µg), oxacillin (OX, 1 µg), tetracycline (TC, 30 µg), trimethoprim-sulphamethoxazole (SXT, 25 µg), ampicillin (AMP, 10 µg), enrofloxacin (ENF, 5 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), norfloxacin (NOR, 10 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), polymyxin B (PB, 300 UI), amoxicillin-clavulanic acid (AMC, 30 µg), cefalexin (CN, 30 µg), erythromycin (E, 15 UI), neomycin (N, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg) and cephalotin (KF, 30 µg).

Interpretation based upon the interpretive criteria developed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) classified the isolates in three categories: I-susceptible to three or more of the antibiotics tested, II-susceptible to quinolones only, III–multidrug resistance MDR (resistance at least three of tested antibiotics).

RESULTS AND DISCUSSIONS:

We evaluated 130 ear exudates samples collected from dogs with otitis externa, mainly chronic and bilateral OE. Microbiological processing of samples yielded 56 *Pseudomonas aeruginosa* strains. Susceptibility to 16 antibiotics was tested. The results of our study, obtained using the Bauer – Kirby disk diffusion method, are presented in figure 1.

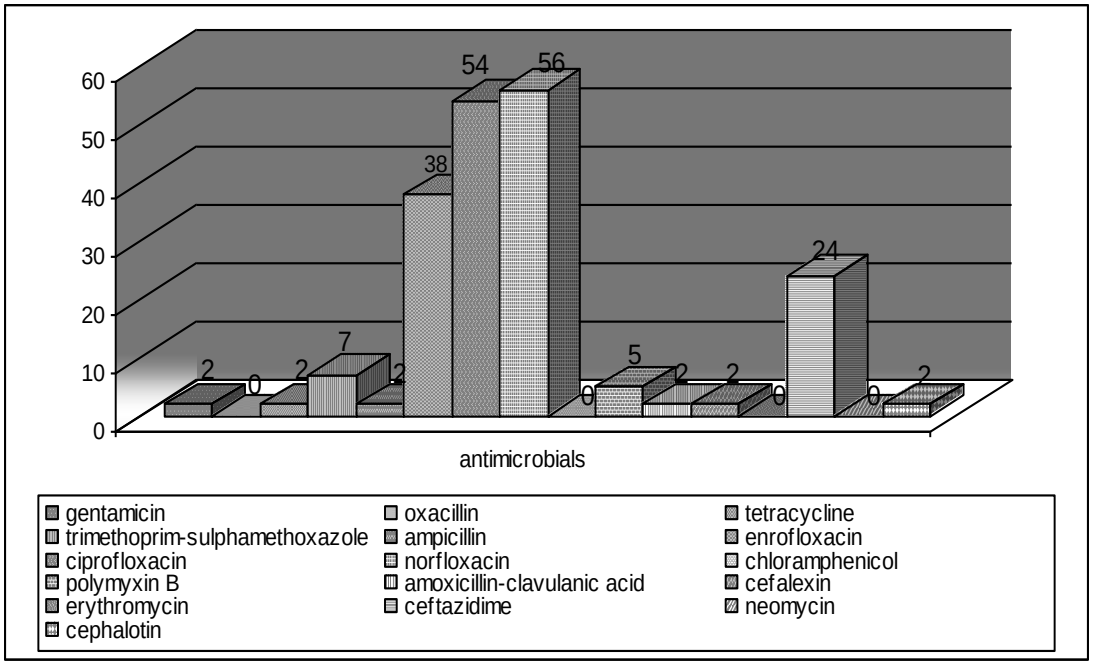


Figure 1. Antibiotic susceptibility level in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from dogs with otitis externa

Among the beta-lactams, all isolates displayed low susceptibility to ampicillin, cephalothin and amoxicillin/clavulanic acid. Similar aspects were observed also for polymyxin B, tetracyclin and aminoglycosides (gentamicin). 100% of the strains proved to be resistant to chloramphenicol, oxacillin, erythromycin and neomycin, while only seven strains were susceptible to trimethoprim\ sulfamethoxazole.

These results suggested a remarkable antibiotic resistance, as 100% of the isolates were resistant to oxacillin, chloramphenicol, erythromycin, neomycin, highly resistant to amoxicillin-clavulanic acid (96,43%), tetracycline (96,43%), cefalexin (96,43%), cephalotin (96,43%), gentamicin (96,43%), ampicillin (96,43%),

polymyxin B (91,08%) and trimethoprim-sulphamethoxazole (87,5%) and susceptible only to 2nd generation quinolones, norfloxacin (100%), followed by ciprofloxacin (96,42%) and enrofloxacin (67,85%) and, to a lesser degree, ceftazidime (42,85%).

Our data confirmed some aspects presented in previous reports, but we found different resistance profile.

In the current study, the susceptibility rate of *P. aeruginosa* isolates to the 16 antimicrobials tested *in vitro* were relatively low compared to the sensitivity pattern to different anti pseudomonal drugs reported by several authors.

Petersen et al. also found most or all isolates to be susceptible to gentamicin, amikacin and ticarcillin, but also close to 100% of the isolates were susceptible to enrofloxacin. We found only 67,85% sensitive to enrofloxacin and also the resistance level to gentamicin is much higher compared to this study.

Recent researches (Rubin et al., 2008; Wildermuth et al., 2007) pointed out that the susceptibilities of ear isolates to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin were 46.9%, 66.7%, and 75.0%, respectively. Ear isolates were significantly less susceptible to enrofloxacin than to ciprofloxacin (P=0.021) and when fluoroquinolone resistance was present, ear isolates were significantly less susceptible to enrofloxacin than to ciprofloxacin (P<0.001) and marbofloxacin (P=0.014). Hariharan et al. reported that most isolates were susceptible to gentamycin, but resistant to ampicillin, penicillin and trimethoprim-sulphamethoxazole.

This lower susceptibility observed during our research might be due to the frequent and/ or indiscriminate use of these antibiotics among patients. For example, gentamicin is very frequently used to treat canine otitis caused by Gram-negative bacteria, as several topic agents include this antibiotic.

Moreover, many practitioners treat OE on the basis of their clinical impressions and an examination of a stained smear of the exudate. If the smear shows only Gram- positive cocci, they may use a drug that is likely to be effective against staphylococci, streptococci, and enterococci.

Previous studies suggested that the selective pressure from the use of antimicrobial agent is a major determinant for the emergence of resistant strains (Rubin et al., 2008; Wildermuth et al., 2007).

P. aeruginosa is reputed for its innate resistance to most antimicrobials, displaying several multi-resistance patterns and being able to develop quick resistance during treatment. In dogs, this bacterial species is mostly isolated from chronic ear infections, well known for the frustrating difficulty in electing a suitable treatmeny, as frequently are associated with a chronic or recurrent course despite all therapeutic approaches. This aspect can be the direct consequence of the complex multifactorial aetiology and also of the emergence of resistance towards antimicrobial agents among the microorganisms isolated, case of ***Staphylococcus spp.*** and especially, ***Pseudomonas aeruginosa*** **(**Hariharan et al., 2006**)**.

In canine otitis, the therapy usually involves also antimicrobials, including almost all main antimicrobial groups, both narrow- and broad-spectrum ones. A number of antibacterials have been suggested for use and have been found to be effective in the treatment of otitis externa and these include: gentamicin, sulphadiazine in combination with trimethoprim, ampicillin, ampicillin in combination with cloxacillin, enrofloxacin, amoxycillin, cephalexin, marbofloxacin.

In spite of the treatment, the inflamatory process can be a long-standing problem that may predispose for development of resistance due to repeated or prolonged antimicrobial treatment.

Infections with antimicrobial-resistant bacteria are a great challenge in both human and veterinary medicine. *Pseudomonas aeruginosa* is notorious for its resistance to antibiotics, only a few antibiotics are effective against it, usually case of fluoroquinolones, and even these antibiotics are not effective against all strains.

CONCLUSIONS

1. The *P. aeruginosa* isolates included in the study (n=56) were almost all derived from cases of chronic or recurrent otitis externa.

2. On the basis of our results, we suggest the use of antimicrobial susceptibility testing before treatment, especially in cases in which multiresistant bacteria (*P. aeruginosa*) are suspected.

3. Because of multidrug-resistant profiles for *P. aeruginosa* isolates empirical treatment of *P. aeruginosa* infections is not advisable. Ours findings suggest also that many antimicrobial agents commonly used in companion animals may not constitute appropriate therapy for canine pseudomonas infections.

4. Under the circumstances described here, norfloxacin or ciprofloxacin would be the antibiotics of choice when *Pseudomonas aeruginosa* is suspected of being the most probable cause of OE. Ciprofloxacin is effective against the highest percentage of strains, probably due to the absence of any commercial preparations for veterinary use which include this antibiotic.

REFERENCES

1. Graham-Mize Christine A., Edmund J. Rosser Jr Comparison of Microbial Isolates and Susceptibility Patterns From the External Ear Canal of Dogs With Otitis Externa, Journal of the American Animal Hospital Association 40:102-108 (2004)
2. Hariharan H., Mada Coles, Doris Poole, Lorraine Lund, and Robert Page Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa, Can Vet J., 47(3): 253–255 (2006)
3. Lyskova P., Vydrzalova M., Mazurova J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa, Journal of Veterinary Medicine Series A, 54(10): 559 – 563 (2007)
4. McKay L., Rose C.D., Matousek J.L., Schmeitzel L.S., Gibson N.M., Gaskin J.M. Antimicrobial Testing of Selected Fluoroquinolones Against Pseudomonas aeruginosa Isolated From Canine Otitis, J Am Anim Hosp Assoc., 43(6):307-12 (2007)
5. Petersen Annette D., Robert D. Walker, Mark M. Bowman, Harold C. Schott, Edmund J. Rosser, Frequency of Isolation and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Staphylococcus intermedius and Pseudomonas aeruginosa Isolates From Canine Skin and Ear Samples Over a 6-Year Period (1992–1997) Journal of the American Animal Hospital Association 38:407-413 (2002)
6. Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Zhao S. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from canine infections, Vet Microbiol., 131(1-2):164-72 (2008)
7. Seol B., Naglic T., Madic J., Bedekovic M., In vitro antimicrobial susceptibility of 183 Pseudomonas aeruginosa strains isolated from dogs to selected antipseudomonal agents, J.Vet.Med.B, 49(4): 188-192 (2002)
8. Wildermuth BE, Griffin CE, Rosenkrantz WS, Boord MJ. Susceptibility of Pseudomonas Isolates From the Ears and Skin of Dogs to Enrofloxacin, Marbofloxacin, and Ciprofloxacin, J Am Anim Hosp Assoc., 43(6):337-41 (2007)

ASPECTE EPIDEMIOLOGICE ALE EVOLUȚIEI TOXIINFECȚIILOR ALIMENTARE ÎN JUDEȚUL IAŞI ÎN PERIOADA 2004-2008

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF FOOD POISONING IN IAŞI COUNTY DURING 2004-2008

OBADA M. D.[1] , DUCA ELENA[2] , VLAD – SABIE ALINA[1], CARP CARARE M.[1]
[1]FMV Iaşi
[2]DSP Iaşi

Food poisoning is an acute syndrome with gastrointestinal and sometimes neurological manifestations that affects two or more persons who consumed the same food or drink within the previous 72 hours. Depending on the contaminant, other symptoms such as chills and fever, bloody stools, dehydration and nervous system damage may follow and can lead to death.

Epidemiological investigations were carried out using the database of the Epidemiology Bureau of Public Health Authority Iasi and data from clinical observation charts of people interned in the Infectious Diseases Hospital. During 2004-2008, 321 cases of food poisoning were registered, from which 190 cases(60%) came from rural areas. Distribution of cases with this disease shows the increasing illness and the occurrence of outbreaks in the warm season, especially for focus group of 25-64 years old. The analysis of the outbreaks reported showed that the cases occurred most frequently in June and August, so in the warmer season, with consumption of food cooked and stored under incorrect conditions. The majority of food poisoning confirmed cases in Iasi were caused by bacteria of Salmonella genera. A small proportion of identified species were represented by Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus. Incriminated foods were meat and meat products, eggs and mayonnaise, cookies, creams and ice cream. During 2004 - 2008 most outbreak of food poisoning occurred in collective consumption of contaminated food.

Key words : food poisoning, Salmonella spp., collective consumption

Toxiinfecţiile alimentare sunt definite ca boli acute de origine alimentară care apar, deobicei, în mod brusc şi într-o perioadă scurtă de timp la două sau mai multe persoane care au ingerat acelaşi aliment şi care din punct de vedere clinic se manifestă preponderent prin simptome digestive, în special greaţă, vomitări şi/sau diaree, şi numai rareori şi prin simptome neurologice şi musculare. (Dobre Bărzoi, Sergiu Meica, Marian Neguţ, 1999)

Primele publicaţii de notificare a toxiinfecţiilor alimentare au apărut în 1949. Între anii 1950-1980 s-au înregistrat între 5.000-10.000 de cazuri/an în Anglia şi Ţara Galilor. Ulterior, numărul de cazuri a urcat pâna la o valoare vârf de 93.932 în 1998, existând apoi o modestă scădere. În SUA **(CDC)** în fiecare an se înregistrează 76.000.000 de îmbolnăviri de origine alimentară, 325.000 de spitalizări şi până la 5.000 de morţi. **(R. Mayon-White, 2005)**

Lucrarea işi propune să studieze evoluţia TIA înregistrate în Judeţul Iaşi în intervalul 2004-2008, după formele de manifestare ale procesului epidemiologic, caracteristici privind evoluţia sezonieră, grupele de vîrstă afectate, agentul etiologic şi alimentul incriminat.

MATERIAL ŞI METODĂ

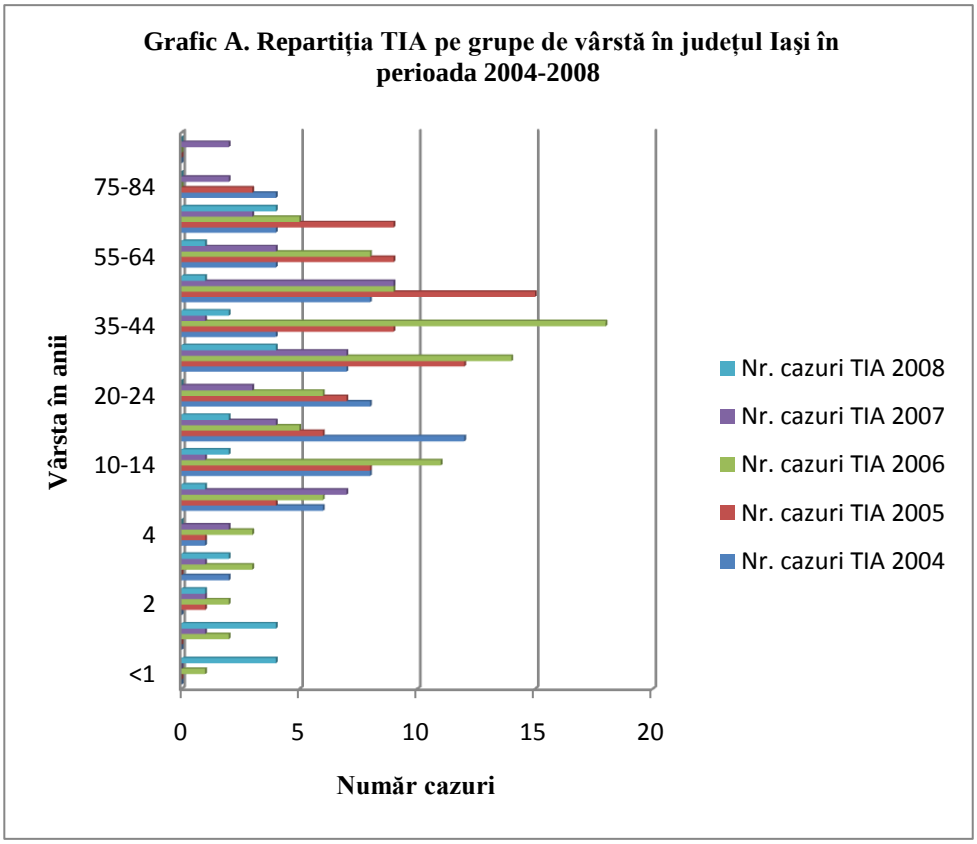
Valorile numerice ale datelor primare sunt prezentate pentru analiză sub formă de tabele şi grafice. Astfel am utilizat tabele cu dublă intrare şi histograme. **(Savuţa Gheorghe, 2007)** Datele statistice prezentate în lucrare au fost preluate din baza de date a Biroului de Epidemiologie (Registrul de Evidenţă Nominală a cazurilor de TIA, Dările de Seamă Statistice Anuale, Anchetele Epidemiologice ale focarelor înregistrate) din cadrul Autorităţii de Sănătate Publică Iaşi şi datele din foile de observaţie ale cazurilor internate în clinica de Boli Infecţioae Iaşi în perioada 2004-2008.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabelul 1 este prezentat numărul cazurilor de TIA în judeţul Iaşi în perioada 2004-2008. Analiza acestor date arată că, în judeţul Iaşi, pe perioada luată în studiu, în prima parte a intervalului (anii 2004-2006), numărul cazurilor a crescut de la an la an (de la 68 la 93 de cazuri). În următorii doi ani tendinţa generală a fost de scădere, ajungând la 28 de cazuri în 2008.

Tabelul nr.1
Numărul cazurilor de TIA în Judeţul Iaşi în perioada 2004-2008

Mediu	2004	2005	2006	2007	2008	Total
Urban	35	34	38	12	12	131
Rural	33	50	55	36	16	190
Total	68	84	93	48	28	321



În Grafic A este prezentată repartiţia TIA pe grupe vârstă în diferiţi ani. Astfel, analiza repartiţiei TIA în perioada 2004 - 2008 după vârstele bolnavilor evidenţiază o predominanţă a îmbolnăvirilor la adulţii din grupa de vârstă 25 - 64 ani, urmată de grupa 15- 24 de ani şi grupa 5 - 14 ani, numărul cel mai mic de cazuri fiind înregistrat la grupa 1- 4 ani şi la grupa >85 ani.

În anu 2004 s-au înregistrat 68 cazuri din care 38 cazuri sporadice şi 8 focare cu 30 de cazuri. Investigaţiile bacteriologice ale celor 8 focare de TIA înregistrate în 2004 au evidenţiat implicarea speciei

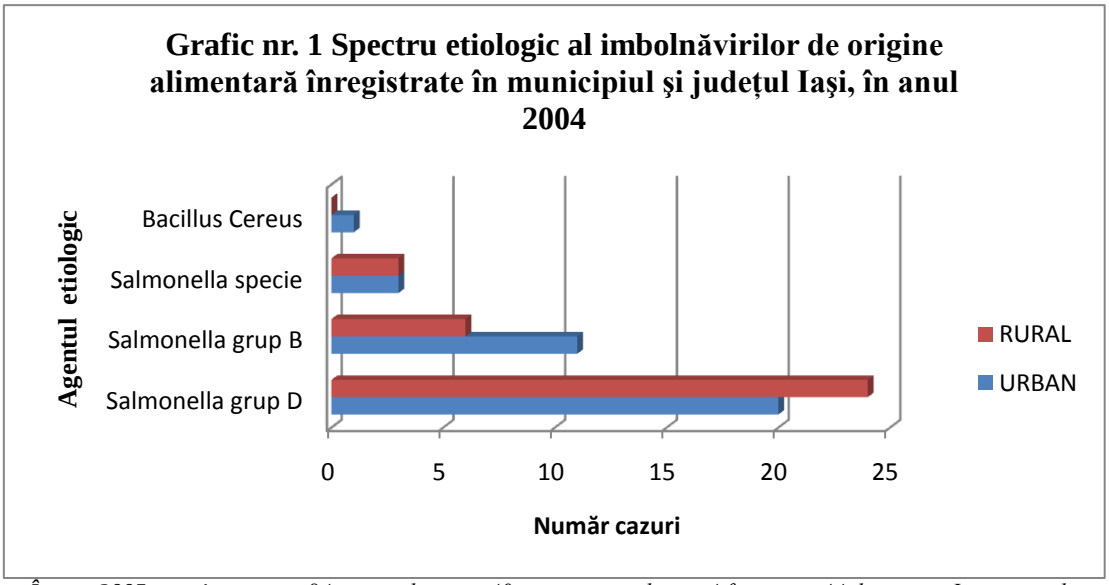
Salmonella grup D în patru dintre acestea, *Salmonella grup B* în două şi 2 focare cu *Salmonella typhimurium* şi *Salmonella spp*. (Tabelul nr. 2)

În ceea ce priveşte agentul etiologic responsabil de producerea TIA în anul 2004 (Grafic nr.1), se constată identificarea speciei *Bacillus cereus* într-un singur caz de îmbolnăvire, în rest fiind vorba de genul *Salmonella*; pentru 6 cazuri diagnosticul etiologic a fost limitat la identificarea speciei *Salmonella spp.*, de la 44 de bolnavi (65%) s-a izolat *Salmonella grup D* (20 de cazuri din Iaşi si 24 din mediu rural) şi în 17 (25%) din cazuri *Salmonella grup B* (11 tulpini izolate la pacienţi din mediu urban şi 6 la pacienţi din mediu rural).

Tabelul nr.2

Focare înregistrate în judeţul Iaşi în anu 2004

Tip focar/mediu	Luna debutului	Număr cazuri	Agentul etiologic	Alimentul incriminat
Familial/rural	Mai	2	Salmonella gr.B	Prăjitură cu frişcă comerţ
Familial/rural	Iunie	5	Salmonella gr.D	Necunoscut
Familial/urban	Iulie	2	Salmonella gr.B	Maioneză, Îngheţată
Familial/urban	August	3	Salmonella typhimurium	Preparate de carne
Consum colectiv (parastas)/rural		10	Salmonella gr.D	Ciorbă de perişoare, ardei umpluţi,etc.
Familial/urban	Septembrie	3	Salmonella spp.	Maioneză
Familial/urban		4	Salmonella gr.D	Mici
Familial/urban		1	Salmonella gr.D	Conservă carne de vită



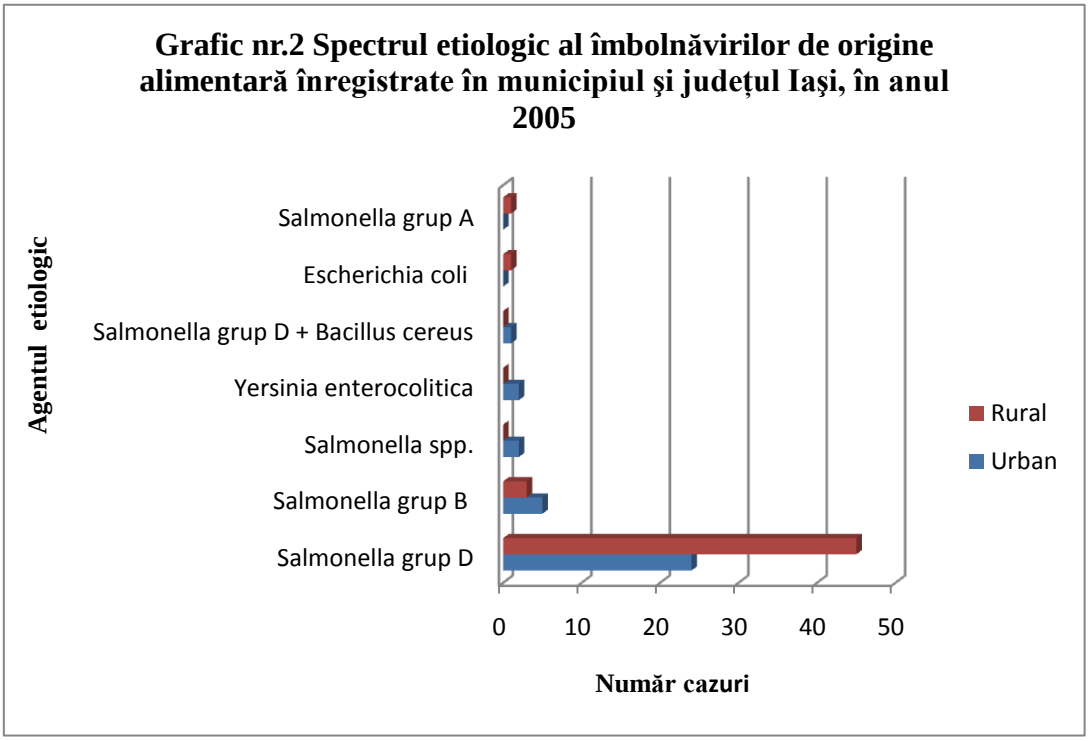
În anu 2005 s-au înregistrat 84 cazuri din care 40 cazuri sporadice şi 4 focare cu 44 de cazuri. Investigatiile bacteriologice ale celor patru focare de TIA înregistrate în 2005 au evidentiat implicarea speciei Salmonella enteritidis în trei dintre acestea şi a specie Salmonella typhimurium într-un singur focar. (Tabelul nr.3)

Tabelul nr.3

Focare înregistrate în judeţul Iaşi în anu 2005

Tip focar/mediu	Luna debutului	Număr cazuri	Agentul etiologic	Alimentul incriminat
Familial/urban	Iunie	2	Salmonella typhimurium	Necunoscut
Familial/rural	Iulie	2	Salmonella enteritidis	Necunoscut
Familial/rural	August	6	Salmonella enteritidis	Produse patiserie
Consum colectiv (parastas)/rural		34	Salmonella enteritidis	Carne şi preparate din carne

În ceea ce priveşte agentul etiologic responsabil de producerea TIA în anul 2005 (Grafic nr.2), se constată identificarea de *Escherichia coli, Salmonella grup D+Bacillus cereus* în câte un caz de îmbolnăvire, *Yersinia eneterocolitica* în 2 cazuri de îmbolnăvire, în rest fiind vorba de genul *Salmonella*; pentru 69 (82%) cazuri diagnosticul etiologic a fost limitat la identificarea speciei *Salmonella grup D*, de la 8 (10%) bolnavi s-a izolat *Salmonella grup B*, la 2 din cazuri s-a identificat *Salmonella spp*. şi la un singur caz *Salmonella grup A*.



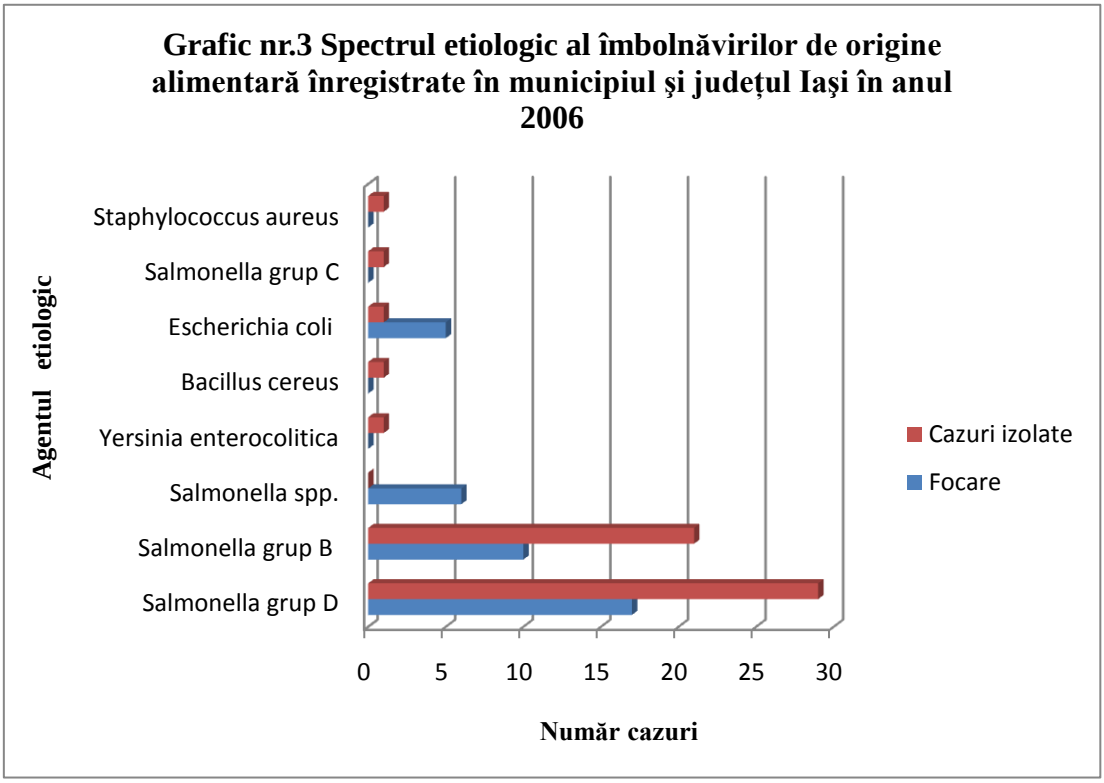
În anu 2006 s-au înregistrat 93 cazuri din care 55 cazuri sporadice şi 9 focare cu 38 de cazuri. Investigatiile bacteriologice ale celor 9 focare de TIA înregistrate în 2006 au evidenţiat implicarea speciei *Salmonella grup D* în 4 dintre acestea, urmată de *Salmonella* grup B în 3 focare şi 2 focare cu *Salmonella spp.* respectiv *Escherichia coli* . (Tabelul nr.4)

Tabelul nr.4

Focare înregistrate în judeţul Iaşi în anu 2006

Tip focar/mediu	Luna debutului	Număr cazuri	Agentul etiologic	Alimentul incriminat
Familial/urban	Ianuarie	7	Salmonella gr.D	Maioneză
Familial/rural	Iunie	3	Salmonella gr.B	Ouă
Familial/rural	Iunie	5	Salmonella gr.B	Preparate de carne
Familial/rural	Iunie	6	Salmonella spp.	Preparate de carne
Familial/rural	Iulie	5	Escherichia coli	Maioneză
Familial/rural	Iulie	3	Salmonella gr.D	Preparate de carne
Familial/urban	August	2	Salmonella gr.B	Preparate de carne
Familial/urban	Septembrie	2	Salmonella gr.D	Ouă
Familial/rural	Decembrie	5	Salmonella gr.D	Maioneză

Majoritatea agenţilor etiologici responsabili de producerea TIA în anul 2006 (Grafic nr.3) sunt din genul *Salmonella: Salmonella spp.* s-a identificat în 6 cazuri, *Salmonella grup B* în 31 (33%) de cazuri, *Salmonella grup C* într-un singur caz şi *Salmonella grup D* în 46 (50%) de cazuri. Alţi agenţi etiologici identificaţi au fost *Escherichia coli* (6 cazuri*), Staphylococcus aureus* (1 caz), *Bacillus cereus* (1 caz) şi *Yersinia enterocolitica* (1 caz)**.**



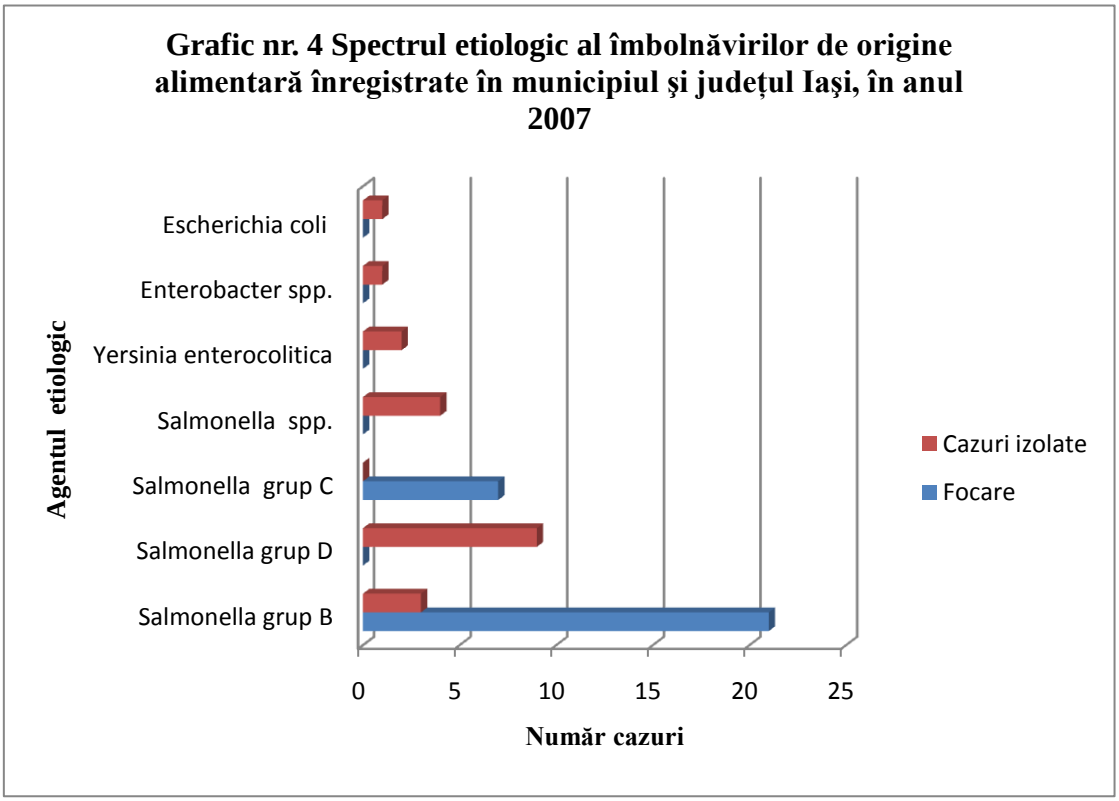
În anu 2007 s-au înregistrat 48 cazuri din care 20 cazuri sporadice şi 3 focare cu 28 de cazuri. Investigatiile bacteriologice ale celor 3 focare de TIA înregistrate în 2007 au evidenţiat implicarea speciei *Salmonella typhimurium* în două focare şi a speciei *Salmonella* grup C într-un singur focar. (Tabelul nr. 5

În cazul îmbolnăvirilor de origine alimentară înregistrate în municipiul şi judeţul Iaşi, în anul 2007, s-a identificat specia *Salmonella grup B* la 24 (50%) de cazuri, *Salmonella grup D* la 9 (19%) cazuri, *Salmonella grup C* la 7 (15%) cazuri, *Salmonella spp.* la 4 (8%) cazuri, *Yersinia enterocolitica* la 2 cazuri şi *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.* la câte un caz. (Grafic nr.4)

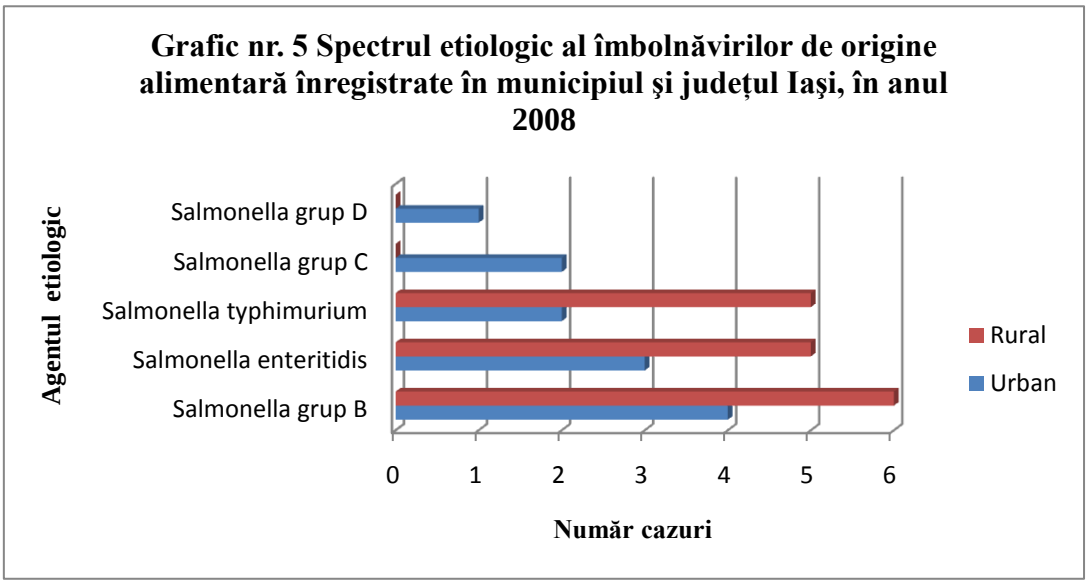
Tabelul nr. 5

Focare înregistrate în judeţul Iaşi în anu 2007

Tip focar/mediu	Luna debutului	Număr cazuri	Agentul etiologic	Alimentul Incriminat
Familial/rural	August	6	Salmonella gr.C	Preparate de carne
Consum colectiv (parastas)/rural	Iulie	10	Salmonella typhimurium	Coliva
Consum colectiv (nuntă)/rural	Iulie	12	Salmonella typhimurium	Preparate de carne



Agenţii etiologici incriminaţi în toxiinfecţii alimentare în anul 2008 sunt din genul Salmonella (Grafic nr.5), înregistrându-se astfel 10 (36%) cazuri cu specia *Salmonella grup B*, 8 (28%) cazuri cu specia *Salmonella enteritidis*, 7 cazuri cu specia *Salmonella typhimurium*, iar cazurile de *Salmonella grup C* şi *Salmonella grup D* au fost în număr redus (2 cazuri, respectiv 1 caz).



CONCLUZII

1. Din cele 321 de cazuri de TIA înregistrate în judeţul Iaşi în perioada de studiu 131 (40,8%) au fost înregistrate în mediu urban şi 190 (59,2%) în mediu rural.

2. Repartiţia TIA după vârstele bolnavilor evidenţiază o predominanţă a îmbolnăvirilor la adulţii din grupa 25-64 ani, numărul cel mai mic de cazuri fiind înregistrat la grupa 1- 4 ani şi la grupa > 85 ani.

3. Analiza numărului de focare raportate pe luni arată faptul că cele mai multe focare au fost raportate în lunile iunie şi august.

4. Alimentele incriminate în TIA au fost carnea şi preparatele din carne, ouă şi preparatele din ouă (maioneză, creme, îngheţate), produsele de patiserie.

5. În anul 2004 au fost înregistrate în focare 30 de cazuri de TIA dintre care o treime au provenit din focare de tip consum colectiv, iar în anii 2005 şi 2007, 77% din cazurile de TIA înregistrate în focare s-au produs in urma consumului colectiv de alimente contaminate, excepţie făcând anul 2006 în care nu s-au înregistrat focare de tip consum colectiv.

6. Agenţii patogeni izolaţi au fost preponderent din genul *Salmonella* (peste 90% din identificări) şi într-o proporţie mai redusă s-a identificat *Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Stafilococus aureus* şi *Bacillus cereus*.

7. Din genul *Salmonella*, specia *Salmonella grup D* (44%) şi specia *Salmonella grup B* (31%), au fost cel mai des implicate în producerea TIA.

BIBLIOGRAFIE

1. Dobre Bărzoi, Sergiu Meica, Marian Neguţ, 1999 – Toxiinfecţiile alimentare - Ed. Diacon Coresi, Bucureşti, pag. 770;
2. R. Mayon-White, 2005 – Re-emerging infections : Part 3 : Gastrointestinal and foodborne infections – British Journal of Infection Control 6; 11; pag. 11;
3. http://www.emedicinehealth.com/fod_poisoning/article_em.htm
4. Savuţa Gheorghe, 2007 – Epidemiologie Veterinară – Ed. Pim, Iaşi, pag. 16;

ASPECTE EPIDEMIOLOGICE PRIVIND PARATUBERCULOZA LA OVINE ŞI CAPRINE ÎN AREALUL JUDEŢULUI CLUJ

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS REGARDING SHEEP AND GOATS PARATUBERCULOSIS IN THE CLUJ COUNTY

PAPASTERGIU D.[1], RAPUNTEAN GH.[1], OLELEU ANAMARIA[2], RAPUNTEAN S.[1], PIVARIU N.[2]
[1]Universitate de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca
[2]DSVSA Cluj
grapuntean@usamvcluj.ro

Paratuberculosis in sheep and goats in the area of Cluj County has a sporadic-endemic pattern, evolving with subclinical forms detected only by serological tests; infection was detected in the sheep and rams before and after breeding. The screening was performed by ELISA technique (LSI Kit). In 2007, 31.955 blood samples were examined, being detected 410 positive cases, the annual prevalence was 1.28% and in 2008, 40,839 blood samples were examined, being detected 706 positive cases, the annual prevalence was 1.72%. From the total of 83 Veterinary District from County Cluj, in 2007 positive cases were detected in 55 (66.26%), and in 2008 in 56 (68.7%). Comparative analysis of data regarding the number and spatial spread of paratuberculosis outbreaks in sheep and goats (positive by serological screening) in the two years studied, will offer the appearance of the epidemiological spread from one year to another, in terms of extensivity and intensivity. To reduce the incidence of disease we should continuously apply the epidemic-surveillance by serological screening tests, the removal of positive testing confirmed animals by ELISA multispecies kit (Pourquier) and a more rigorous control of animal movements to reduce the possibilities of dissemination and propagation of the etiological agent.

Key words: paratuberculosis, sheep, goat, epidemiology

Paratuberculoza la ovine şi caprine a fost raportată în numeroase ţări, cu o răspândire spaţială variabilă de la o ţară la alta, în corelaţie cu densitatea populaţiei de rumegătoare mici, cu modul de creştere (sisteme la păşune sau sisteme intensive), dar şi cu prezenţa bolii la bovine sau la alte specii de rumegătoare sălbatice, dar şi non-rumegătoare, un rol deosebit de important fiind atribuit iepurilor (4, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14). Unele dintre aceste animale se îmbolnăvesc cu forme clinice sau subclinice de boală, devenind purtătoare şi eliminatoare active de germeni, pe când altele sunt doar purtătoare pasive, contribuind la contaminarea mediului şi la întreţinerea circuitelor epidemiologice (8, 12, 15, 16, 18).

Boala continuă să constituie o problemă pentru crescătorii de rumegătoare mici cărora le provoacă pierderi economice însemnate, pentru medicii veterinari de laborator în sensul dificultăţilor de diagnostic, cât şi în privinţa managementului ce vizează implementarea unor programe de profilaxie şi combatere eficace (1, 2, 5, 17).

Paratuberculoza este studiată şi din punct de vedere al importanţei sanitare, existând numeroase lucrări care consideră că boala Crohn la om (infecţie cronică intestinală) este produsă de *Mycobacterium paratuberculosis*, rezervorul animal constituind o sursă potenţială şi de risc pentru contaminarea oamenilor (3).

La nivelul judeţului Cluj există o populaţie importantă de animale receptive la paratuberculoză, reprezentată de bovine, ovine şi caprine domestice, cât şi populaţii de animale sălbatice (cerbi, căprioare, mistreţi, unele carnivore, iepuri) care pot juca rolul de rezervoare naturale pentru *Mycobacterium paratuberculosis.*

În lucrarea de faţă sunt prezentate aspectele epidemiologice privind paratuberculoza la micile rumegătoare în arealul judeţului Cluj, pe un interval de doi ani (2007 - 2008).

MATERIAL ŞI METODĂ

Conform Programului acţiunilor de supraveghere, prevenire şi control al bolilor la animale, al celor transmisibile de la animale la om, protecţia animalelor şi protecţia mediului, în anii 2007 şi 2008 în arealul judeţului Cluj, au fost examinate probe de sânge recoltate de la ovinele şi caprinele domestice în cadrul programului de supraveghere pentru paratuberculoză.

În vederea stabilirii răspândirii spaţiale s-au efectuat studii retrospective folosind datele înregistrate la DSVSA Cluj, fiind analizate numărul de probe prevăzute în programul strategic, examinate prin tehnica imunoenzimatică ELISA, recomandată pentru screening. În vederea caracterizarii aspectelor epidemiologice au fost alcătuite tabele, grafice şi cartograme, la următoarele categorii de animale: oi mame (examinate în perioada martie-iunie), berbeci de reproducţie înainte de montă (examinaţi în perioada iulie-august) şi berbeci de reproducţie după perioada de montă (examinaţi în perioada noiembrie-decembrie).

În anul 2007 s-a realizat examinarea unui număr de 31.955 probe, din care 15.658 provenite de oi-capre, 9451 provenite de la berbeci înainte de montă şi 6846 provenite de la berbeci după montă.

În anul 2008 s-au examinat un număr de 40.839 probe, din care 24.988 provenite de la oi mame, 9380 provenite de la berbeci de reproducţie (înainte de montă), şi 6471 provenite de la berbeci de reproducţie (după montă).

Fiecare probă de ser a fost testată cu trusa ELISA screening LSI KIT, după modelul o probă un godeu, plus godeurile cu serurile martor pozitiv şi negativ. Probele reacţionate pozitiv prin tehnica ELISA screening, au fost examinate ulterior cu trusa ELISA Pourquier pentru verificare anticorpi.

Reacţiile s-au efectuat conform protocoalelor de lucru specifice tehnicilor ELISA, recomandate de firmele producătoare, în ambele metodologii fiind prevăzută etapă de absorbţie cu *Mycobacterium phley* pentru eliminarea anticorpilor cross-reactanţi produşi de contactul cu micobacterii atipice.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În anul 2007 toate cele 31.955 probe prevăzute în programul de supraveghere, au fost examinate prin tehnica ELISA screening (LSI Kit), după modelul un godeu o proba. Rezultatul obţinut la probele de sânge examinate în anul 2007 sunt prezentate în tabelul nr. 1.

Tabel nr. 1
Rezultatul probelor examinate prin ELISA screening în anul 2007

Categoria de animale	Perioada de examinare	Total probe examinate	Probe pozitive	
			Nr.	%
Ovine-caprine	martie-iunie	15.658	198	1.26
Berbeci de reproducţie (înainte de montă)	iulie-august	9451	97	1.02
Berbeci de reproducţie (după montă)	noiembrie-decembrie	6846	115	1.67
Total probe examinate/pozitive		31.955	410	1.28

În cazul oilor mame, au fost examinate în perioada martie-iunie, un număr total de 15.658 probe, fiind depistate ca pozitive un număr de 198 (1.26%). În cazul berbecilor de reproducţie, examinaţi înainte de montă, au fost analizate 9.451 probe, fiind identificate ca pozitive 97 (1.02%), iar în cazul berbecilor investigaţi după montă, au fost examinate 6.846 probe, reacţionând pozitiv un număr de 115 (1.67%).

În anul 2008 cele 40.839 probe prevăzute în programul de supraveghere, au fost examinate prin tehnica ELISA screening (LSI Kit), după modelul un godeu o probă. Rezultatul obţinut la probele de sânge examinate în anul 2008, sunt prezentate în tabelul nr. 2.

Tabel nr. 2
Rezultatul probelor examinate prin ELISA screening în anul 2008

Categoria de animale	Perioada de examinare	Total probe examinate	Probe pozitive	
			Nr.	%
Oi mame	martie-iunie	24.988	385	1.54
Berbeci de reproducţie (înainte de montă)	iulie-august	9.380	229	2.44
Berbeci de reproducţie (după montă)	noiembrie-decembrie	6.471	92	1.42
Total probe examinate/pozitive		40.839	706	1.72

În cazul oilor mame, au fost examinate în perioada martie-iunie, un număr total de 24.988 probe, fiind depistate ca pozitive un număr de 385 (1.54%). În cazul berbecilor de reproducţie, examinaţi înainte de montă, au fost analizate 9.380 probe, fiind identificate ca pozitive 229 (2.44%), iar în cazul berbecilor investigaţi după montă, au fost examinate 6.471 probe, reacţionând pozitiv un număr de 92 (1.42%).

Prevalenţa anuală a paratuberculozei în urma depistării prin tehnica ELISA screening, în cei doi ani studiaţi, a fost de 1,28% în anul 2007 şi de 1,72% în anul 2008 (graficele din fig. 1).

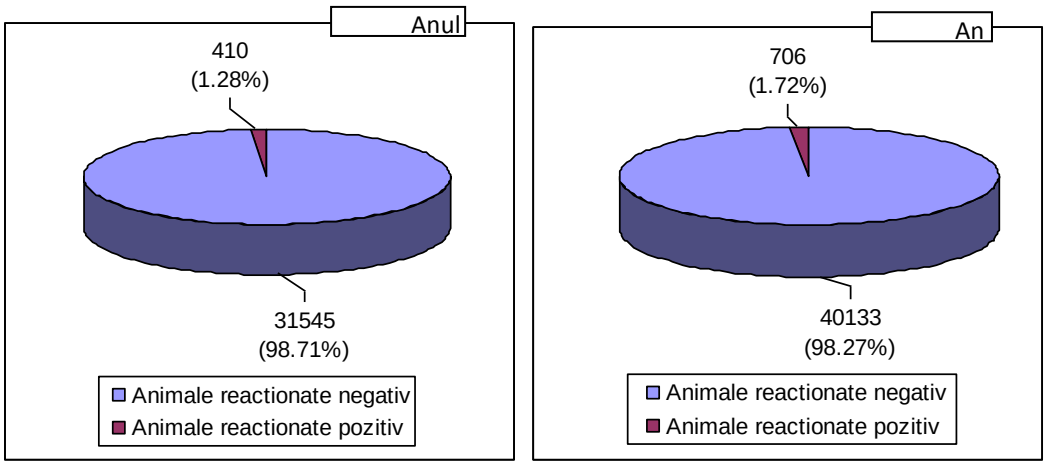


Fig. 1 - Reacţii pozitive la ELISA screening

Analizând distribuţia spaţială a focarelor, atât în anul 2007 cât şi în anul 2008, s-a constatat că acestea sunt răspândite neuniform pe suprafaţă judeţului, existând zone cu o densitate mai scăzută (mai puţin de 10 cazuri/circumscripţie), dar şi zone cu o densitate mai crescută (mai mult de 10 cazuri/circumscripţie). Aspectele comparative sunt redate în cartogramele din fig. 2.

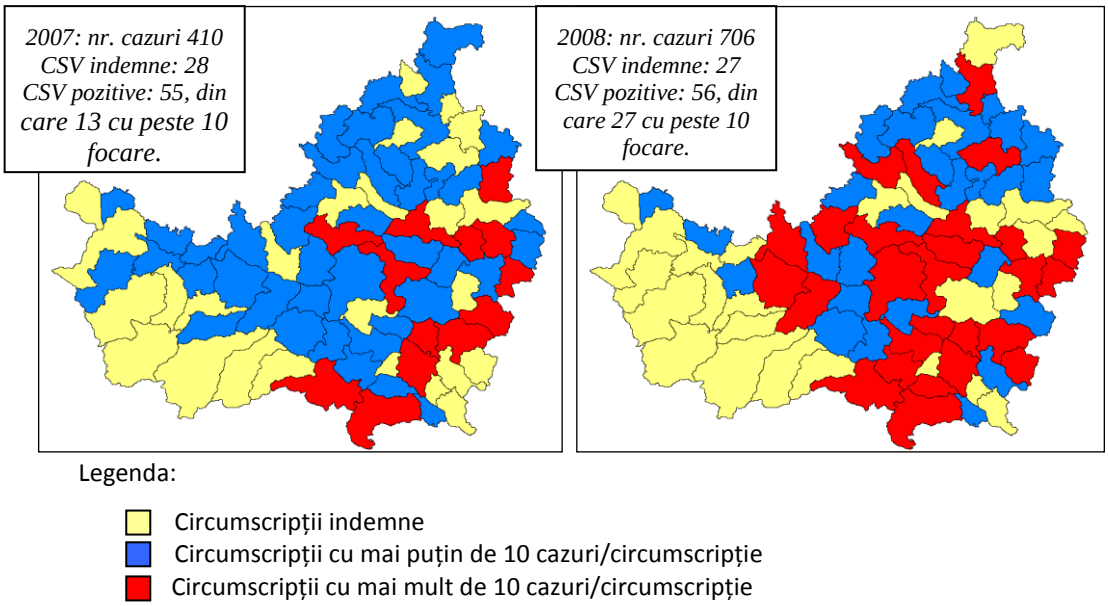


Fig. 2 - Aspecte comparative privind răspândirea spaţială a focarelor în anii 2007 şi 2008

Observând amplasarea pe cartograme a CSV cu un număr mai mare de cazuri, respectiv focare, s-a putut constata o zonare a acestora, care grupează mai multe circumscripţii învecinate sau apropiate. Analizând relaţiile de vecinătate dintre aceste circumscripţii, se poate observa că acestea apar grupate, alcătuite din 2 la 6 circumscripţii care se învecinează direct. Această apropiere presupune existenţa unor relaţii între efectivele de ovine din circumscripţiile respective, având loc schimburi sau cumpărări de animale, fiind sporite şi posibilităţile de diseminare a agentului etiologic sau existenţa unor surse intens contaminate şi persistente.

Analizând comparativ răspândirea spaţială a circumscripţiilor cu cazuri pozitive şi a celor indemne pe cartogramele întocmite, s-a putut observa unele diferenţe între cei doi ani studiaţi, mai puţin în privinţa distribuţiei spaţiale, cât mai ales în privinţa amplificării procesului epidemiologic, fenomen reflectat în creşterea numărului de cazuri pozitive. Dacă în anul 2007 au existat doar 13 circumscripţii în care s-au depistat mai mult de 10 cazuri pozitive/circumscripţie, în anul 2008 numărul acestora a fost mult mai crescut ajungând la 27.

Se poate constata că distribuţia teritorială a circumscripţiilor indemne şi a celor cu cazuri pozitive serologic, s-a menţinut la valori apropiate în cei doi ani studiaţi, diferenţa numerică fiind doar de o circumscripţie în plus în 2008 faţă de 2007. Din numărul total de 83 de circumscripţii existente pe raza judeţului Cluj, în anul 2007 s-au depistat cazuri pozitive în 55 (66.26%) şi au fost indemne 28 (33,73%), iar în anul 2008 s-au depistat cazuri pozitive în 56 (67.46%) şi indemene 27 (32.53%). Aspectele comparative privind circumscripţiile cu cazuri pozitive la testul ELISA screening şi circumscripţiile indemne sunt redate în imaginile de mai jos (graficele din fig. 2).

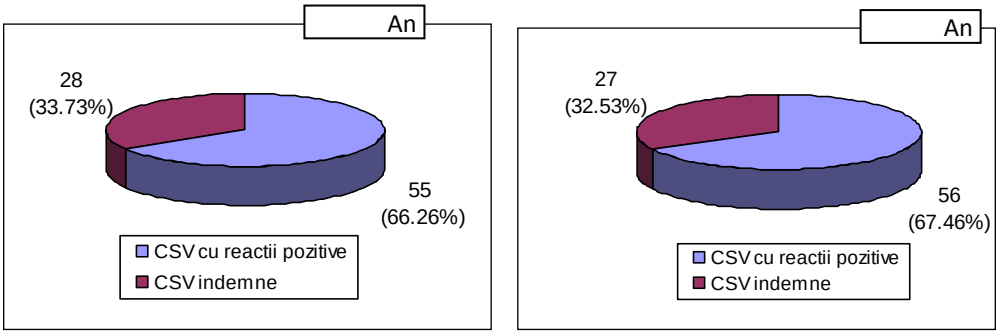


Fig. 2 - CSV cu reacţii pozitive şi CSV indemne

Examenul de confirmare a probelor depistate ca pozitive prin testul ELISA screening, efectuat cu trusa ELISA multispecie Porquier, a condus la obţinerea următorelor rezultate: în anul 2007 din cele 410 probe pozitive, au fost confirmate ca pozitive 336 (81,95%), dubioase 30 (7,31%) şi negative 44 (10,73%), iar în anul 2008 din cele 706 probe pozitive, au fost confirmate ca pozitive 517 (73,22%), dubioase 120 (16,99) şi negative 69 (9,77%) (tabelul nr. 3). Din datele prezentate se poate observa că nu toate reacţiile pozitive obţinute la ELISA screening se menţin pozitive la ELISA confirmare. De aici rezultă necesitatea efectuării examenului de confirmare, folosind truse ce au o valoare ridicată privind sensibilitatea şi specificitatea pentru a elimina eventualele erori (reacţii fals pozitive) provocate de prezenţa unor micobacterii atipice.

Tabel nr. 3

Aspecte comparative privind răspândirea spaţială a CSV indemne şi pozitive

Anul	Nr. total de CSV	CSV indemne		CSV cu cazuri pozitive		Nr. total cazuri pozitive ELISA screening	Rezultat confirmare ELISA Pouquier					
							Pozitive		Dubioase		Negative	
		Nr.	%	Nr.	%		Nr.	%	Nr.	%	Nr	%
2007	83	28	33.73	55	66.26	410	336	81.95	30	7.31	44	10.7
2008	83	27	32.53	56	67.46	706	517	73.22	120	16.9	69	9.77

DISCUŢIA REZULTATELOR

În baza rezultaelor obţinute la screeningul serologic efectuat cu trusa ELISA LSI KIT, se poate preciza că paratuberculoza la micile rumegătoare în arealul judeţului Cluj, a avut o evoluţie sporadico-edemică, cu o prevalenţă anuală de 1.28% în anul 2007 şi de 1.72% în 2008, care poate fi considerată ca scăzută. Menţionăm că nu s-au constatat cazuri cu exprimare clinică a simptomelor, iar examenele de evidenţiere a agentului etiologic prin examene bacterioscopice din fecale au fost negative. Aceasta înseamnă că în ferme se întâlnesc numai cazuri cu evoluţie subclinică, cu formarea de efectori imuni umorali care pot fi depistaţi numai prin examene serologice.

În acest context epidemiologic, efectivele de ovine şi caprine din arealul judeţului Cluj, îşi menţin statutul de încadrare la categoria A, (exploataţii indemne, cu antecedente sau suspecte de boală), conform prevederilor din Programul acţiunilor de supraveghere, prevenire şi control a bolilor la animale. În consecinţă efectivele de ovine şi caprine în vârstă de peste 12 luni, sunt supuse în continuare supravegherii prin examene serologice, prin testare ELISA screening, cu fază de absorbţie, pe 5% din probele de sânge recoltate pentru examenul serologic pentru depistarea infecţiei cu *Brucella melitensis.*

Pe ansamblul judeţului s-a putut constata că au existat premizele unei circulaţii epidemiologice a agentului etiologic, fie prin schimburi de animale purtătoare şi eliminatoare, fie prin posibila intervenţie a unor rezervoare naturale (căprioare, iepuri, alte animale sălbatice), care intervin în mod ocazional prin contaminarea adăposturilor, a păşunilor sau a stocurilor de furaje.

Imaginea comparativă a datelor epidemiologice privind numărul şi amplasarea focarele de paratuberculoză la ovine şi caprine (pozitive prin depistaj serologic), în cei doi ani studiaţi, redă aspectul de propagare a procesului epidemiologic de la un an la altul, mai puţin ca extensivitate dar mult mai accentuat ca intensivitate. Se remarcă zonarea evidentă a circumscripţiilor cu un număr sporit de cazuri, respectiv focare, care cel mai adesea se învecinează unele cu altele, fiind favorizată difuzarea şi propagarea agentului etiologic. Aceasta înseamnă că se crează condiţii amplificatoare ale procesului epidemiologic vizând: sporirea surselor de contaminare, sporirea posibilităţilor de transmitere şi sporirea densităţii populaţiei receptive sau schimbarea structurii acesteia.

În consecinţă, se impune în continuare aplicarea măsurilor de epidemiosupraveghere prin screening serologic, de eliminare a animalelor depistate ca pozitive (verificate prin ELISA trusa de confirmare), dar şi un control mai riguros al mişcărilor de animale, al produselor de origine animală şi a furajelor, pentru a reduce posibilităţile de difuzare a agentului etiologic.

CONCLUZII

1. Paratuberculoza la ovine şi caprine la nivelul arealului Cluj, are un caracter sporadico-endemic, evoluând cu forme subclinice depistate numai prin examene serologice (ELISA screening), infecţia fiind depistată la categoria oi mame şi berbecii de reproducţie.

2. Din numărul total de 83 de CSV existente pe raza judeţului Cluj, în anul 2007 s-au depistat cazuri pozitive serologic în 55 (66.26%), iar în anul 2008 în 56 (67.46%), constatându-se o menţinere relativ constantă a circumscripţiilor contaminate.

3. Prin tehnica ELISA screening în anul 2007 au fost examinate 31.955 probe de sânge, fiind depistate pozitive 410 cazuri, prevalenţa anuală fiind de 1.28%, iar în anul 2008 au fost examinate 40.839 probe de sânge, fiind depistate ca pozitive 706 cazuri, prevalenţa anuală fiind de 1.72%.

4. Examenul de verificare a probelor depistate ca pozitive prin testul ELISA screening, efectuat cu trusa ELISA Pourquier (antibodies verification), a permis să se constate în anul 2007 că din cele 410 probe pozitive, au fost confirmate ca pozitive 336 (81,95%), dubioase 30 (7,31%) şi negative 44 (10,73%), iar anul 2008 din cele 706 probe pozitive, au fost confirmate ca pozitive 517 (73,22%), dubioase 120 (16,99) şi negative 69 (9,77%).

5. Se constată o sporire a numărului de cazuri pozitive de la un an la altul, îndeosebi a circumscripţiilor cu mai mult de 10 cazuri pozitive; dacă în 2007 acestea au fost în număr de 13, în în anul 2008 numărul acestora a ajuns la 27, fiind evidentă amplificarea procesului epidemiologic, favorizat îndeosebi de învecinarea circumscripţiilor contaminate.

6. Aceast mod de evoluţie se corelează cu realizarea unor condiţii dinamizatoare ale procesului epidemiologic, vizând sporirea surselor de contaminare (inclusiv rezervoare naturale), sporirea posibilităţilor de transmitere, dar şi existenţa unei populaţii receptive, care se reînoieşte anual sau se modifică structural, ca urmare a relaţiilor/schimburilor comerciale.

BIBLIOGRAFIE

1. Bush R. D., Windsor P. A., Toribio J., 2005, Biological and financial losses due to ovine Johne's disease in 12 infected flocks in Australia – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
2. Collins T. M., 1997, Mycobacterium paratuberculosis: A Potential Food-Borne Pathogen ? – J. Dairy Sci., 80, p. 3445-3448.
3. Chiodini R. J., 1989, Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease enteritis – Clin. Microbiol. Rev., 2, (1), p. 90-117.
4. Daniels M. J., Henderson D., Greig A., Stevenson K., Sharp J. M., Hutchings M. R., 2003, The potential role of wild rabbits Oryctolagus cuniculus in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants – Epidemiology and Infection, 130, p. 553-559.
5. Daniels M. J., Lees J.D., Hutchings M. R., Greig A., 2003, The ranging behaviour and habitat use of rabbits on farmland and their potential role in the epidemiology of paratuberculosis – The Veterinary Journal, 165, p. 248-257.
6. Daniels M. J., Hutchings M. R., Allcroft D. J., McKendrick L. J., Greig A., 2002, Risk factors for Johne's disease in Scotland – the results of a farmer survey – The Veterinary Record, 150, p. 135-139.
7. Estevez-Denaives I., Chávez-Gris G., Hernández-Castro R., Pavlik I., Bartos M., 2005, RFLP identification of Mycobacterium avium, subsp. paratuberculosis isolated from smal ruminants of Mexico - 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
8. Florou M., Leontides L., Kostoulas P., Billinis C., Sofia M., Kyriazakis I., Lykotrafitis F., 2007, Isolation of Mycobacterium avium, subsp. paratuberculosis from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the patures of Greek sheep and goats – Epidemiol. Infec., 1-9.
9. Fraquelli C, Bregoli M, Carpi G, Ostanello F, Pasolli C, Pozzato N, Rosati S., 2005, Epidemiology of paratuberculosis in two red deer (Cervus elaphus) populations of Trentino
10. (Northern Italy) – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
11. Greig A., Beard P.M., Daniels M. J., Henderson D., Hutchings M. R., Stevenson K., 2002, The potential role of wildlife in the epidemiology of paratuberculosis in domestic animals – Congress: The Association of Veterinary Techears and Research Workers (AVTRW) Current Topics in Veterinary Science, Scarborough, UK, 25th-27th March 2002.
12. Greig A., Stevenson K., Perez V., Pirie A. A., Grant J. M., Sharp J. M., 1996, Paratuberculosis in wild rabbits (Oryctolagus cuniculus) – The Paratuberculosis Newsletter, 8, (2), p. 32.
13. Ikonomopoulos J. A., 2006, Evidence that sheep and goats are a reservoir for mycobacteria in Greece - Online Journal of Veterinary Reserche, 10, (2), p. 162-176.
14. Judge J., Kyriazakis I., Greig A., Hutchings M. R., 2005, Spatial and temporal distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in rabbits & the environment – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
15. Judge J, Kyriazakis I, Greig A., Hutchings M. R., 2005, Routes of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis transmission in rabbits – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
16. Kopecna M, Lamka J, Trcka I, Moravkova M, Horvathova A, Literak I, Bartos M, Pavlik I., 2005, Atypical hosts and vectors of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
17. Sivakumar P., Singh N., Tripathi B. N., 2005, Pathology and diagnosis of paratuberculosis in water buffaloes (Bubalus bubalis). 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 2: Immunology, pathology and pathogenesis.
18. Stehman S. M., Shulaw P. W., 2002, Paratuberculosis (Johne's Disease) in Sheep and Goats. Recomandation for Diagnosis and Control –
19. http://goatconnection.com/articles/publish/article_128.shtml.
20. van Kooten H. C. J., Mackintosh C. G., Koets A. P., 2005, Intra-uterine transmission of paratuberculosis in farmed red deer – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.

CONSIDERAŢIUNI PRIVIND REZERVOARELE NATURALE DE *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* ŞI ROLUL LOR ÎN EPIDEMIOLOGIA BOLI

CONSIDERATION REGARDING *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* NATURAL RESERVOIRES AND THEIR INVOLVMENT IN DISEASE EPIDEMIOLOGY

PAPASTERGIU D., RAPUNTEAN GH., RAPUNTEAN S., NADAS G.
Universitate de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj Napoca
grapuntean@usamvcluj.ro

Paratuberculosis focus spreading and appearance in ruminants with no connection to the introduction of animals proceeded from disease focus lead to the idea that M. paratuberculosis can be hosted inside the body of wild ruminants, non-ruminants or inferior living considered as natural reservoirs. Some of these animals are presenting clinical or sub-clinical disease forms acting as germs carrier and eliminators, while others are passive carriers contributing to environment contamination and epidemiological circuit's up-keep. Among wild ruminants the disease was described at buffalo, reindeer, camel, gazelle, antelope, zebu, deer, bison, moufflon, llama, goat and ibex, for animals of wildlife, reservations and zoo. Most frequently the following species are mentioned: Cervus elaphus, Cervus dama, Capreolus capreolus, Ovis musimon, Oreamonus americanus, Odocoileus virginian and Axis porcinus. Among non-ruminants as atypical hosts are acting wild boar, fox, bear, mustelid species, rodents and lagomorphs. Microtus arvalis, Ratus norvegicus, Crocidura suaveolens weasel, polecat and forest mouse are also mentioned. Rabbits from species Lepus europeanus, Oryctolagus cuniculus, are also involved, germs isolation being realized from gut, testicles, uterus, placenta, fetuses, excreta and milk, considering the possibility of transmission both horizontally and vertical maintaining the disease in rabbit population. Birds from the species Corvus corax (crow), Corvus frugilegus (raven), Corvus monedula (jackdaw) might also interfere with the epidemic chain feeding with rodents or meat leftovers. Non-vertebrates could be potential vectors in germs transmitting not just on their surface but also via digestive tube passage. Larva of Eristalis tenax, adults' insects from Diptera genus and earthworm (Lumbricus terestris) are mentioned to be involved. Ruminants' paratuberculosis is difficult to be controlled due to the involvement in the disease epidemiology of ruminants and non-ruminants wild animals, birds and inferior living creating natural disease reservoirs maintaining and disseminating the causing agent.

Key words: Mycobacterium paratuberculosis, natural reservoires, epidemiology

INTRODUCERE

Paratuberculoza este o boală a rumegătoarelor, răspândită geografic peste tot în lume, cu o incidenţă spaţială variabilă în corelaţie cu densitatea populaţională, condiţiile de management, diversitatea rezervorului natural sau alţi factori care sporesc presiunea de contaminare. Boala continuă să constituie un subiect actual pentru numeroşi cercetători şi în acelaşi timp o problemă pentru crescătorii de animale cărora le provoacă pierderi economice însemnate. Odată cu izolarea unor tulpini de *M. paratuberculosis* de la primate subumane şi de la oameni cu „boala Crohn" paratuberculoza a început să capete şi o importanţă socială, cu impact asupra sănătăţii publice, fiind considerată o zoonoză (6, 7).

Paşi importanţi s-au făcut în cunoaşterea mecanismului patogenetic al bolii, al răspunsului imun umoral şi celular, al stării de hipersensibiliate, a îmbunătăţirii tehnicilor de diagnostic şi epidemiosupraveghere cât şi de imunoprofilaxie. S-a îmbunătăţit metodologia de izolare a bacilului paratuberculozei, folosind mediul cu ou Herold suplimentat cu micobactina J şi antibiotice (Herrold's egg-yolk medium), cât şi metodele de diagnostic, fiind utilizate tehnici ELISA, reacţia de fixare a complementului (RFC/CF), imunodifuzia în gel de agar (AGID), reacţia polimerazei în lanţ (PCR), fluorescenţa directă (IF),

determinarea interferonului gama (IFN-γ), electroforează pulsatorie în gel (PFGE) (pulsed-fild gel electrophoresis), analiza restricției edonucleazelor (restriction-endonuclease-analiysis), RFLP (15, 20, 38).

Dat fiind faptul că boala este în continuă extindere, devenind chiar emergentă în unele exploatații, cât şi a constatării că se permanentizează în unele areale sau apariția unor focare în lipsa unei contaminări prin introducerea de animale din ferme contaminate, cercetătorii şi-au îndreptat atenția în direcția cunoaşterii surselor de infecție reprezenate de alte categorii de animale non-rumegătoare, dar şi a unor viețuitoare inferioare.

Importanța bolii pentru animale, cât şi riscul zoonotic pe care îl prezintă este relevat şi de faptul că la nivel internațional s-au organizat manifestări ştiințifice care au avut ca obiectiv cunoaşterea diferitelor aspecte ale acestei boli. De asemenea se editează o publicație cu apariție bianuală „The Paratuberculosis Newsletter", care are ca obiectiv cunoaşterea şi difuzarea cunoştințelor privind această boală.

RECEPTIVITATE

Față de paratuberculoză sunt receptive mai multe specii de animale, însă o sensibilitate pronunțată o au bovinele, urmate de ovine şi caprine. Boala a mai fost descrisă la bivol, ren, cal, catâr, cămilă, gazelă, antilopă, zebu, cerb, bizon, lama, muflon: (31, 40, 38, 37, 41). Rasa şi sexul nu pare să joace vreun rol în receptivitate. Deşi paratuberculoza este considerată o boală a bovinelor, ovinelor şi caprinelor, toate rumegătoarele sunt susceptibile, atât cele domestice cât şi cele sălbatice. Mai mult chiar, semnalarea bolii la animale din grădini zoologice, la muflonul de Colorado, la caprele roşii, la bizonii americani şi la cerbii cu spinarea albă, face ca delimitarea acestei boli între rumegătoarele domestice şi cele sălbatice, să fie destul de dificilă.

Sub raportul vârstei se arată că sunt mai sensibile animalele tinere până la vârsta de 4 luni, dar boala se exprimă clinic la bovinele în vârstă de 2-5 ani şi rumegătoarele mici de 1-3 ani, când intervin diverşi factorii favorizanți. Se menționează că boala tinde să apară mai frecvent la tineret, la oi, capre, lame şi căprioare, comparativ cu bovinele la care îmbolnăvirile se exprimă clinic, mai frecvent, la animalele adulte.

În cadrul efectivelor puternic contaminate şi existența unei presiuni intense de contaminare în condiții de densitate sporită a animalelor în adăposturi sau în unele areale, se constată semne clinice la tineretul de 4-5 luni sau la animale de 10-15 ani. La capre infecția este mai frecventă la vârsta cuprinsă între 1–5 ani, cu o rată mai crescută la animalele mai vârstnice. În privința ovinelor se menționează că acestea cu cât sunt mai tinere, cu atât sunt mai sensibile la infecția cu bacilul lui Johne şi cu atât este mai scurtă perioada de incubație. La ovinele bolnave clinic, de regulă, infecția s-a produs în primele 30 de zile de viață.

În afară de rumegătoare, şi unele animale monogastrice (non-rumegătoare) şi păsări se pot infecta, fără a face boala clinic, acestea devenind rezervoare asimptomatice de germeni, constituind o amenințare pentru rumegătoarele receptive. Totodată se arată că unele viețuitoare inferioare pot găzdui în anumite perioade ale evoluției lor, specii de *Mycobacterium,* diversificând existența rezervoarelor şi sporind posibilitățile de contaminare.

SURSE DE INFECȚIE CU ROL DE REZERVORE NATURALE

Bacilul paratuberculozei este un germen obligatoriu parazit, fiind prezent în intestinul animalelor bolnave. Excreția de germeni se face, îndeosebi, de către animalele bolnave care elimină prin fecale cantități foarte mari de germeni, ducând la contaminarea mediului, fiind astfel amplificate posibilitățile de menținere şi difuzare a surselor de infecție (1), (2).

M. avium subsp. *paratuberculosis* a fost izolat de la un număr mare de specii de animale, inclusiv specii sălbatice non-rumegătoare, ceea ce sugerează că numărul acestor gazde este mult mai larg decât s-a

crezut până acum, fiind astfel demonstrat faptul că paratuberculoza este o boală cu focalitate naturală. În literatura de specialiate din ultimii ani, au apărut tot mai frecvent semnalări privind izolarea de tulpini de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* de la specii de animale non-rumegătoare, încercând a se clarifica importanţa acestora în epidemiologia bolii.

Sursele primare sunt reprezentate de animalele bolnave, precum şi cele cu infecţii inaparente, care elimină în mediul exterior cantităţi foarte mari de germeni prin materiile fecale. Eliminarea bacililor se face continuu sau intermitent în corelaţie cu intensitatea şi gravitatea leziunilor mucoasei intestinale. Eliminarea începe încă din timpul perioadei de incubaţie, cu 1-2 ani înainte de apariţia semnelor clinice. Se consideră că prin fecale se elimină 10^8 bacili/gram, ceea ce înseamnă 5 x 10^{12} bacili/zi (7). Bacilii pot fi eliminaţi şi prin lapte, urină, spermă, dar acestea au o importanţă redusă. Transmiterea intrauterină a fost demonstrată la căprioara roşie (*Red deer*) (34, 42).

Sursele secundare de infecţie sunt constituite de către toate elementele mediului extern contaminate, la nivelul cărora bacilii se conservă timp îndelungat. Germenul are o rezistenţă foarte mare faţă de agenţii fizici şi chimici, comparabilă cu a celorlalte micobacterii, fiind chiar mai rezistent în mediul ambiant, pe păşuni, pe furaje, în sol, unde poate supravieţui de la un an la altul.

În Spania, în urma efectuării un studiu epidemiologic complex privind izolarea de micobacterii au fost analizate probe provenite de la 16 specii de păsări (anseriforme, galiforme, columbiforme, falconiforme şi paseriforme) şi 13 specii de mamifere (artiodactile, carnivore, mustelide, lagomorfe şi rozătoare). Se menţionează izolarea a două tulpini de *M. paratuberculosis* de la un mistreţ şi o căprioară din aceeaşi areal şi alte 14 specii din genul *Mycobacterium* cu creştere rapidă (eugonică), unele dintre acestea fiind considerate ca patogeni oportunişti pentru oameni. Cu toate că numărul de tulpini de *M. paratuberculosis* izolate de la animalele din acest studiu este scăzut, consecinţele epidemiologice trebuie avute în vedere. Aceste animale infectate reprezintă o sursă de contaminare a mediului în care *M. paratuberculosis* persistă perioade îndelungate de timp, păstrându-şi capacitatea de a infecta noi gazde sănătoase (2).

Un rol important în menţinerea şi difuzarea bacilului Johne îl pot avea unele rumegătoare sălbatice. În acest sens mai mulţi cercetători, menţionează izolarea de *M. paratuberculosis* de la specii de rumegătoare sălbatice: *Cervus elaphus* (red deer), *Capreolus capreolus* (roe deer), *Cervus dama* (fallow deer) şi *Ovis musimon* (muflonul). Alţi cercetători menţionează izolarea de la alte rumegătoare sălbatice: *Ovis canadensis* (Rocky mountain bighorn sheep), *Oreamnos americanus* (Rocky mountain goat), (1, 5, 30), *Odocoileus virginianus* (white-tailed deer) (14); *Cervus elaphus nannodens* (tule elk) (8), *Axis porcinus* (hog dear) (39), *Bubalus bubalis* (bivol) (40).

Într-un studiu făcut în nordul Italiei în două areale diferite, se menţionează că din 399 căprioare examinate (*Cervus elaphus*) se reuşeşte izolarea germenului din fecale de la 201 cazuri, ceea ce demonstra o largă difuzibiliate a bacteriei în populaţia de căprioare examinate, cu o prevalenţă de 66% şi respectiv 18% în cele două sectoare, în zonă existând şi un număr mare de vite şi rumegătoare mici. Se subliniază riscul transmiterii infecţiei între animalele domestice şi cele sălbatice care pasc împreună pe păşunea contaminată. Se mai aminteşte şi faptul că în zona respectivă apar şi alte ungulate sălbatice (căprioare, capre, ibex), ca şi vulpi şi iepuri. Se analizează posibilul rol al fiecărei specii de animale sălbatice în epidemiologia paratuberculozei în ariile studiate (17).

O răspândire largă a infecţiei la căprioara roşie (*Cervus elaphus*) este semnalată şi în Noua Zeelandă. Incidenţa determinată prin testul ELISA (Paralisa™) a variat între 6 la 40%, rata leziunilor la animalele reacţionate a variat între 30 la 87% la animalele adulte. Se relevă capacitatea testului ELISA de a identifica şi selecta căprioarele infectate, atât cele tinere cât şi adulte (20).

Un studiu amplu efectuat în Cehia, a avut ca obiectiv clarificarea rolului gazdelor atipice şi vectorii care intervin în circuitul epidemiologic al bacilului *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Autorii au investigat prezenţa agentul cauzativ al paratuberculozei la rumegătoarele domestice şi sălbatice, ca şi prezenţa la diferite vertebrate şi nevertebrate. S-a examinat un total 3.078 vertebrate şi 8.489 nevertebrate: 40 iepuri din speciile *Lepus europaeus* şi *Oryctolagus cuniculus*, 149 mici mamifere terestre din diferite specii, 554 mistreţi (*Sus scrofa*), 77 bursuci (*Meles meles*), 3 nurci (*Lutra lutra*), 46 jderi (*Martes foina*), 78 vulpi (*Vulpes*

vulpes), 5 lupi (*Canis lupus*), 13 urşi (*Ursus arctos*), 2.113 păsări de diferite specii, 36 larve din familia *Tabanidae* şi *Eristalis tenax*, 7.791 diptere adulte, 229 adulte *Coleoptera* şi 433 râme. În urma cercetărilor efectuate se menționează că *Mycobacterium paratuberculosis* a fost izolat de un iepure, un şoarece de câmp (*Microtus arvalis*), un şobolan (*Rattus norvegicus*), un şobolan cu bot ascuțit (*Crocidura suaveolens*), doi mistreți, un urs, trei larve de *Eristalis tenax*, patru adulți din ordinul *Diptera* şi o râmă (*Lumbricus terrestris*). Tulpinile izolate de la şapte nevertebrate, de la iepure şi urs au fost analizate prin metoda standardizată IS900 RFLP. Tulpinile de *Mycobacterium paratuberculosis* izolate de la nevertebrate erau identice tipului B-C1, ca şi cele izolate de la vitele infectate din ferme. Tipul izolat de la iepure a fost B-C9, iar cel de la urs E-C1. Cercetările sugerează că diferite vertebrate infectate pot fi considerate ca gazde atipice şi vectori, chiar rezervoare de *M. paratuberculosis*. Nevertebratele pot fi potențiali vectori în transmiterea germenului, nu numai pe suprafața lor, dar chiar şi prin trecerea germenului prin tubul digestiv (30).

Alte studii arată că boala este prevalentă în fermele de căprioare (*Cervus elaphus, Cervus dama, Capreolus capreolus, Dama dama*) şi mufloni (*Ovis musimon*), precizându-se că animalele sălbatice rumegătoare şi non-rumegătoare pot fi vectori şi un factor important de risc în răspândirea infecției cu *M. paratuberculosis* (32, 33). La căprioara roşie (*Cervus elaphus*) s-a izolat *Mycobacterium paratuberculosis* tipul B-C1 din lichidul amniotic, ceea ce presupune transmiterea intrauterină şi prin lapte, constituind un suport al infecței postnatale (34, 42). Toate aceste aspecte au determinat conceperea şi aplicarea unor programe de epidemiosupraveghere pe probe de fecale pentru depistarea bovinelor care sunt purtătoare, iar cele pozitive să fie eliminate din efectiv (36).

Într-un studiu efectuat în Grecia, se menționează că oile şi caprele pot constitui rezervor pentru micobacterii. Scopul studiului a constat în evaluarea răspândirii tuturor micobacteriilor patogene majore în sângele oilor şi caprelor dintr-o zonă cu potențial predominant agricolă, utilizând PCR pentru detecția şi identificarea ADN aparținând complexului *M. tuberculosis, M. avium* subsp. *avium* şi *M. avium* subsp. *paratuberculosis.* Probe de sânge heparinate au fost colectate de la 408 oi şi capre (291 oi şi 117 capre) alese randomizat din 30 de turme (19 de oi şi 11 de capre), din 3 districte (Thesportias, Trikalon, Karditsas). Se arată că 21% din probele de sânge şi 90% din turmele de oi şi capre incluse în acest studiu, au reacționat pozitiv la PCR. În detaliu 5,6%, 3,9% şi 11,5% dintre animale şi 46,6%, 40% şi 60% din ferme au permis amplificarea inserției elementelor IS900 pentru *M. avium* subsp. *paratuberculosis,* IS1245 pentru *M. avium* subsp. *avium* şi IS6110 pentru *M. tuberculosis.* Rezultatele studiului arată că populația locală de rumegătoare mici, poate fi tolerantă la anumite tipuri de infecții micobacteriene, dar care nu manifestă semne clinice de boală. Din acest motiv se apreciază ca oportun de a considera oile şi caprele ca rezervor pentru micobacterii, ceea ce impune supravegherea lor în cadrul programului de control ce se aplică în Grecia (24).

Se menționează rolul important jucat de animale sălbatice non-rumegătoare şi păsări prădătoare în epidemiologia paratuberculozei. Asemenea animale se contaminează prin consum de resturi contaminate din ferme sau de iepuri, devenind purtătoare şi eliminatoare. Autorii au reuşit să izoleze *M. paratuberculosis* de la vulpi (23/27), nevăstuici/stoats (17/37), dihori/weasels (2/4), şobolani/rats (3/35), şoareci de pădure/wood mouse (3/88), iepure de câmp/hare (1/6), ciori/crow (*Corvus corax*) (36/60), corbi/rooks (*Corvus frugilegus*) (3/53), stăncuța/jackdaw (*Corvus monedula*) (1/38). La examenul anatomopatologic efectuat la vulpi (12/26), nevăstuici (1/13), dihori (2/4) şi ciori (1/60) s-au constatat leziuni corespunzătoare celor din paratuberculoză. Se menționează că rezultatul a fost negativ pentru şoareci de galerie/bank voles (*Clethrionomys glareolus*), şoarecei de casă (*Mus musculus*), porumbei de pădure (*Columba palumbus*) şi vrăbii de casă (*Passer domesticus*). În baza acestui studiu se consideră că iepurii au cel mai ridicat potențial în epidemiologia paratuberculozei pentru animalele de fermă receptive (19).

Rolul unor specii de animale sălbatice non-rumegătoare în epidemiologia paratuberculozei este subliniat şi de alți cercetători, un rol deosebit de important fiind atribuit iepurilor. Aceştia devin un important rezervor şi sursă de contaminare mai ales pentru bovinele crescute în sistemul de păşunat liber. În acest context transmiterea fecal-orală devine modalitatea cu cel mai mare risc pentru contaminarea bovinelor (21, 23, 29). Conform unui studiu efectuat pe o perioadă de un an de zile (aprilie 2002 – mai 2003),

privind distribuţia spaţială şi temporală a *M. paratuberculosis* la iepuri, se arată că prevalenţa a fost de 39,7%. Distribuţia temporală a infecţiei a urmat un model ciclic, cu un pic de primăvară (55,4%) şi o scădere toamna (19,4%). Alte studii menţionează riscul transmiterii inter-specii, ce se amplifică spaţial atunci când iepurii se aglomerează în mediu, şi se evidenţiază prevalenţa speciei *M. paratuberculosis* la iepuri în două areale în care paratuberculoza la rumegătoarele domestice era persistentă. Se arată, de asemenea, că infecţia a fost prevalentă în ambele areale, fiind de 39,7% şi respectiv 23,0%. *Mycobacterium paratuberculosis* a fost izolat din intestin, testicule, uter, placentă, fetuşi, fecale şi lapte. Se subliniază izolarea bacilului paratuberculozei de la iepurii sălbatici (*Oryctolagus cuniculus*) din urină şi fecale. Transmiterea verticală şi/sau pseudo-verticală a fost depistată la 19,6% subliniindu-se izolarea bacteriei din organele reproductive, fetuşi, placentă şi lapte de la specii sălbatice non-rumegătoare. Posibilitatea transmiterii bacteriei pe căile verticală, pseudoverticală şi orizontală în interiorul populaţiei de iepuri, contribuie la menţinerea infecţiei cu *M. paratuberculosis* în astfel de populaţii şi prin urmare şi a mediului. Se subliniază că rata de ingestie a gazdelor receptive este proporţională cu nivelul de contaminare a mediului şi densitatea iepurilor. Oile evită mai bine fecalele iepurilor în timpul păscutului comparativ cu vitele, fiind astfel sporit riscul de contaminare pentru acestea. În consecinţă se arată că iepurii nu trebuie ignoraţi ca posibilă sursă de infecţie pentru paratuberculoză (18, 25, 26, 27).

În urma unor studii făcute în Scoţia se precizează că există un număr mare de animale sălbatice non-rumegătoare, îndeosebi iepuri, care joacă un rol important în contaminarea păşunilor, cât şi a depozitelor de furaje, constituind un risc major în apariţia paratuberculozei la rumegătoarele domestice. Se mai subliniază faptul că diseminarea germenului este favorizată de răspândirea bălegarului pe păşune şi contaminarea surselor de apă care se realizează cu uşurinţă. Se mai incriminează ciorile, fără ca rolul acestora să poată fi stabilit foarte clar. Din studiul efectuat s-au identificat trei factori de risc, care trebuie controlaţi pentru a reduce riscul apariţiei îmbonăvirilor: supravegherea surselor de apă, controlul iepurilor şi evitarea răspândirii de bălegar pe păşuni. Se propune reducerea numărului de iepuri pentru a diminua riscul contaminării păşunilor (4, 12).

Alte studii menţionează izolarea de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* de la specii de lagomorfe, canide, mustelide, corvide şi muride, fiind subliniat rolul acestor animale sălbatice non-rumegătoare în epidemiologia paratuberculozei rumegătoarelor. Se precizează că în condiţiile de mediu din agricultură rumegătoarele domestice pot veni în contact cu animalele sălbatice şi/sau cu excretele lor, care contaminează iarba sau furajele din depozite favorizând transmiterea interspecii. Se subliniză că paratuberculoza rumegătoarelor este dificil de controlat, din cauza participării animalelor sălbatice non-rumegătoare în epidemiologia bolii Se concluzionează că animalele sălbatice şi în particular iepurii sălbatici ar putea fi un potenţial rezervor natural pentru *M. paratuberculosis* şi acestea au implicaţii în controlul paratuberculozei la animalele domestice şi posibil şi pentru sănătatea omului (9, 10, 11, 12, 13, 19).

În urma unui studiu făcut în Cehia, se arată o creştere a prevalenţei paratuberculozei în ferme de bovine, în urma importării de animale clinic sănătoase. Prevalenţa s-a studiat într-o fermă cu 101 bovine de carne ţinute la păşune şi 95 vaci de lapte crescute în stabulaţie. În urma examenelor serologice şi a examenului cultural al fecalelor, animale pozitive au fost sacrificate. La examenul cultural făcut din ţesuturi, s-a constatat că acesta a fost pozitiv la 53 (52,5%) animale la cele din ferma de carne şi la 52 (54,7%) la cele din ferma de lapte. Din probele de mediu (n=279) reprezentate de fecale, perete răzuit, apă, hrană, larve de diptere, iarbă, sol, noroi, apă din bălţi de pe păşuni, s-a reuşit cultivarea de *M. paratuberculosis* la valori de 9,1% - 2,0%. Prevalenţa bolii a fost similară în cele două ferme. Rata similară a prevalenţei a fost confirmată prin RFLP. Nu s-a putut stabili o corelaţie între tipul de creştere şi susceptibilitatea la paratuberculoză. Masivitatea infecţiei din ambele turme şi contaminarea mediului cu *M. paratuberculosis,* au constituit factorii de risc, impunând aplicarea unui program radical de control (3).

Într-un studiu făcut în Grecia privitor la izolarea speciei *M. paratuberculosis* de la animale non-rumegătoare sălbatice, care trăiesc în adăposturi sau pe păşuni care sunt folosite de capre şi oi, se arată că germenul a fost izolat de la 11 oi, 12 capre, 2 şoareci, 2 şobolani, un iepure şi o vulpe. Unul din şobolani a avut numai modificări histopatologice. Prin cercetările de genetică moleculară (IS900) se arată că 21 din

tulpinile izolate erau de tip bovin, şi două (de la şoarece de casă şi capră) erau de tip ovin, fiind menționat faptul că era prima semnalare că şoarecele de casă adăposteşte tulpini de tip ovin. Tulpinile izolate de la vulpe şi iepure erau de asemenea tulpini ce predomină la rumegătoare (16).

Există semnalări prin care se precizează că porcii care coabitează cu rumegătoarele bolnave pot face infecții inaparente şi numai rar forme clinice, putând deveni surse de infecție. Se menționează izolarea de la mistreți din zone în care infecția a fost depistată la căprioare (1).

Izolarea *M. avium* subsp. *paratuberculosis* de la specii de animale non-rumegătoare crează posibilitatea transmiterii germenului de la animalele sălbatice la rumegătoarele domestice, calea fecal-orală, existând două posibilități: fie prin păscutul de iarbă de pe păşuni contaminate cu fecale de la animale sălbatice, fie prin hrănirea cu furaje stocate, dar de asemenea contaminate cu fecale de la animale sălbatice. Se arată că ingerarea a câteva crotine de animale sălbatice poate constitui o doză infectantă pentru vite. Se sugerează că fecalele iepurilor contaminați, constituie cel mai mare risc pentru apariția paratuberculozei la vite. În baza acestor date se subliniază că paratuberculoza la rumegătoarele domestice este o boală dificil de controlat, ca o consecință a participării animalelelor sălbatice non-rumegătoare în epidemiologia bolii (21, 22, 28). Alături de acestea menționează că şi unele nevertebrate, alte rumegătoare sau nerumegătoare pot juca rolul de vectori şi pot constitui un potențial factor de risc în răspândirea infecției cu *M. paratuberculosis* (33).

Într-un studiu de mare extindere pe 774 probe recoltate de la 25 de mamifere şi 22 specii de păsări, se menționează izolarea din fecale de la 3 ratoni (*Procyon lotor*), 2 tatu (armandillos) (*Dasypus novemcinctus*), un oposum (*Didelphis virginiana*), o pisică sălbatică, şi de la 3 specii de păsări, se arată că acestea pot găzdui şi răspândi germenul (35).

Din datele prezentate rezultă divesitatea rezervoarelor naturale care pot întreține şi răspândi *Mycobacterium avium,* subsp. *paratuberculosis,* acestea fiind reprezentate îndeosebi de rumegătoare sălbatice, de animale non-rumegătoare între care rolul dominant este atribuit iepurilor, dar nu trebuie neglijat nici rolul unor altor mamifere şi păsări, care pot fi considerate gazde atipice. La acestea se mai adaugă unele viețuitore inferioare care îndeplinesc cel mai adesea doar rolul de vehiculatori. În fața acestui sistem foarte diversificat al rezervoarelor naturale, la care se adaugă şi diferite elemente de mediu şi obiecte contaminate, nu este surprinzător faptul că lupta antepidemică contra paratuberculozei a devenit extrem de dificilă.

CONCLUZII

1. Un rol important în menținerea şi difuzarea *M. avium* subsp. *paratubeculosis* îl pot avea unele rumegătoare sălbatice, atât cele ca trăiesc în mediul natural, cât şi cele din rezervații sau grădini zoologice. Un rol deosebit este atribuit unor specii din genurile *Cervus, Capreolus, Ovis, Oreamonus, Odoicoleus.*
2. În circuitele epidemiologice intervin animale sălbatice non-rumegătoare (vulpe, urs, mistreț) şi păsări prădătoare (cioara, corbul, stăncuța), mustelide, rozătoare şi lagomorfe (şobolan, şoarece, dihor, nevăstuică), un rol dominant fiind atribuit iepurilor din genurile *Lepus* şi *Oryctolagus.*
3. Unele nevertebratele (larve de *Eristalis tenax*, specii de *Diptere,* râme) pot fi potențiali vectori în transmiterea germenului, nu numai pe suprafața lor, dar chiar şi prin trecerea germenului prin tubul digestiv.
4. Prezența pe păşuni sau accesul la depozitele de furaje a unor animale sălbatice, rumegătoare sau non-rumegătoare, sunt cel mai adesea factori asociați cu apariția îmbolnăvirilor de paratuberculoză la rumegătoarele domestice.
5. În acest context foarte diversificat al rezervoarelor naturale, la care se adaugă şi diferite elemente de mediu şi obiecte contaminate, lupta antiepidemică contra paratuberculozei devine extrem de dificilă.

BIBLIOGRAFIA

1. Álvarez J, de Juan L, Briones V., Romero B., Aranaz A., Fernandez-Garayzabal J. F., Mateos A., 2005, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in fallow deer and wild boar in Spain – Vet. Rec., 156, (7), p. 212-213.
2. Álvarez J, de Juan L, Aranaz A, Romero B, Bezos J, Mateos A, Domínguez L., 2005, A survey on paratuberculosis in wildlife in Spain - 8th International Colloquium on Paratuberculosis – Section 6 Epidemiology.
3. Ayele W. Y., Fischer O., Svastova P., Alexa M., Machackova M., Pavlik I., Dairy and beef cattle paratuberculosis survey in intensive and extensive farming conditions – 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain 11-14th June 2002.
4. Beard P. M., Daniels M. J., Henderson D., Pirie A., Rudge K., Buxton D., Rhind S., Greig A., Hutchings M. R., McKendrick I., Stevenson K., Sharp J. M., 2001, Paratuberculosis Infection of Non-ruminant Wildlife in Scotland - J. Clin. Microbiol., 39, (4), p. 1517-1521.
5. Bernardelli A., Zumárraga M., Alonso B., Romano M. I., Gioffré A., Etchechoury I., Sanguinetti R., Zenobi C., Balzano R., 2005, Paratuberculosis in Mouflon (Ovis musimon) – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
6. Chiodini R. J., 1989, Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease enteritis – Clin. Microbiol. Rev., 2, (1), p. 90-117.
7. Chioidini R. J., Hermon-Taylor J., The effect of pasteurization on the viability of Mycobacterium paratuberculosis – http://www.crohns.org/htmfiles/ROD_JHT.htm.
8. Crawford G. C., Ziccardi M. H., Gonzales B. J., Woods G. C., Fischer K. J., Manning E. J. B., Mazet J. A. K., 2006, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium infections in a tule elk (Cervus elaphus nannodes) herd – J. Wild. Dis., 42, (4), p. 715-723.
9. Daniels M. J., Hutchings M. R., Greig A., 2003, The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta – Epidemiology and Infection, 130, p. 561-568.
10. Daniels M. J., Henderson D., Greig A., Stevenson K., Sharp J. M., Hutchings M. R., 2003, The potential role of wild rabbits Oryclolagus cuniculus in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants – Epidemiology and Infection, 130, p. 553-559.
11. Daniels M. J., Hutchings M. R., Beard P. M., Henderson D., Greig A., Stevenson K., Sharp J. M., 2003, Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland – Lournal of Wildlife Diseases, 39, p. 10-15.
12. Daniels M. J., Lees J.D., Hutchings M. R., Greig A., 2003, The ranging behaviour and habitat use of rabbits on farmland and their potential role in the epidemiology of paratuberculosis – The Veterinary Journal, 165, p. 248-257.
13. Daniels M. J., Hutchings M. R., Allcroft D. J., McKendrick L. J., Greig A., 2002, Risk factors for Johne's disease in Scotland – the results of a farmer survey – The Veterinary Record, 150, p. 135-139.
14. Davidson W. R., Manning E. J. B., Nettles V. F., 2004, Culture and serologic survey for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection among southeastern with-tailed deer (Odocoileus virginianus) – J. Wildl. Dis., 40, (2), p. 301-306.
15. Estevez-Denaives I., Chávez-Gris G., Hernández-Castro R., Pavlik I., Bartos M., 2005, RFLP identification of Mycobacterium avium, subsp. paratuberculosis isolated from smal ruminants of Mexico - 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
16. Florou M., Leontides L., Kostoulas P., Billinis C., Sofia M., Kyriazakis I., Lykotrafitis F., 2007, Isolation of Mycobacterium avium, subsp. paratuberculosis from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the patures of Greek sheep and goats – Epidemiol. Infec., 1-9.
17. Fraquelli C, Bregoli M, Carpi G, Ostanello F, Pasolli C, Pozzato N, Rosati S., 2005, Epidemiology of paratuberculosis in two red deer (Cervus elaphus) populations of Trentino (Northern Italy) – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
18. Greig A., Stevenson K., Perez V., Pirie A. A., Grant J. M., Sharp J. M., 1996, Paratuberculosis in wild rabbits (Oryctolagus cuniculus) – The Paratuberculosis Newsletter, 8, (2), p. 32.
19. Greig A., Beard P.M., Daniels M. J., Henderson D., Hutchings M. R., Stevenson K., 2002, The potential role of wildlife in the epidemiology of paratuberculosis in domestic animals – Congress: The Association of Veterinary Techears and Research Workers (AVTRW) Current Topics in Veterinary Science, Scarborough, UK, 25th-27th March 2002.
20. Griffin J. F. T., Mackintosh C. G., Rodgers C. R., Liggett S., Cooper M., Spittle E., 2005, Serodiagnostic merkers for Johne's disease in red deer (Cervus elaphus) - 8th Internat. Colloq. on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark: August 14-17, Section 5: Diagnosis.
21. Hutchings M. R., Daniels M. J., Henderson D., Greig A., Potential wildlife in ruminant transmission routes four M. a. paratuberculosis – 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, 11-14th June 2002, secțiunea Epidemiology & Control.
22. Hutchings M. R., Daniels M. J., Henderson D., Greig A., 2002, Wildlife to ruminant transmission routes for M. a. paratuberculosis – Congress The Association of Veterinary Techears and Research Workers (AVTRW) Current Topics in Veterinary Science, Scarborough, UK, 25th-27th March 2002.

23. Hutchings M. R., Daniels M. J., Henderson D., Greig A., Paratuberculosis – a new non-ruminant wildlife disease ? – 3rd International Wildlife Management Congress, Christchurch, New Zealand, 1st-5th December 2003.
24. Ikonomopoulos J. A., 2006, Evidence that sheep and goats are a reservoir for mycobacteria in Greece - Online Journal of Veterinary Reserche, 10, (2), p. 162-176.
25. Judge J., Kyriazakis I., Greig A., Hutchings M. R., 2005, Spatial and temporal distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in rabbits & the environment – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
26. Judge J, Kyriazakis I, Greig A., Hutchings M. R., 2005, Routes of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis transmission in rabbits – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
27. Judge J, Kyriazakis I, Greig A, Hutchings M. R., 2005, Quantification of the faecal-oral route of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis transmission from rabbits to livestock – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
28. Judge J., Hutchings M. R., Kyriazakis I., Greig A., Quantification of the faecal oral route of disease transmission: the rate of faeces ingestion by grazing herbivores – British Ecological Society Annual Meeting, Manchester, UK, 9th - 11th September, 2003.
29. Judge J., Hutchings M. R., Kyriazakis I., Greig A., Ingestion of rabbit faeces by livestock-potential for interspecies disease transmission – British Society of Animal Science Annual Meeting, York, UK, 5th – 8th April 2004.
30. Kopecna M, Lamka J, Trcka I, Moravkova M, Horvathova A, Literak I, Bartos M, Pavlik I., 2005, Atypical hosts and vectors of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
31. Kopecna M., Lamka J., Bartos M., Trcka I., Pavlik I., 2004, Paratuberculosis – a new emerging disease in muflon – Mouflon Colloquium and Related Topics, Brno, Czech Republic, 7th October, 2004.
32. Kopecna M, Bartos M, Lamka J, Parmova I, Straka M, Ludvik V, Trcka I, Svastova P, Moravkova M, Horvathova A, Álvarez J, Pavlik I., 2005, Paratuberculosis and avian tuberculosis in farmed red deer (Cervus elaphus) – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
33. Machackova M., Svastova P., Lamka J., Parmova I., Liska V., Smolik J., Fischer O. A., Pavlik I., 2004, Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic – Vet. Microbiol., 101, (4), p. 225-234.
34. Machackova M., Lamka J., Parmova I., Yayo Ayele W., Rozsypalova Z., Svastova P., Bartos M., Straka M., Ludvik V., Pavlik I., 2002, Paratuberculosis in wild ruminants in the Czech Republic in the years 1997-2001 – 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain 11-14th June 02.
35. Manning E. J. B., Corn J. L., Sreevatsan S., Fischer J. R., 2005, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in free-ranging birds and mammals on livestock premises in the United States – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
36. Pavlik I., Bazant J., Vitasek J., Machackova M., Yayo Ayele W., Pokorny J., Parmova
37. I., Lamka J., 2002, History of incidence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculois in domestic and wild ruminantsin the Czech Republic - 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain 11-14th June 2002.
38. Ridge S. E., Harkin J. T., Badman R. T., Mellor A. M., Larsen J. W. A., 1995, Johne's disease in alpaca (Lama pacos) in Australia – Austr. Vet. J., 72, (4).
39. Sevilla I., Singh S. V., Garrido J. M., Aduriz G., Rodriguez S., Geijo M. V., Whittington R. J., Saunders V., Whitlock R. H., Juste R. A., 2005, Molecular typing of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains from different hosts and regions – Rev. Sci. Tech., 24, (3), p. 1061-1066.
40. Singh S.V., Srivastava A. K., Singh A. V., Gupta V. K., 2005, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infecting Hog dear: A case study – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.
41. Sivakumar P., Singh N., Tripathi B. N., 2005, Pathology and diagnosis of paratuberculosis in water buffaloes (Bubalus bubalis). 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 2: Immunology, pathology and pathogenesis.
42. Stehman S. M., Shulaw P. W., 2002, Paratuberculosis (Johne's Disease) in Sheep and Goats. Recomandation for Diagnosis and Control –
43. http://goatconnection.com/articles/publish/article_128.shtml.
44. van Kooten H. C. J., Mackintosh C. G., Koets A. P., 2005, Intra-uterine transmission of paratuberculosis in farmed red deer – 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Section 6 Epidemiology.

CERCETĂRI PRIVIND LEPTOSPIROZA LA SUINE ÎN JUDEŢUL BISTRIŢA – NĂSĂUD

RESEARCHES ON SUINE LEPTOSPIROSIS IN BISTRITA NĂSĂUD COUNTY

PLATON I.[1], VASIU C.[2]
[1]D.S.V.S. A. Bistriţa-Năsăud
[2]F.M.V Cluj–Napoca
platon-bistrita@ansv.ro

The research that are the main subject of this paper have been done in Bistriţa-Năsăud county between 1995-2005. 685 swine have been examined all having different conditions that suggested leptospirosis, 2959 samples morphopathologic (corpses, organs, abortions, dead farrows, fetal covering, agonizing animals) and serologically 6767 blood samples using the RMA. The seroligical exam confirmed 129 positive cases out of which 123 (95,34%) regarding swine communities, where leptospirosis has had a discontinuous-endimic evolution and 6 (4,65%) in individual holdings, with an accidental evolution. The annual distribution reveals the fact that between 1995-1998 every year there are positive cases in swine communities (all positive cases have been marked every time in only one holding, in one village) and only in 1996, 1998 and 2002 in individual holdings.There is an increase in positive cases between 1995-1996 in November (21,7%), February (17.83%), April (17,83%), January (12.4%), and March (8,53%). Dull conditions have the highest rating when the appareance of leptosporosis is questioned, these are confirmed serologically in 8,78% of the cases. 47,36% of renal injuries, 27,77% of ocular injuries, 9,75% of abortions, 3,05% other conditions (liver, cardiac, pulmonary, nervous, cutaneos conditions) and only 2,53% digestive are due to leptospirosis.

Key words: epidemiological, swine, leptospirosis, serological.

Dintre toate animalele domestice porcul este cel mai receptiv la infecţia cu leptospire, pentru unele serotipuri acesta reprezintă rezervorul principal şi în acelaşi timp o sursă sigură a infecţiei pentru om şi alte animale (8, 9)). Leptospiroza prezintă importanţă deosebită din punct de vedere economic în activitatea de creştere a suinelor din întreaga lume (12, 14, 15), fiind considerată una dintre bolile cu implicare majoră în apariţia tulburărilor de reproducţie (11) dar şi o cauză a pierderilor prin mortalitate produse de aceasta (15). Pierderile cauzate de leptospiroză debutează practic din momentul contactului leptospirelor cu organismul gazdă, când, în faza de leptospiremie acestea difuzează în înterg organismul, putând fi găsite în tractusul genital (6, 7), ficat, pulmoni, ochi şi uneori la nivelul sistemului nervos central. Tulburările de reproducţie se exprimă atât prin avort, purcei fătaţi morţi, mumifierea fetuşilor, purcei neviabili, cât şi prin faptul că de multe ori, purceii fătaţi vii sunt slabi,anemici şi mor de obicei în prima săptămână de viaţă (1, 2, 10).

Diagnosticul infecţiei cu leptospire se bazează pe datele epidemiologice, morfoclinice şi de laborator. Dintre examenele de loborator, evidenţierea anticorpilor specifici prin reacţia de micro-aglutinare (RMA), constitue testul cel mai larg utilizat (3, 4, 5, 13).

Cercetările care fac obiectul acestei lucrări au fost intreprinse în scopul cunoaşterii epidemiologiei leptospirozei la suine în judeţul Bistriţa-Năsăud în vederea aplicării celor mai eficiente măsuri de prevenire şi combatere a acestei boli.

MATERIAL ŞI METODĂ

Evoluţia leptospirozei la porcine s-a bazat pe datele furnizate de evidenţele existente în exploataţii de porcine, în cele 56 circumscripţii sanitare veterinare de asistenţă (CSV) şi 6 circumscripţii sanitare veterinare zonale (CSVZ), în evidenţele Laboratorului Sanitar Veterinar Judeţean, D.S.V.S.A. Bistriţa–Năsăud, specialişti din unităţi şi persoane fizice.

Au fost examinate clinic 685 de porcine cu diferite afecţiuni care creeau suspiciunea de leptospiroză, morfopatologic 2959 probe (cadavre, organe, avortoni, purcei fătaţi morţi, învelitori fetale, animale în

agonie) şi serologic 6767 probe de sânge (ser) prin reacţia de microaglutinare microscopică (RMA) folosind 8 antigene (Leptospira pomona, L. canicola, L. tarassovi, L. icterohaemorrhagiae, L. hebdomadis, L. wolfi, L. grippotyphosa, L. hardjo). S-au apreciat ca pozitive reacţiile cu un titru de minimum 1⁄400. Studiul a fost efectuat pe efective de suine provenind din diverse sectoare de creştere: exploataţii profesionale reprezentate de unităţi specializate, gospodării anexe ale unor unităţi şi gospodării individuale ale unor cetaţeni privaţi, acestea din urmă având o pondere de 95,80-98%.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Repartizarea spaţială a cazurilor pozitive pentru leptospiroză la suine este redată în tabelul 1.

Tabelul 1

Suinele serologic pozitive pe circumscripţii sanitare veterinare şi sectoare de proprietate.

Nr. Crt.	C.S.V.A.	Colectivităţi de animale		Exploataţii individuale ale cetăţenilor privaţi		Total
		Probe pozitive		Probe pozitive		
		Nr .	%	Nr	%	
1.	Bistriţa	8	6,5			8
2.	Dumitra			1	16,66	1
3.	Milaş			1	16,66	1
4.	Satu Nou	11	8,94			11
5.	Şieu Magheruş	104	80,62			104
6.	Şintereag			1	16,66	1
7.	Viişoara			2	33,33	2
8.	Ilva Mare			1	16.66	1
	TOTAL	123	95,34	6	4,65	129

Din analiza tabelului 1 rezultă că leptospiroza a fost diagnosticată pe raza a 8 circumscripţii sanitare veterinare de asistenţă, reprezentând 14,28%. Cele mai multe cazuri pozitive se înregistrează la CSV Şieu Magheruş cu 104 cazuri positive (80,62%), urmată de CSV Satu Nou cu 11 cazuri pozitive (8,94%), CSV Bistriţa cu 8 cazuri pozitive (6,5%), CSV Viişoara cu 2 cazuri pozitive (1,55%), CSV Dumitra, CSV Milaş, CSV Şintereag şi CSV Ilva Mare cu câte 1 caz (0,77% fiecare). Incidenţa cea mai mare a cazurilor serologic pozitive se înregistrează în sectorul exploataţiilor de porcine cu colectivităţi mai mari sau mai mici de animale, respectiv 123 cazuri (95,34%) în timp ce în sectorul exploataţiilor individuale ale cetăţenilor privaţi s-au înregistrat numai 6 cazuri (4,65%).

Situaţia probelor serologic pozitive, pe sectoare de proprietate este prezentată în figura 1.

Din figura 1 rezultă că ponderea probelor prelevate şi examinate pentru depistarea leptospirozei la porcine este de 83,47% în cazul sectorului exploataţiilor individuale şi de 16,53% pentru cele provenind din colectivităţi de porcine. Raportul probe pozitive/probe total examinate este net favorabil colectivităţilor de animale, respectiv 11% faţă de 0,1% în exploataţiile individuale.

Semnificaţia acestor date este aceea ca evoluţia leptospirozei în sectorul colectivităţilor de suine are caracter de focar, iar în sectorul exploataţiilor individuale o evoluţie sporadică, boala afectând 1-2 capete de animale, în locaţii, zone şi perioade de timp diferite.

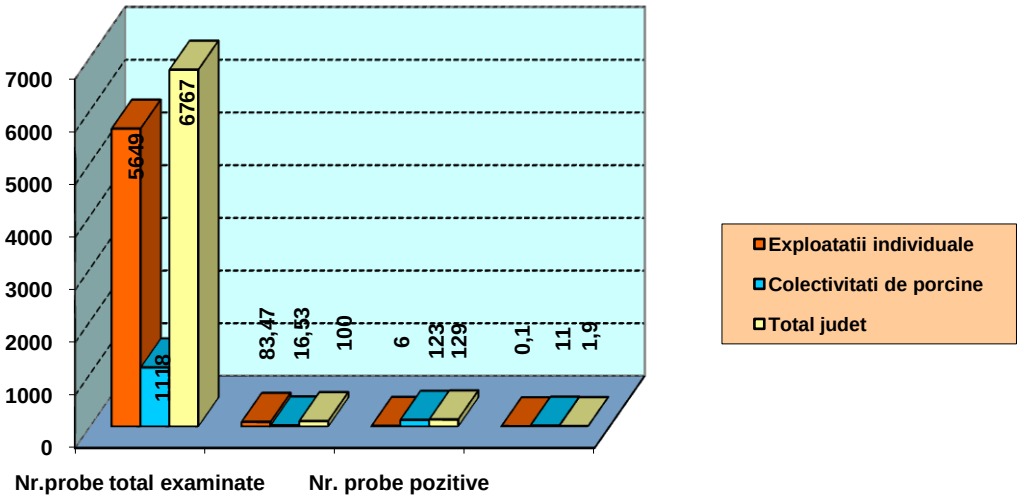


Fig. 1. Situaţia probelor pozitive pe sectoare de proprietate.

Evoluţia temporală a leptospirozei la suine în judeţul Bistriţa–Năsăud, în perioada luată în studiu, este redată în tabelul 2.

Tabelul 2

Incidenţa anuală a leptospirozei la porcine în judeţul Bistriţa–Năsăud.

Anul	Nr .de probe examinate (total)	Probe positive	
		Nr.	%
1995	853	36	4,2
1996	696	70	10,3
1997	562	11	1,9
1998	531	6	1,13
1999	437		
2000	301	1	0,33
2001	732		
2002	1106	2	0,18
2003	212	3	1,4
2004	590		
2005	747		
TOTAL	6767	129	1,9

Din tabelul 2 reese că cele mai multe cazuri pozitive se înregistrează în anul 1996 cu 70 de cazuri pozitive (10,3%), urmat de anul 1995 cu 36 cazuri pozitive (4,2%), 1997 cu 11 cazuri pozitive (1,9%), 2003 cu 3 cazuri pozitive (1,4%), 1998 cu 6 cazuri pozitive (1,13%), 2000 cu un caz pozitiv (0,33%), anul 2002 cu 2 cazuri pozitive (0,18%).

Analizând datele prezentate sub aspectul evoluţiei temporale şi distribuţiei anuale a leptospirozei la porcine, se constată că perioada luată în studiu are doua etape (Fig.2): etapa a I–a care cuprinde anii 1995-1998 şi etapa a II-a între anii 1999–2005.

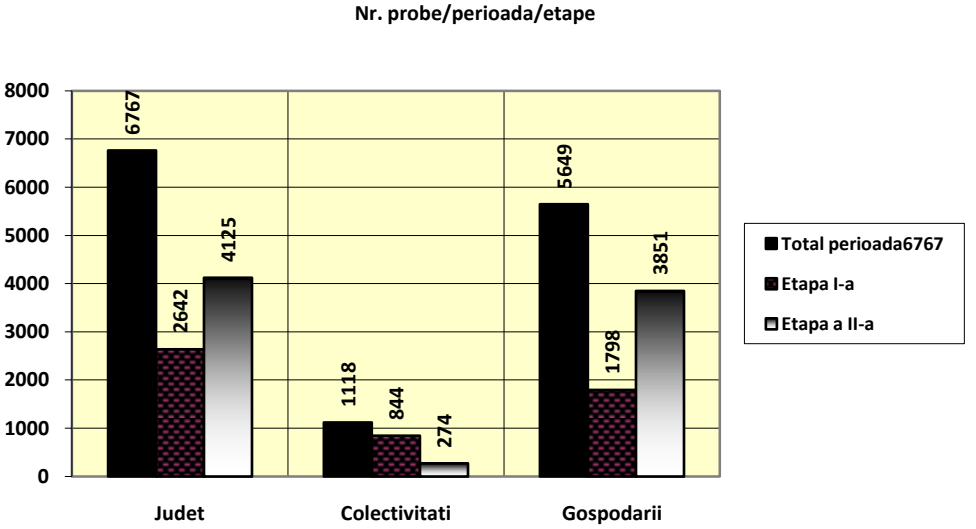


Fig. 2. Distribuţia probelor examinate pe etape.

Etapa I-a se caracterizează prin faptul că sunt prelevate şi examinate în scop de diagnostic 2642 probe serologice de la porcine provenind din toate sectoarele de proprietate (1798 din sectorul exploataţiilor individuale şi 844 din colectivităţi) reprezentând 39,0%, din care 123 probe sunt pozitive (1,8%). Cele mai multe cazuri pozitive se înregistrează în sectorul colectivităţilor de animale, respectiv 119 cazuri (4,5%) în timp ce în sectorul exploataţiilor individuale, acestea se cifrează la 4 cazuri (0,15%). Raportat la totalul cazurilor pozitive din sectorul colectivităţilor de animale pe întreaga perioadă luată în studiu, se constată faptul ca 96,7% sunt depistate în această etapă.

Etapa a II-a oferă evenimente mult mai puţine în sensul că numărul de cazuri este mult mai scăzut, doar 6 cazuri pozitive (0,17%), dintr-un total de 4125 probe examinate în această etapă, care procentual reprezintă 61% din probele examinate pe întreaga perioadă. Din totalul cazurilor pozitive, 4 (0,09%) se înregistrează în sectorul colectivităţilor de animale iar 2 (0,04%) în sectorul exploataţiilor cetăţenilor privaţi.

Distribuţia anuală a cazurilor pozitive de leptospiroză la suine, pe sectoare de proprietate, este redată în tabelul 3.

Distribuţia anuală relevă faptul că în etapa 1995–1998 sunt înregistrate cazuri pozitive în fiecare an în sectorul colectivităţilor de porcine şi doar în 3 ani în sectorul exploataţiilor individuale ale populaţiei. Se poate constata că în anul 1995 în sectorul colectivităţilor de porcine sunt înregistrate un număr de 36 cazuri, din totalul cazurilor pozitive din judeţ, în anul imediat următor, numărul probelor pozitive situându-se într-o curbă ascendentă, cu 68 de cazuri pozitive, anul 1997 cu 11 cazuri pozitive şi anul 1998 cu 4 cazuri pozitive.

Procentual cazurile pozitive în sectorul colectivităţilor de porcine sunt cuprinse între 66,66% şi 100%, respectiv, 66,66% în anul 1998, 97,14% în anul 1996 şi 100% în anii 1995 şi 1997. Începând cu anul 1999 situaţia leptospirozei la porcine se schimbă, în sensul că afecţiunea are un caracter sporadic, numărul cazurilor fiind mult mai puţine, înregistrându-se cazuri pozitive doar în anii 2000 (1 caz) şi 2003 (3 cazuri), reprezentând 100% din totalul cazurilor pozitive pe judeţ în aceşti ani.

În sectorul exploataţiilor individuale de porcine situaţia este diferită în sensul că numeric cazurile de leptospiroză sunt foarte puţine, respectiv 6 (4,65%), acestea înregistrându-se în anii 1996, 1998 şi 2002, în fiecare câte 2 cazuri. Procentual, din totalul probelor pozitive, acestea reprezintă 2,85% în 1996, 33,33% în 1998 şi 100% în 2002.

Tabelul 3

Distribuţia anuală a cazurilor pozitive de leptospiroză la suine pe sectoare de proprietate.

Anul	Suinele serologic pozitive				
	Total	Colectivităţi		Exploataţii individuale	
		Nr. cazuri	%	Nr. cazuri	%
1995	36	36	100		
1996	70	68	97,14	2	2,85
1997	11	11	100		
1998	6	4	66,66	2	33,33
1999					
2000	1	1	100		
2001					
2002	2			2	100
2003	3	3	100		
2004					
2005					
TOTAL	129	123	95,34	6	4,65

Caracteristic pentru perioada studiată este faptul ca în sectorul colectivităţilor de animale totalitatea cazurilor pozitive se înregistrează, de fiecare dată, într-o singură exploataţie, dintr-o singură localitate (1995 şi 1996 la Avisuinprod Şieu Măgheruş, 1997 la A.C.I. Bistriţa-ferma Satu Nou, 1998-2003 la Penitenciar Bistriţa) ceea ce conferă statutul de afecţiune cu caracter strict de focar, porcinele devenind specie de menţinere.

În cazul exploataţiilor individuale, cazurile pozitive sunt diagnosticate în localităţi şi exploataţii diferite, fără posibilităţi de transmitere directă, sursa de infecţie putând fi doar suspicionată.

Analizând evoluţia temporală a cazurilor pozitive pe luni calendaristice (tabelul 4), se poate observa că în perioada 1995-2005 cele mai multe cazuri se înregistrează în luna noiembrie cu 28 de cazuri (21,7%), urmată, în ordine descrescandă, de lunile februarie şi aprilie cu câte 23 de cazuri (17,83%), ianuarie cu 16 cazuri (12,4%), martie cu 11 cazuri (8,53%), mai, iunie şi septembrie cu câte 6 cazuri (4,65%), iulie, august, decembrie cu câte 3 cazuri (2,32%) şi luna octombrie cu un singur caz (0,78%).

Modul de evoluţie poate fi corelat cu urmatoarele situaţii:

1. în perioada 1995–1998 probele pozitive provin în cea mai mare parte (98,36%) din colectivitaţi de animale în care leptospiroza se afla în evoluţie, cu pronunţat caracter de focar;
2. apariţia cazurilor pozitive în lunile ianuarie, februarie, martie, poate fi urmare a contactului porcinelor cu germeni din genul Leptospira şi infectarea în cursul anului anterior;
3. cazurile pozitive mai numeroase în cursul lunii noiembrie se datorează contactului porcinelor cu agentul cauzal în lunile călduroase (când leptospirele dispun de cele mai convenabile conditii de multiplcare) din cursul anului şi conditiilor de întreţinere din exploataţiile cu colectivităţi de porcine (întreţinere în boxe comune, cu condiţii de umezeală crescută, soluţii de continuitate ale pielii numeroase etc.).

Reducerea presiunii infecţiei prin măsuri sanitare veterinare (eliminarea animalelor bolnave, acţiuni D.D.D. repetate, limitarea şi/sau interzicerea mişcării de porcine, controlul strict al reproducătorilor etc.) şi restrângeea activităţii de reproducţie a unităţiilor a determinat, începând cu anul 1999, o scădere semnificativă a numărului de cazuri pozitive de leptospiroză la suine, apariţia acesteia devenind sporadică.

Tabelul 4

Distribuţia pe luni calendaristice a cazurilor pozitive pentru leptospiroză la suine.

Anul	Lunile anului												
	Ian.uarie	Februarie	Martie	Aprilie	Mai	Iunie	.Iulie	Augusr	Septembrieee	Octombrie	Noiembrie	.Decembrie	**Total**
1995	14	18							4				36
1996	2	5		20	6	6					28	3	70
1997			11										11
1998				3					2	1			6
1999													
2000								1					1
2001													
2002								2					2
2003							3						3
2004													
2005													
Total	16	23	11	23	6	6	3	3	6	1	28	3	129
%	12,4	17, 83	8,53	17,8 3	4,6 5	4,65	2,3 2	2,32	4,65	0,78	21,7	2,32	

Clinic, marea majoritate a cazurilor a fost foarte greu de diagnosticat, leptospiroza, de multe ori putând fi doar suspicionată pe baza unor simptome cum ar fi: stări tifice, afecţiuni oculare, stări icterice şi/sau subicterice, avorturi, tulburări digestive, afecţiuni renale şi hepatice etc. Stabilirea unui diagnostic clinic a fost influenţată şi de faptul că în aceeaşi perioadă, în efectivele de porcine care au făcut obiectul studiului au evoluat şi alte boli de natură infecţioasă (boala edemelor, pasteureloza, salmoneloza, dizenteria brachyspirică, enterotoxiemia anaerobă), boli metabolice, parazitare (ascaridoza), astfel încât efectuarea examenelor de laborator (serologic, bacteriologic, histologic) au constituit o condiţie obligatorie.

Afecţiunile care au creeat suspiciunea clinică de leptospiroză şi cazurile confirmate prin examene de laborator sunt prezentate în tabelul 5.

Tabelul 5

Afecţiunile implicate în suspiciunea clinică a leptospirozei la suine.

Afecţiunea	Cazuri diagnosticate						Confirmarea leptospirozei	
	Total		Colectivităţi		Exploataţii individuale			
	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Avorturi	41	5,98	11	26,82	30	73,17	4	9,75
Afecţiuni oculare	18	2,62	7	38,88	11	61,11	5	27,77
Afecţiuni renale	19	2,77	13	68,42	6	31,57	9	47,36
Tulburări digestive	237	34,59	208	87,76	29	12,23	6	2,53
Stări tifice	239	34,89	163	68,20	76	31,79	21	8,78
Altele (hepatice,cardiace, pulmonare, nervoase, cutanate)	131	19,12	96	73,28	35	26,71	4	3,05
TOTAL	685	100	498	72,70	187	27,29	49	7,15

Din tabelul 5 reese că stările tifice (abatere, anorexie, decubit, stare de slabiciune generală), implicate în suspiciunea de leptospiroză au avut o pondere de 34,89%, fiind urmate de afecţiunile digestive cu 34,59% (manifestate în marea majoritate prin diaree, adesea hemoragică, uneori melenă, foarte rar constipaţie cu

coprostază), de alte afecţiuni (hepatice, cardiace, pulmonare, nervoase, cutanate) cu 19,12%, de avorturi (5,98%), de afecţiunile renale (2,77%) şi cele oculare (congestii ale mucoasei, blefarite, blefaro-conjunctivite, conjunctivite, cheratite, cherato– conjunctivite) cu 2,62%. În ceea ce priveşte prezenţa anticorpilor antileptospirici, în probele de ser prelevate şi examinate, afecţiunile renale şi oculare se situează pe primele poziţii, cu 47,36% şi respective 27,77% cazuri cu răspuns pozitiv.

În cazul avorturilor cele mai multe cazuri se înregistrează în sectorul exploataţiilor individuale (73,17%). Alte afecţiuni cum ar fi: cele *hepatice, cardiace* (foarte greu de diagnosticat clinic, mai ales în cazul evoluţiei altor boli cu simptomatologie asemănătoare); *pulmonare* (congestii, pneumonii, bronhopneumonii mai ales); *nervoase* (convulsii epileptiforme, pareze şi paralizii ale trenului posterior, tulburări de echilibru, rigiditatea gatului şi cele *cutanate* (dermatite-dermatoze, eritem, cianoza, mai ales la nivelul extremităţilor, edeme, colorația icterică sau subicterică) au avut o evoluţie variabilă, frecvenţa şi gravitatea cea mai mare constatându-se în cazul afecţiunilor pulmonare.

Morfopatologic s-a constatat un tablou extrem de diversificat, evidenţiindu-se leziuni mai mult sau mai puţin caracteristice leptospirozei fiind necesară, pentru precizarea cu certitudine a diagnosticului, efectuarea unor examene de laborator (serologice, bacteriologice, histologice). Ponderea leziunilor o constitue cele ale aparatului digestiv de tip congestiv şi/sau cataralo- hemoragico-necrotic, urmate de cele ale aparatului urinar reprezentate de congestii renale, distrofii, nefrozo–nefrite, nefrite de tip hemoragic sau fibros, scleroză renală, leziuni congestive, petesii, sufuziuni ale mucoasei vezicii urinare, cistite, uneori cu conţinut de urină cu aspect hemoragic etc., dar şi leziuni pulmonare (congestii pulmonare, pneumonii, bronhopneumonii etc.) şi/sau hepatice (congestii hepatice, perihepatite, distrofii, hepatite interstiţiale de tip hemoragic sau fibros). În cazul avortonilor s-au comstatat leziuni, în special, de tip infiltrativ hemoragic la nivelul ţesutului conjunctiv subcutanat, sufuziuni pe endo- şi epicard, distrofie hepato-renal[, uneori subicter. S-au mai constatat leziuni ale pielii, mucoaselor, endo- şi epicardului, ţesutului conjunctiv şi/sau seroaselor, de tip hemoragic (petesii şi/sau echimoze), precum şi leziuni icterice.

În anul 1999, s-a confirmat leptospiroza la 3 purcei în vârstă de 7 zile, provenind din sectorul colectivităţilor de animale, care au prezentat icter şi subicter al mucoaselor, icter al ţesutului conjunctiv şi muscular, distrofie hepatică gravă, nefrozo-nefrită hemoragică, cistită hemoragica. Examenul histologic a evidenţiat degenerescenţa celulelor hepatice cu necroza centrolobulară, hemoragii renale, subcapsulare şi în zona medulară, nefrită interstiţială şi necroză tubulară, asemanatoare celor descrise şi de alţi autori (8).

CONCLUZII

1.Leptospiroza la suine în judeţul Bistriţa–Năsăud, în perioada 1995–2005, a evoluat sporadico-endemic în colectivităţile de animale şi sporadic (accidental) în exploataţiile individuale.

2. Examenul serologic prin RMA confirmă 129 cazuri pozitive din care 123 (95,35%) în sectorul colectivităţilor de suine şi 6 (4,65%) în sectorul exploataţiilor individuale.

3. Incidenţa cea mai mare a leptospirozei se constată în colectvităţile de animale (ferme, gospodării anexe etc.), în care boala îmbracă un caracter pronunţat de focar, suinele din aceste exploataţii devenind specie de menţinere.

4. Cazuri pozitive de leptospiroză sunt înregistrate în fiecare an în sectorul colectivităţilor de suine şi doar în 3 ani în sectorul exploataţiilor individuale ale populaţiei.

5. În sectorul colectivităţilor de animale totalitatea cazurilor pozitive se înregistrează, de fiecare dată, într-o singură exploataţie, dintr-o singură localitate ceea ce conferă statutul de afecţiune cu caracter strict de focar, suinele devenind specie de menţinere.

6. Prevalenţa leptospirozei este crescută în lunile noiembrie (21,7%), februarie şi aprilie (cu 17,83% fiecare), ianuarie (12,4%), martie (8,53%) şi scăzută în lunile mai, iunie şi septembrie (4,65% fiecare), iulie, august, decembrie (2,32% fiecare) şi octombrie (0,78%).

7. Stările tifice reprezintă ponderea cea mai mare a afecţiunilor implicate în suspiciunea leptospirozei, acestea fiind confirmate serologic în numai 8,78% din cazuri.

8. Afecţiunile renale au fost atribuite leptospirozei în 47,36% din cazuri, fiind urmate de cele oculare (27,77%), de avorturi (9,75%), de altele (3,05%) şi de cele digestive (2,53%).

BIBLIOGRAFIE

1. Bidwell C. , Williamson S., Bury St. Edmunds, Done Thirsk S. H. (2005) - Laboratory diagnosis of porcine infertility in the UK . The Pig Journal 56, 88-106.
2. Bolin C., Cassells J. (1990) - Isolation of Leptospira interrogans serovar bratislava from stillborn and weak neonatal pigs in Iowa. JAVMA 196,1601-1604.
3. Bolin C. (1994) - Diagnosis of leptospirosis in swine. Swine Healt and Production, vol.2, 3.
4. Cerri D., Ebani V.V., Fratini F., Pinzauti P., Andreani E. (2003) – Epidemiology of leptospirosis: observation on serological obtained by a ,,diagnostic laboratory for leptospirosis" from 1995 – 2001. The new microbiologica : official journal of the Italian Society for Medical, Odontoiatric and Clinical Microbiology (SIMMOC). 26(4), 383-9.
5. Chappel R.J., Prime R.W., Millar B.D., Jones R.T., Cutler R.S., Adler B. (1998) - Prvalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with Leptospira interrogans serovar Pomona slaughtered in abattoirs in Victoria, Australia. Vet. Microbiol. 62, 237- 244.
6. Ellis W.A., McParland P.J., Bryson D.G. (1985) - Leptospires in pig urogenital tracts and fetuses. Vet .Rec., 117,66-67.
7. Ellis W.A., McParland P.J., Bryson D.G.(1986) - Isolation of Leptospires from the genital tract and kidneys of aborted sows. Vet. Rec., 118,294-295.
8. Ellis W.A. (2005) – Leptospiroza. În Zoonoze de Palmer S.R., Lord Soulsby E.J., Simpson D.I.H. Ed. Medicala, Bucuresti, 115 -128.
9. Flannery B., Costa D., Carvalho F. P., Guerreiro H., Matsunaga J., Da Silva E. D., Ferreira A. G., Riley L. W., Reis M. G., Haake D. A., Ko A. I. (2001) - Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 39, 3303-3310.
10. Gotuzzo E., Vinetz J. M. (2003) - Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect. Dis., 3, 757-771.
11. Kazami A., Watanabe H., Hayashi T., Kobayashi K., Ogawa Y., Yamamoto K., Adachi Y. (2002)- Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan. J. Vet. Med. Sci., 64, 735-737.
12. Ramos A. C., Souza G. N., Lilenbaum W. (2006) - Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. Theriogenology, 66, 1021-10251.
13. Răpuntean Gh., Răpuntean S. (1998) – Bacteriologie Veterinară Specială . Tipo Agronomia Cluj- Napoca , 247 – 253.
14. Shin-Seok Kang, Hak-Koo Kwak, Hong-Ki Kim (1993) - Prevalence of Leptospiral Antibodies in Sows – Korean. J. Vet. Serv., 16(1), 65-69.
15. Vasiu C. (2007) - Bacterioze la animale, Ed. Mega, Cluj – Napoca.

INVESTIGAŢII EPIDEMIOLOGICE ŞI CLINICO-MORFOPATOLOGICE ÎN LEPTOSPIROZĂ LA CABALINE ÎN JUDEŢUL BISTRIŢA–NĂSĂUD

EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICO-MORFOLOGICAL INVESTIGATIONS IN HORSE LEPTOSPIROSIS IN BISTRITA NĂSĂUD COUNTY

PLATON I.[1], VASIU C.[2]
[1]D.S.V.S. A. Bistriţa-Năsăud
[2F].M.V Cluj–Napoca
platon-bistrita@ansv.ro

Epidemiological aspects of the horse`s leptospirosis in Bistriţa–Năsăud during 1995-2000, were analyzed by descriptive epidemiology methods, studying the evolution of the disease, its extension, leptospira in territory distribution, disease severity and frequency of cases in various areas of the county, and epidemiology analysis aiming to detect the causative agent and the factors involved in the epidemiological process.

The study used serological test performed on 12572 samples of blood / serum horse examined Sanitary Veterinary Laboratory in Bistriţa-Năsăud, Department of bacterial serology and by leptospira response of micro-agglutination (RMA), which confirmed 449 (3.57%) pozitive cases. The annual distribution shows that in the period under study (1995-2000), positive cases are recorded every year, the less in 1996 (4 cases) and the most numerous in 1998 (243). The annual prevalence of positive cases is increased during the years 1998 and 2000, and during the month of February (52.6%), March (31.4%) and January (9.8%).

To establish correlation between RMA-positive responses and various diseases that have created suspicion of leptospirosis were examined clinically and 124 horse morfopatolgic and/or 59 bacteriological samples (26 abortion and/or fetal coverings, 33 dead bodies and/or organs). ocular diseases (23.38%) are assigned to leptospirosis confirmed in proportion of 41.38% and is the main factor correlation. Out of ocular diseases confirmed (12 cases), 41.66% are cases of periodical ophthalmic (5 cases).

Key words : leptospirosis, horse, epidemiology, periodical ophthalmic

Leptospiroza este o boală infecţioasă produsă de bacterii din genul Leptospira care este divizat în 17 genomo-specii (utilizând hibridizarea ADN-ADN) dintre care 8 sunt specii patogene, 3 intermediare şi 6 nepatogene. În cadrul speciilor patogene s-au identificat peste 300 de serovaruri (7). Infecţia cu leptosptospire poate fi produsă de oricare dintre serovarurile patogene şi este, de obicei, rezultatul transmiterii directe de la animale bolnave sau purtătoare prin urină, ţesuturi, produsele avortului sau indirecte prin contactul cu mediul contaminat (1). Cabalinele sunt recunoscute drept gazde accidentale pentru numeroase tipuri de leptospire.

La cabaline, boala a fost descrisă pentru prima dată în anul 1947 de Lubaschenko şi Nowikowa în fosta Uniune Sovietică şi ulterior în diverse alte ţări (9). La noi în ţară, existenta certă a leptospirozei la animale a fost demonstrată în 1951 de Combiescu şi col., deşi, fără a i se recunoaşte etiologia, boala afost descrisă la câine în 1901(Poenaru şi Udrischi) şi în 1902 (Ciurea)(12). Mulţi cercetători din România au adus contribuţii importante în cunoaşterea leptospirozei la cabaline.

Cabalinele sunt în mod natural rezistente la leptospiroză, cazurile exprimate clinic se pot manifesta prin febră, inapetenţă, icter, hematurie, tulburări respiratorii (în special la tineret dar şi în formă acută la cabalinele adulte), respectiv disfuncţie renală (2, 3, 6,), hepatică (4, 6, 7, 8), avort (2, 4, 7, 8, 11), parturiţii premature (2, 4, 6, 8,), uveită (5, 6, 8, 13) la cabalinele adulte. Formele subclinice de boală sunt asociate, în general, cu evoluţia cronică a bolii, când animalele pot rămâne purtătoare de leptospire ani de zile (1, 4).

Reacţia de microaglutinare (RMA) este considerată de referinţă în diagnosticul leptospirozei, avînd o specificitate de 97% (7)

MATERIAL ŞI METODĂ

Investigaţiile privind leptospiroza la cabaline s-au efectuat în perioada 1995-2000, în judeţul Bistriţa-Năsăud, pe raza celor 6 Circumscripţii Sanitare Veterinare Zonale (CSVZ) care au arondate 56 Circumscripţii Sanitare Veterinare de Asistentă (CSVA). S-au urmărit aspectele epidemiologice (studiul retrospectiv, anchetele transversale şi longitudinale) (10), având la bază examenul serologic efectuat în cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar Judeţean (L.S.V.J) pe 12.572 probe de ser/sânge, utilizând reacţia de micro-aglutinare (RMA). Pentru RMA s-au folosit 8 antigene: L.pomona, L.canicola, L.tarassovi, L.icterohaemorhagiae, L.wolffi, Lhardjo, L. grippotyphosa şi L.hebdomadis. S-au considerat pozitive reacţiile cu un titru de minimum 1/800.

În scopul stabilirii unor corelaţii între reacţiile seropozitive şi diverse afecţiuni au fost examinate clinic 124 cabaline care, prin simptomatologia prezentată, au creeat suspiciunea de leptospiroză (avorturi, stări febrile, stări icterice sau subicterice, iridociclită recidivantă, afecţiuni renale, hepatice, pulmonare etc.), precum şi morfopatologic şi/sau bacteriologic 59 de probe dintre care 26 avortoni şi învelitori fetale, 33 cadavre şi organe .

Datele au fost obţinute din evidenţele CSVA, CSVZ, Serviciului de Sănătate Animală, LSVJ, evidenţele unităţilor, de la proprietarii de animale, medici veterinari şi alte cadre de specialitate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Efectivul de cabaline şi numărul probelor serologice prelevate şi examinate în cadrul L.S.V.J., pe ani, sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Efectivul de cabaline şi numărul de probe prelevate şi examinate, pe ani.

Anul	Efectivul de cabaline (total judeţ)	Probe testate	
		Numar	%
1995	18468	784	4,2
1996	18462	1706	9,2
1997	18505	2963	16,0
1998	18759	2105	11,22
1999	20252	3206	15,83
2000	22244	1808	8,1

Din datele prezentate în tabelul 1 se observă că cele mai multe probe sunt prelevate şi examinate în anul 1999 (3206) iar cele mai puţine în anul 1995 (784) probe. Între cele două date limită, în ordine descrescândă, numărul de probe prelevate şi examinate serologic se prezintă astfel: 2963 probe în 1997, 2105 în anul 1998, 1808 în anul 2000, 1706 în anul 1996. Sub aspect procentual situaţia se prezintă diferit în sensul că cel mai ridicat nivel se înregistrează în anul 1997 cu 16%, urmat de 1999 cu 15,83%, 1998 cu 11,22%, 1996 cu 9,2%, 2000 cu 8,1%, 1995 cu 4,2%.

Pe baza „screeningului serologic" au fost depistate cu rezultat serologic pozitiv un număr de 449 cazuri din totalul probelor examinate, reprezentând 3,57% (tabelul 2 şi figura 1).

Tabelul 2

Distribuţia anuală a cabalinelor serologic pozitive la RMA.

Anul	Numărul de probe examinate	Probe pozitive	
		Nr	%
1995	784	5	0,63
1996	1706	4	0,23
1997	2963	37	1,24
1998	2105	243	11,5
1999	3206	31	0,97
2000	1808	129	7,1
Total	12572	449	3, 57

Analizând datele din tabelul 2 se constată că numărul de cazuri pozitive anual, raportat la numărul de probe examinate, înregistrează valori cuprinse între 4 în anul 1996 (0,23%) şi 243 în anul 1998 (11,5%). Cele mai puţine cazuri pozitive se înregistrează în anul 1996, 4 cazuri (0,23%) urmat, în ordine crescândă, de anul 1995, 5 cazuri (0,63%), 1999, 31 cazuri (0,97%), 1997, 37 cazuri (1,24%), 2000, 129 cazuri (7,15%), maximum de cazuri înregistrându-se în anul 1998, 243 (11,5%).

Distribuţia cazurilor pozitive la cabaline, pe ani, este redată în figura 1 din care se evidenţiază faptul că nu există corelaţii între numărul de probe prelevate şi examinate şi numărul de cazuri pozitive, înregistrând în perioada luată în studiu variaţii semnificative.

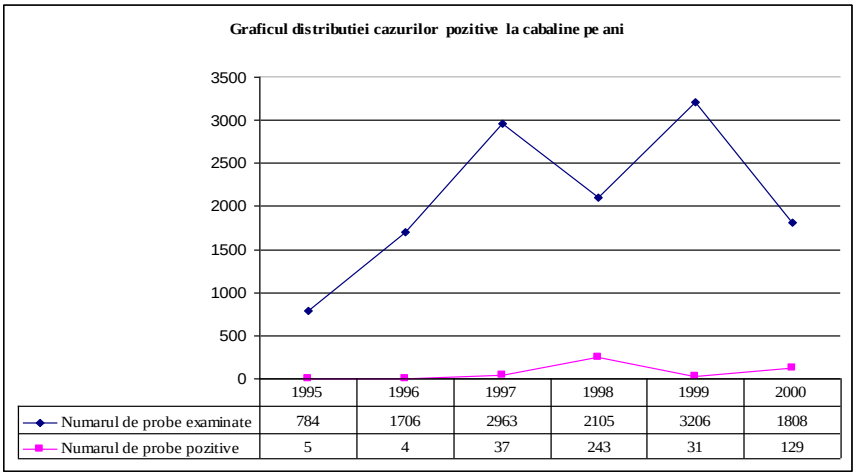


Fig. 1. Distribuţia cazurilor pozitive la cabaline, pe ani.

Din figura 1 reese că numărul de probe prelevate şi examinate în perioada 1995-1997 se situează într-o curbă ascendentă, urmată de o scădere în anul 1998, de o nouă ascensiune în anul 1999 şi o scădere în anul 2000. Evoluţia numărului de cazuri pozitive înregistrează grafic o curbă ascendentă în perioada 1996-1998, o scădere în anul 1999 urmată de o nouă ascensiune semnificativă în anul 2000, astfel încât se poate observa că numărul mai mare de cazuri pozitive se înregistrează în anii 2000 şi 1998, iar numărul de probe supuse examinării, sunt mai mici în aceşti ani comparativ cu anii anteriori.

Sub raportul distribuţiei în teritoriu se constată că sunt înregistrate cazuri pozitive pe raza tuturor celor 6 Circumscripţii Sanitare Veterinare Zonale (tabelul 3) şi în 53 de Circumscripţii Sanitare Veterinare de Asistenta.

Tabelul 3

Distribuţia cabalinelor pozitive la MRA pe Circumscripţii Sanitare Veterinare Zonale.

Nr. crt.	Circumscripţiile sanitare veterinare zonale	Anii						Total
		1995	1996	1997	1998	1999	2000	
1.	Maieru	-	2	7	37	5	6	57
2.	Năsăud	1		1	32	3	13	50
3.	Beclean	4	1	20	32	9	15	81
4.	Prundu Bârgăului			2	58	8	25	93
5.	Bistriţa			3	56	5	44	108
6.	Teaca		1	4	28	1	26	60
	Total	5	4	37	243	31	129	449

Incidenţa cazurilor pozitive (tabelul 3) se prezintă astfel: C.S.V.Z.Bistriţa 108 cazuri pozitive (24,05%), C.S.V.Z.Prundu Bârgăului 93 cazuri (20,71%), C.S.V.Z.Beclean 81 cazuri (18,04%), C.S.V.Z.Teaca 60 cazuri

(13,36), C.S.V.Z.Maieru 57 cazuri (12,69%) şi C.S.V.Z.Năsăud 50 cazuri (11,14%). În ceea ce priveşte frecvenţa apariţiei cazurilor pozitive se constată că pe raza C.S.V.Z.Beclean acestea apar în fiecare dintre anii luaţi în studiu, urmată de C.S.V.Z.Maieru şi Teaca cu apariţia de cazuri pozitive în 5 din cei 6 ani şi C.S.V.Z. Prundu Bârgăului şi Bistriţa în 4 ani, cu toate că ultimele două, sunt zonele cu cele mai numeroase cazuri pozitive înregistrate.

Analizând distribuţia cazurilor pozitive în teritoriu, la nivelul C.S.V. de asistenţă, se remarcă că cele mai multe cazuri s-au înregistrat în C.S.V.A.Şieuţ, respectiv 52 cazuri (11,5%), C.S.V.A.Satu Nou 31 (6,9%), C.S.V.A.Sângiorz Băi-Maieru 24 (5,34%), C.S.V.A.Beclean şi C.S.V.A.Galaţii Bistriţei cu câte 22 (4,99%), C.S.V.A.Livezile 21 (4,67%). În cîte 2 C.S.V.A. s-au înregistrat 16, respectiv 13 cazuri, în 3 C.S.V.A. câte 12 cazuri, în o C.S.V.A. 10 cazuri, în 4 C.S.V.A câte 7 cazuri, în câte 7 C.S.V.A. s-au înregistrat 3, 4 şi 5 cazuri pozitive, în câte 3 C.S.V.A. s-au depistat 6 şi 8 cazuri pozitive, iar în câte 4 C.S.V.A. 1, 2 cazuri. În perioada studiată nu au fost înregistrate cazuri pozitive pe raza a 3 C.S.V.A. (Braniştea, Negrileşti şi Şieu Măgheruş).

Având în vedere faptul că în perioada luată în studiu media cazurilor pozitive este 8, pentru a evidenţia diferenţierea distribuţiei cazurilor pozitive pe zone, am constatat că în 40 de C.S.V.A. (71,43%) au fost diagnosticate pozitiv 157 de cazuri (34,97%), revenind 3,92 cazuri/CSVA, iar în celelalte 16 CSVA (28,57%) se înregistrează 292 cazuri pozitive (65,03%) revenind 18,25 cazuri/CSVA.

Relevanţa este aceea că deşi sunt situate în zone diferite ale judeţului marea majoritate a cazurilor pozitive se regăsesc în cele 16 C.S.V.A., distribuţia în teritoriu nu este uniformă, existând localităţi cu incidenţă crescută, localităţi în care cazurile de leptospiroză sunt puţine şi localităţi în care nu au fost înregistrate cazuri pozitive în niciunul din anii luaţi în studiu.

Distribuţia temporală a cazurilor pe luni calendaristice (tabelul 4) relevă faptul că în perioada 1995-2000 cele mai multe cazuri s-au înregistrat în luna februarie cu 236 cazuri (52,6%), urmată în ordine descrescândă de lunile martie cu 141 cazuri (31,4%), ianuarie cu 44 cazuri (9,8%), aprilie cu 17 cazuri (3,8%), decembrie cu 5 cazuri (1,1%), mai cu 4 cazuri (0,9%) şi iunie cu 2 cazuri (0,44%).

Tabelul 4

Distribuţia cabalinelor pozitive la RMA în perioada 1995 – 2000, pe luni calendaristice.

Anul	Lunile												
	Ian.	Feb.	Mar.	Apr.	Mai	Iun.	Iul.	Aug.	Sep.	Oct.	Noi.	Dec.	Total
1995	5												5
1996		2	2										4
1997	7	25	3			2							37
1998	10	104	108	17	4								243
1999	14	2	10									5	31
2000	8	103	18										129
Total	44	236	141	17	4	2						5	449
%	9,8	52,6	31,4	3,8	0,9	0,44						1,1	

Situaţia prezentată, furnizează date cu privire la conexiunile dintre cazurile serologic pozitive de leptospiroză şi sistemul de întreţinere a cabalinelor, în sensul că pe raza circumscripţiilor cu cele mai numeroase cazuri (Şieuţ, Satu Nou, Galaţii Bistriţei Livezile, Maieru etc.) se practică păşunatul tradiţional a cabalinelor în tabun, cu menţinerea acestora pe păşuni perioade mai lungi de timp (săptămâni sau luni). Întreţinerea la păşune poate creea posibilitatea contaminării cabalinelor cu leptospire prin contactul direct animale infectate–animale sănătoase, expunerea la mediul contaminat (apă, sol, furaje) sau transmiterea prin vectori animaţi (căpuşe, lipitori, insecte hematofage).

Prezenţa apelor stagnante (locuri bältite în zonele de adăpare sau urmare revărsării unor pârâuri, ape pluviale, izvoare de suprafaţă) şi temperatura asigură în timpul verii condiţii optime dezvoltării şi supravieţuirii leptospirelor în mediul înconjurător şi în acelaşi timp posibilitatea infectării cabalinelor prin contactul cu agentul cauzal în aceste zone (leziuni la nivelul mucoaselor, leziuni ale pielii mai ales la nivelul coroanei, chişiţei, copitei–destul de frecvenţe la cabaline). Prezenţa animalelor sălbatice (în special

rozătoare, dar şi alte specii) care constituie principalul rezervor de menţinere a leptospirelor, poate constitui şi o sursă permanentă de contaminare a mediului (apă şi furaje) cu leptospire, mai ales prin faptul că acestea pot fii purtătoare şi excretoare toată viaţa (prin urină), fără a fi afectate.

Apariţia cazurilor pozitive grupat, în primul trimestru, sugerează faptul că infecţia s-a produs în sezonul cald al anului, în lunile de vară şi/sau în perioada de toamnă când, cabalinele care, în acea perioadă au fost întreţinute la păşune, vin în contact cu cele rămase în gospodarii, sunt regrupate la păşunat pe fâneţe, în jurul localităţilor şi sunt cazate în aceleaşi adăposturi cu cele sănătoase. Contaminarea în perioada de toamnă poate fi favorizată şi de faptul că rozătoarele migrează î din mediul natural spre gospodării şi adăposturile animalelor.

Tabloul clinic la animalele suspecte a fost extrem de diversificat incluzând afecţiuni renale, oculare, pulmonare, avorturi etc. însoţite de modificarea stării generale (ascensiuni febrile, anorexie, stări icterice sau subicterice).

Datorită polimorfismului manifestărilor clinice şi faptului că acestea de cele mai multe ori au evoluat concomitent, o departajare strictă nu a fost posibilă, astfel ca încadrarea acestora a fost făcută pe baza simptomatologiei dominante, stabilindu-se 4 indicatori : avorturi, afecţiuni oculare, afecţiuni renale şi alte afecţiuni (stări febrile, stări icterice, afecţiuni pulmonare, slăbire generală fără o cauză precisă).

Situaţia afecţiunilor clinice pe baza celor 4 indicatori este redată în tabelul 5.

Tabelul 5

Situaţia afecţiunilor clinice la cabaline în perioada 1995 – 2000.

Nr. total de cazuri/ perioadă	Denumirea afecţiunii							
	Avorturi		Afecţiuni oculare		Afecţiuni renale		Alte afecţiuni	
	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
124	26	20,96	29	23,38	18	14,51	51	41,13

Din tabelul 5 se poate observa că cele mai numeroase cazuri sunt cele cu afectarea stării generale (febră, anorexie, slăbire, stări icterice/subicterice, afecţiuni pulmonare)–51 cazuri (41,13%) urmate de afecţiunile oculare-29 cazuri (23,38%), avorturi–26 (20,96%) şi afecţiunile renale 18 (14,51%).

În scopul stabilirii unor corelaţii între cazurile clinice şi leptospiroză au fost efectuate examene serologice, morfopatologice, bacteriologice, histologice (după caz).

Examenele serologice efectuate pe cele 124 probe de ser/sânge provenite de la cabalinele cu semne clinice, confirmă prezenţa anticorpilor antileptospirici la 12 probe (9,67%), acestea provenind în totalitate de la cabalinele cu afecţiuni oculare.

Rezultatele examenelor serologice în scopul confirmării cazurilor clinice cu afecţiuni oculare şi distribuţia lor pe ani sunt redate în figură 2.

Din tabelul 5 şi figura 2 se poate observa faptul că pe întreaga perioadă luată în studiu s-au înregistrat 29 cazuri clinice cu afecţiuni oculare, la 12 (41,38%) dintre acestea fiind confirmată prezenta anticorpilor antileptospirici.

Analiza distribuţiei numărului de cazuri cu afecţiuni oculare confirmate serologic releva faptul că cele mai numeroase se înregistrează în anul 1998, 7 cazuri (58%), urmat de anul 2000, 3 cazuri (50%), 1999, 3 cazuri (33%) şi 1997, un caz (25%).

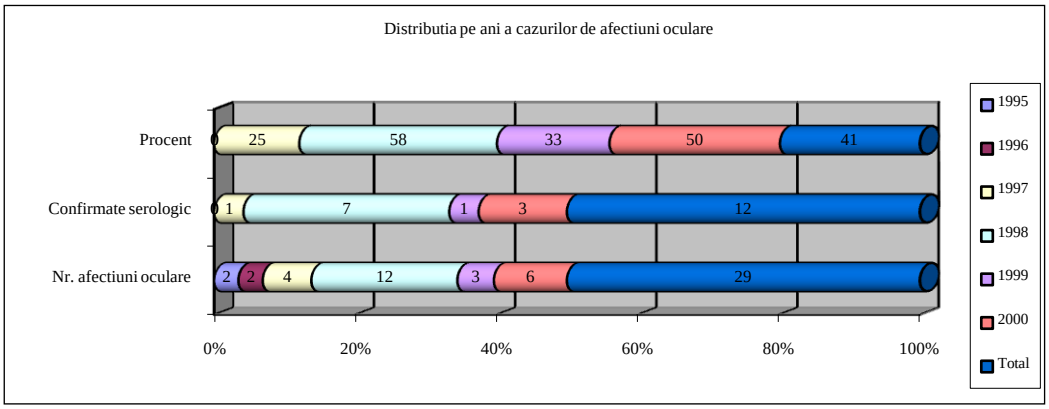


Fig. 2. Distribuţia pe ani a cazurilor cu afecţiuni oculare.

Din datele prezentate în figura 2 se poate observa că între distribuţia afecţiunilor oculare confirmate serologic şi distribuţia numărului de cazuri pozitive total pe ani există o corelaţie directă, în sensul că numărul afecţiunilor oculare confirmate este mai mare în anii 1998 (7 cazuri) şi 2000 (3 cazuri), ani în care şi numărul total de cazuri pozitive este mai mare (243 în 1998 respectiv 129 în 2000).

Afecţiunile oculare s-au manifestat iniţial prin conjunctivită, epiforă, blefarospasm, fotofobie, care în mare parte s-au remis fie ca urmare a unor tratamente, fie fără intervenţie medicamentoasă. După o perioadă de timp cuprinsă între 3 şi 7 luni, la 5 (41,66%) dintre cabalinele cu afecţiuni oculare s-au înregistrat recidive (oftalmie periodică), afecţiunea agravându-se cu mioză, edem cornean, sinechii în camera anterioară, opacifierea cristalinului unilateral (2 animale) sau bilateral (3 animale) cu microftalmie şi cecitate.

Examenele morfopatologice şi histologice efectuate pe 26 de avortoni şi/sau învelitori fetale şi 33 de animale moarte şi/sau organe evidenţiază leziuni care ar putea fi atribuite leptospirozei în special cele hepatice şi renale însoţite de icter/subicter, fără ca în producerea acestora să poată fi demonstrată prezenta leptospirelor.

Examenul bacteriologic nu evidenţiază în probele analizate prezenta leptospirelor, dar constată la 3 cazuri cu afecţiuni renale prezenţa E. coli.

CONCLUZII

1. Leptospiroza la cabaline în judeţul Bistriţa–Năsăud, în perioada 1995 – 2000, a evoluat sporadic în anii 1995–1997 şi 1999 şi sub formă endemică în anii 1998 şi 2000.

2. Examenul serologic prin R.M.A. confirmă 449 cazuri pozitive, cu o distribuţie şi frecvenţa diferită pe ani şi zone.

3. Incidenţa cea mai mare a cazurilor serologic pozitive se înregistrează în anul 1998 (243 cazuri pozitive) iar cea mai mică în anul 1996 (4 cazuri pozitive)

4. Prevalenţa leptospirozei la cabaline este crescută în anii 1998 şi 2000 şi respectiv în lunile februarie (52,6%), martie (31,4%) şi ianuarie (9,8%) şi scăzută în lunile aprilie (3,8%), decembrie (1,1%), mai (0,9%) şi iunie (0,44%).

5. Creşterea prevalenţei poate fi asociată cu întreţinerea animalelor tradiţional (în tabun), pe păşuni şi/sau fâneţe şi transmiterea infecţiei direct, prin vectori şi/sau din mediul contaminat.

6. Afecţiunile oculare (23,38%) au fost atribuite leptospirozei prin R.M.A. în proporţie de 41,38%.

7. Dintre afecţiunile oculare confirmate (12 cazuri), 5 cazuri (41,66%) sunt reprezentate de oftalmia periodică

8. Examenele morfopatologice şi histologice deşi evidenţiază leziuni ce pot fi atribuite leptospirozei, acestea nu au fost confirmate prin testul serologic (R.M.A.) şi examen bacteriologic.

BIBLIOGRAFIE

1. Bolin C.(2000) - Leptospirosis. In Emerging Diseasea of Animals.Edited by : Brown C., Bolin C. ASM Press, American Society for Microbiology,Washington DC; 185 – 200.
2. Bernard W.V., Bolin C., Riddle T., Durando M., Smith B.J., Tramontin R.R.,(1993)- Leptospiral abortion and leptospiruria in horses from the same farm. J Am Vet Med Assoc.202:1285–6.
3. Divers T.J., Byars T.D., Shin S.J. (1992) - Renal dysfunction associated with infection of Leptospira interrogans in a horse. J Am Vet Med Assoc.201:1391–2.
4. Ellis W.A. (2005) – Zoonoze. Ed. Medicala, Bucuresti, 115 -128.
5. Faber N.A., Crawford M., LeFebvr R.B., Buyukmihci N.C., Madigan J.E., Willits N.H.(2000)- Detection of Leptospira spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. J Clin Microbiol.38:2731–3
6. Goris M.G.A., Brem S., Meyer P., Kopp H., Gerhards H., Wollanke B. (2004)-Classification of leptospira from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis.- , J. Vet. Med., vol. B51 p., 110-115.
7. Levett P.N.(2001) - Leptospirosis. - Clin. Microbiol. Rev. 14:296-326.
8. (XXX) MERIAL: Veterinaires:Sante equine:Leptospirose
9. Perianu T.(1996) – Bolile infectioase ale animalelor.Editura Fundatiei Chemarea Iasi
10. Rapuntean Gh., Rapuntean S. (2007) – Epidemiologie Veterinara Generala. Editura Academic Pres .Cluj – Napoca.
11. Sebastian M., Giles J., Roberts J., Poonacha K., Harrison L., Donahue J., and Benirschke, K.,(2003) - Funisitis Associated with Leptospiral Abortion in an Equine Placenta – Equine Vet J.35(5):496-501
12. Vasiu C. (2004) – Boli infectioase la animale. Bacterioze. Ed. Mega, Cluj – Napoca.
13. Wollanke B., Rohrbach B.W. and Gerhards H.(2001)- Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of Leptospira interrogans from horses with recurrent uveitis. J.A.V.M.A. 219:795-800.
14. (XXX)WWW.bacterio.cict..fr/bacdico/ll/leptospira.html

RESEARCH REGARDING THE INSTALLATION OF OXIDATIVE PROCESSES IN MILK FAT DURING REFRIGERATION STORAGE

POP FLAVIA
North University of Baia Mare
flavia_maries@yahoo.com

Physicochemical characteristics and freshness indicators of butter during refrigeration (2 ... 4°C) storage were studied.

Alteration (hydrolysis and oxidation) of food is responsible for the degradation of sensory quality, nutritional value and even the formation of toxic substances such as peroxides, which requires intimate knowledge of these processes and taking appropriate measures to avoid losses that can be registered. Lipid oxidation includes fatty acid oxidation and generates compounds that affect food quality, due to changes in color, flavor, texture and even nutrition and food safety.

Changes in freshness parameters and the installation of alterative process when butter becomes improperly for consumption were studied inducing fatty acid content, peroxide index, iodine index and the presence of epihidrinic aldehyde. The content of saturated fatty acids was higher (71.84%) than that of unsaturated fatty acids (27.09%), the main fatty acids present in butter were butyric, miristic, palmitic, oleic and stearic acids. Results showed that butter is resistant to oxidation, due to low composition in unsaturated fatty acids, advanced oxidation is installing after 6 months in chilled butter.

Key words: milk fat, oxidation, refrigeration

Butter is considered one of the most popular concentrated milk products. Its nutritive value is high and is based on fat content. Digestibility of butter is 97% for fat and 94% for dry plasma, represents an important source of vitamin E [5].

Oxidation occurring in animal fats during their storage have resulted in the depreciation of their quality and their exclusion from the diet. Lipid oxidation includes fatty acid oxidation and generates compounds that affect food quality, due to changes in color, flavor, texture and even nutrition and food safety [1, 3].

Autooxidation is the reaction of atmospheric oxygen and lipids, because unsaturated ties, after this process being irreversibly compromised the quality of fatty substances, not only in terms of organoleptic (taste and aroma) but also in terms of toxicology. In the initial phase of oxidation, oxygen is fixed in the peroxidic form at double links of several molecules of unsaturated fatty acids [1, 9]. In an advanced stage, the peroxidic bound is breaking, after which results a lot of chemical compounds of decomposition: aldehydes, ketones, alcohols, inferior acids, acids-alcohols, acids –aldehydes, acids-ketones, etc. [3,8]. Reached at this stage fat becomes unfit for consumption. Of the chemical, specific reaction for aldehydes identification (Kreis) will be positive and regardless of the intensity of the reaction (weak positive, positive or mostly positive), fat should be excluded from the food circuit. In this stage of oxidation are installed organoleptic changes, easily discernible using the senses: yellow color, smell and taste of ranced [8,11]. Peroxide index provides us information on the incipient oxidation, and Kreis reaction illustrates advanced oxidation.

Research motivation is the determination of physicochemical indicators in fresh milk fat, and the moment when occur changes in the organoleptic and physicochemical parametres of butter stored under refrigeration, making it unsuitable for human consumption.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Butter with a content of 80% fat and 20% water was collected immediately after obtaining in a processing milk unit and stored under refrigeration (2 ... 4^{o}C), following the installation of altering processes (oxidation).

Physicochemical examination

Fatty acids content was determined using Hp - Hewlett Packard 5890 GC, chromatography column with high resolution, flame ionisation detector, by transformation in methyl esters of fatty acids in the sample under analysis, followed by components separation on a chromatography column, their identification by comparison with standard cromatograms and quantitative determination of fatty acids [11, 12] .

Peroxide index was determined using UV - VIS T60U spectrophotometer (England): operating temperature 5 – 45^{o}C; field wavelength 190 - 1100 nm; wave length accuracy 0.1 nm. This protocol was based on the spectrophotometric determination of ferric ions (Fe^{3+}) derived from the oxidation of ferrous ions (Fe^{2+}) by hydroperoxides, in the presence of ammonium thiocyanate (NH_4SCN). Thiocyanate ions (SCN^-) react with Fe^{3+} ions to give a red-violet chromogen that can be determined spectrophotometrically, the absorbance of each solution was read at 500 nm. To quantify peroxide value, a calibration curve (absorbance at 500 nm vs. Fe^{3+} expressed in µg) was constructed and peroxide value was expressed as meq O_2/kg of fat.

By Kreis reaction we identify aldehydes results in advanced stages of fat oxidation. Epihidrinic aldehyde, formed during advanced oxidation of fats, released in an acid environment, reacts with phluoroglucine, giving a colored compound. Color intensity is proportional to the quantity of epihidrinic aldehyde, and so with the oxidation process [13].

RESULTS AND DISCUSSION

The content of saturated fatty acids of butter was higher (71.84%) than that of unsaturated fatty acids (27.09%), major fatty acids present in butter were butyric, miristic, palmitic, stearic and oleic acids (fig.1). Palmitic acid was determined in the largest proportion (32.04%) these results are in agreement with previous studies on different types of milk cow butter. Glew, Okolo, Chuang and Vanderjagt said that the content of palmitic acid in the „Fulani butter" was 30.2%, and Sagdic et al. presented a content of palmitic acid in the „Turkish butter" of 33.72% [2].

In assessing the degree of freshness and intensity of oxidation process for chilled butter were determined iodine index, peroxide index as an indicator of incipient oxidation [11, 12] and epihidrinic aldehyde which is an indicator of advanced oxidation [13], determinations were performed at intervals of one months until it was pointed Kreis positive feedback, when determining the installation of advanced oxidation process.

Were determined the following values for iodine index: for fresh butter 34 g I_2 / 100 g butter, butter at 1 month refrigeration 33.6; butter at 2 months refrigeration 33; butter at 3 months refrigeration 32.3; butter at 4 months refrigeration 27.9; butter at 5 months refrigeration 27.2 and butter at 6 months refrigeration 26.4. In the first 3 months iodine index values falls slightly, in month 4 the decrease is more pronounced, in line with the propagation phase of lipid oxidation that forms the largest quantity of hydroperoxides, then the decrease represents a slow slope as presented in fig.2. During the storage there is a fall of iodine index values, because with the beginning of oxidation processes decreases the degree of unsaturation due to unsaturated fatty acids oxidation [10].

For fresh butter the peroxide index was determined to be 0.4 meq O_2/kg butter, followed an upward slope. In the first 4 months of storage under refrigeration there was a slow increase of the peroxide index, which corresponds to the initiation phase of oxidation [6, 7], followed by a sharp increase corresponding to propagation phase in which are formed the largest amount of hydroperoxides as primary compounds of

oxidation, value reached at 3.4 meq O_2/kg, in month 6 the growth is relatively constant, up from 3.9 meq O_2/kg because the balance formed between peroxides and secondary compounds, after which the peroxide index decreases as a result of the split of hydroperoxides in secondary compounds, in this moment Kreis reaction is positive indicating epihidrinic aldehyde presence (fig.3).

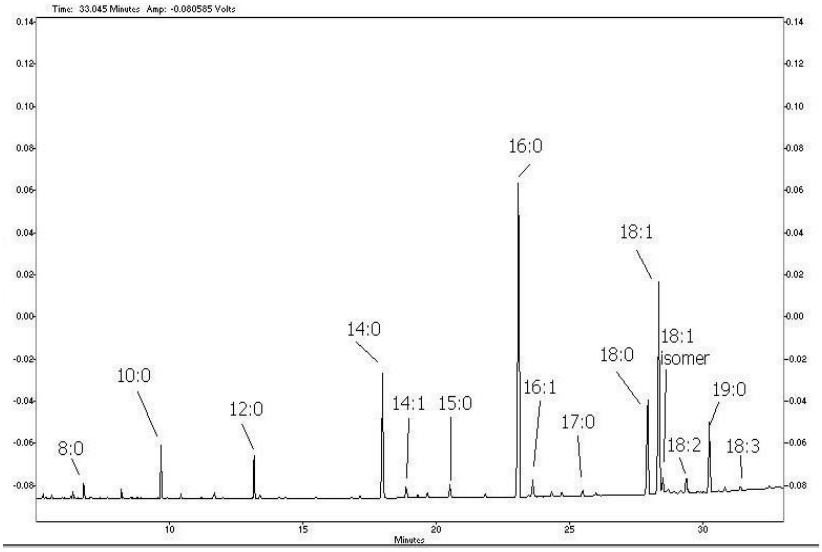


Fig.1 Chromatogram for fresh milk fat

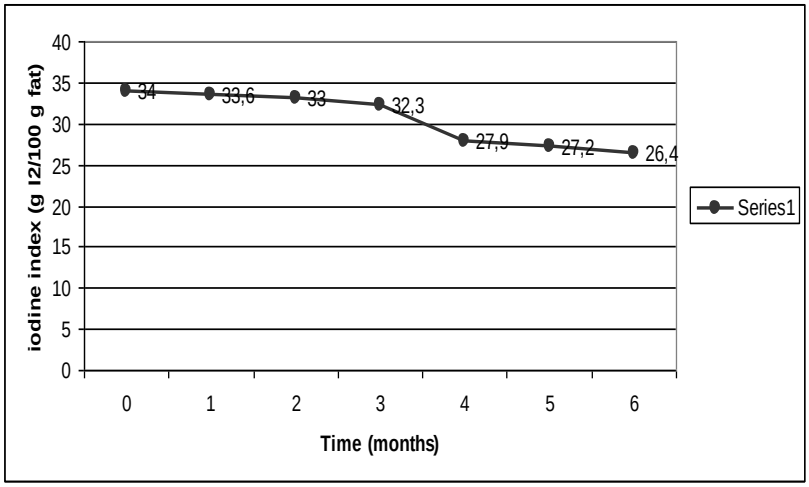


Fig.2 Iodine index variation of refrigerated butter

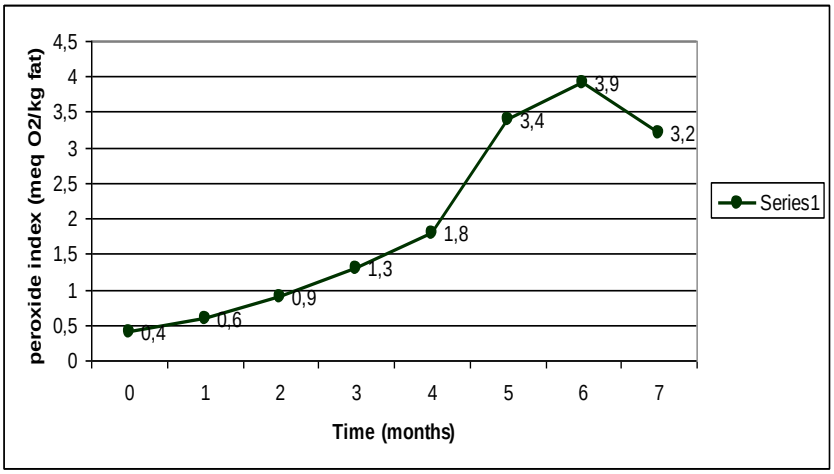


Fig.3 Peroxide index variation of refrigerated butter

CONCLUSIONS

The timing of changes occurring in oxidation processes of milk fat has particular importance in assessing the quality and its validity. The content of saturated fatty acids was higher (71.84%) than that of unsaturated fatty acids (27.09%), the main fatty acids present in butter were butyric, miristic, palmitic, oleic and stearic acids. Oxidation occurring in animal fats during their storage have resulted in the depreciation of their quality and their exclusion from the diet. Lipid oxidation includes fatty acid oxidation and generates compounds that affect food quality, due to changes in color, flavor, texture and even nutrition and food safety

In frozen butter altering processes take place more slowly than in that stored under refrigeration. Results showed that butter is resistant to oxidation due to low composition in unsaturated fatty acids, advanced oxidation is installing after 6 months in chilled butter.

REFERENCES

1. Banu, C. şi al., Tratat de chimia alimentelor, Ed. Agir, Bucureşti, 2002
2. Cháves, J., Castellote Ana, Martin, M., Chifré, R., López-Sabater Carmen, Stability during storage of LC-PUFA supplemented infant formula containing single cell oil or egg yolk, 2009, In: Food Chemistry, 113, 484-492
3. Ciobanu, D. şi Ciobanu, R., Chimia produselor alimentare, Ed. Tehnică-INFO, Chişinău, 2001
4. Flåtten, A. şi al., Determination of C22:5 and C22:6 marine fatty cids in pork with Fourier transform mid-infrared spectroscopy, 2005, In: Meat Science, 69:3, 433-440
5. Guş Camelia, Laptele şi produsele lactate-ghid practic de laborator, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2003
6. Naz, S., Siddiqi, R., Sheikh, H., Asad Sayeed, S., Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying, 2005, In: Food Research International 38, 127-134
7. Olsen, Elisabeth, Rukke, E.O., Flátten, A., Isaksson, T., Analysis of the early stages of lipid oxidation in freeze-stored pork back fat and mechanically poultry meat, 2005, In: Journal Agicultural Food Chemistry, 53:2, 338-348
8. Popescu, N., şi Meica, S., Bazele controlului sanitar veterinar al produselor de origine animală, Ed. Diacon Coresi, Bucureşti, 1995
9. Tofană Maria, Aditivi alimentari. Interacțiunea cu alimentul, Ed. Academicpres Cluj-Napoca, 2006
10. Vito, V. şi al., Evaluation of lipid oxidation in spaghetti pasta enriched with long chain n-3 polyunsaturated fatty acids under different storage condition, 2008 In: Food Chemistry 78, 384-392
11. ***Standard român SR EN 661, 1998
12. ***Standard român SR EN 14082, 2003
13. ***International Standard ISO 3976, 2006

RESEARCH ON ORGANOLEPTIC AND PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS OF ANIMAL FATS

POP FLAVIA
North University of Baia Mare
flavia_maries@yahoo.com

The physico-chemical parameters for five types of animal fats (butter, pork fat, beef tallow, poultry fat and fish fat) were studied. In assessing the authenticity of fats were determined: melting point, refractive index, iodine index, saponification index. For quality and conservation capacity were determined: water content and substances insoluble in ether, and for the state of freshness: acidity, peroxide index and epihidrinic aldehyde.

The order of fat consistency depending on the animal species was: beef>pork>milk fat>poultry>fish. The order of refractive index is close to the reverse of consistency: fish>poultry>pork>beef >milk fat.

The lowest values of iodine index were determined for butter, for pork fat and beef tallow values are moderate and the highest values were determined for poultry and fish fat.

Butter presents higher acidity due to high containt of free fatty acids, to melt fats to which acidity has a maximum value of 1% (g oleic acid).

Key words: physico-chemical parameters, freshness, animal fats

Nowadays there are registered many metabolic imbalances, awarded on the one hand to reduction of physical effort, sedentariness, and on the other to the growth of nerve demand and daily stress, to environmental pollution, food pollution implicitly. Excessive consumption of fat food, especially saturated fat led to the emergence of health problems – increasing of blood presure and cholesterol levels, increasing the number of patients with cardiac and circulatory diseases [2, 10].

Unsaturated lipids are less dangerous and contain significant amounts of liposoluble vitamins useful to the body, which have antioxidant function in fat food and body, preventing many diseases due to oxidative stress. Of unsaturated fatty acids, very important are linoleic, linolenic and arachidonic acids called essential fatty acids, that can not be synthesized by the body, they should be brought by food intake [1, 2, 6].

Lipids are solvents for liposoluble vitamins, providing their introduction in the body by gastrointestinal tract. Some fats are themselves an important source of vitamins, butter and fish fat.

The fact that marine products have become increasingly popular is due to valuable input of lipids that these products bring in food [5, 9, 10].

MATERIALS AND METHODS

Samples

Butter with a higher content of fat (80%) was collected after obtaining in a unit of milk processing; pork fat was obtained by bacon and lard melting; tallow was obtained by raw tallow melting, collected from „Baltata Romaneasca" race, female, age of 8 years; poultry fat was obtained by chickens fat melting, colected from males and females, age of 44 days, ROSS 308 race; fish oil was obtained by carp fat melting, colected from the farm carp, female, age of 1 year.

Physicochemical examination

To determine the melting point we used the SMP 10 (England) in accordance with the directives requirements: 89/336/EEC Electromagnetic Compatibility Directive 93/68 EEC, 73/23/EEC Low Voltage Directive 93/68 EEC. It was established the temperature corresponding to clarification point of fat, inserted in capillary tube, cooled to solidification and heat slowly until it was clear. Temperature corresponding to clarification point, is the melting point of examined fat. The values of refractive index are conditioned by the nature and proportion of fatty acids, unsaturated fatty acids increase the value, and saturated fatty acids decrease it. To determine the refractive index we used the PAL-RI (Japan) in accordance with the

requirements of EMC Directive 93/68/EEC. Iodine index was determined using Hanus method, was calculated as the amount of iodine, in g, additional to 100 g fat [12, 13]. Peroxide index provide information on the early process of oxidation, was determined using UV - VIS T60U spectrophotometer (England): operating temperature 5 – 45^{o}C; field wavelength 190 - 1100 nm; wave length accuracy 0.1 nm. This protocol was based on the spectrophotometric determination of ferric ions (Fe^{3+}) derived from the oxidation of ferrous ions (Fe^{2+}) by hydroperoxides, in the presence of ammonium thiocyanate (NH_4SCN). Thiocyanate ions (SCN^-) react with Fe^{3+} ions to give a red-violet chromogen that can be determined spectrophotometrically, the absorbance of each solution was read at 500 nm. To quantify peroxide value, a calibration curve (absorbance at 500 nm vs. Fe^{3+} expressed in µg) was constructed and peroxide value was expressed as meq O_2/kg of fat [14].

By Kreis reaction we identify the aldehydes results in advanced phases of fats oxidation [12, 13].

RESULTS AND DISCUSSION

Fish fat having in the structure a high proportion of unsaturated fatty acids, is liquid at room temperature. Poultry fat also has a high proportion of unsaturated fatty acids, consistency is very soft, even semyfluid**.** Beef tallow is presented as a compact and dense mass, fine granulated, with hard consistence. Pork fat has aspect of alifios and homogeneous mass with a moderate value for melting point. Milk fat has the smallest proportion of unsaturated fatty acids, but contains inferior saturated fatty acids, the consistency is soft, specific. (fig.1)

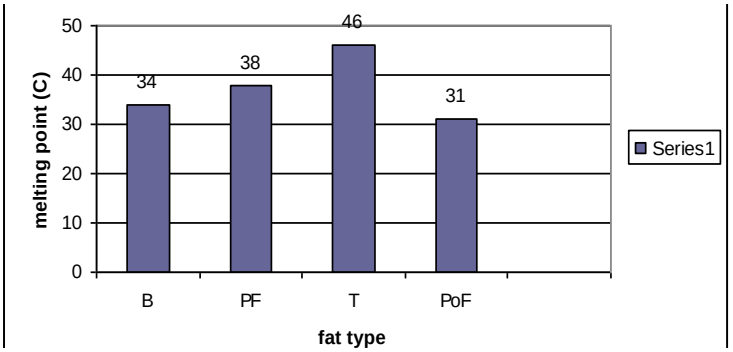


Fig.1 Melting point variation depending on the type of fat
B –butter, PF – pork fat, T – beef tallow, PoF –poultry fat
The order of fat consistency depending on the animal species was: beef>pork>milk fat>poultry>fish.

The values of refractive index are conditioned by the nature and proportion of fatty acids, unsaturated fatty acids increase the value, and saturated fatty acids decrease it. (fig.2).

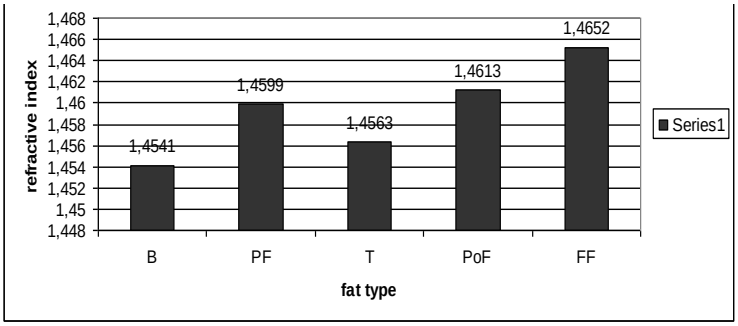


Fig.2 Refractive index variation depending on the type of fat
The order of refractive index is: fish>poultry>pork>beef >milk fat.

Doubles links of fatty acids, from the chemical composition of fats, gives the unsaturated fatty acids chemical instability that is seen by their ability to easy adition halogens at double links. Iodine index was determined using Hanus method, was calculated as the amount of iodine, in g, additional to 100 g fat.

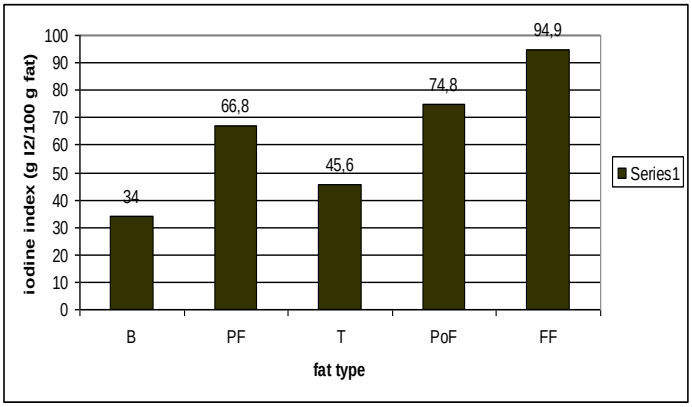


Fig.3 Iodine index variation depending on the type of fat
B –butter, PF – pork fat, T – beef tallow, PoF –poultry fat, FF –fish fat

Figure 3 shows that the highest value of iodine index was determined for fish fat due to high unsaturated fatty acids content.

Butter had the higher value of acidity because the high content of free fatty acids, the smallest value was determined for beef tallow where most acids are incorporated in glycerides structure. (fig.4)

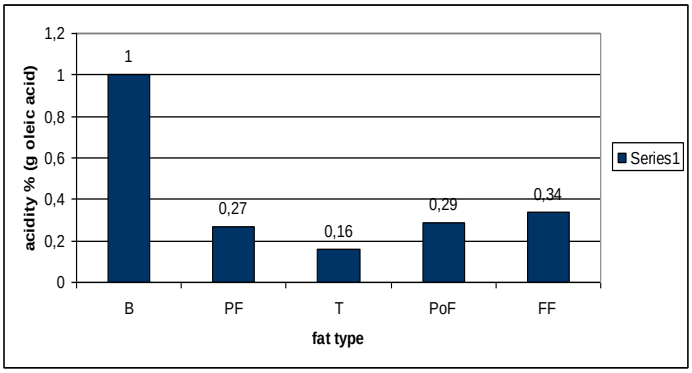


Fig.4 Acidity variation depending on the type of fat
B –butter, PF – pork fat, T –tallow, PoF –poultry fat, FF –fish fat

Peroxide index provides information on the incipient process of oxidation, and Kreis reaction illustrates advanced oxidation. Figure 5 shows that fish fat has the highest susceptibility to oxidation due to high proportion of unsaturated fatty acids, butter being the most resistant to oxidation due to the high content in saturated fatty acids [7, 8, 11].

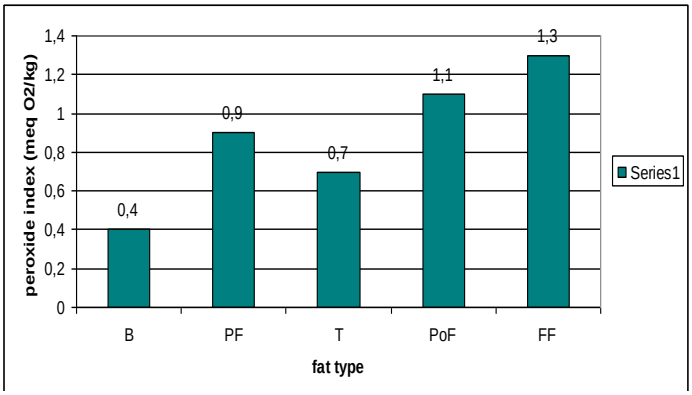


Fig.5 Peroxide index variation depending on the type of fat
B –butter, PF – pork fat, T – beef tallow, PoF –poultry fat, FF –fish fat

CONCLUSIONS

1. The determination of autencity indicators is an important criterion to identify the substitution of milk fat with animal or vegetable fats and to assess quality.

2. Butter presents higher acidity due to high containt of free fatty acids, to melt fats to which acidity has a maximum value of 1% (g oleic acid).

3. The lowest values of iodine index were determined for butter, for pork fat and beef tallow values are moderate and the highest values were determined for poultry and fish fat.

4. Peroxide index values show that fish fat has the highest susceptibility to oxidation due to high proportion of unsaturated fatty acids, butter being the most resistant to oxidation due to the high content of saturated fatty acids.

REFERENCES

1. Banu, C. şi al., Tratat de chimia alimentelor, Ed. Agir, Bucureşti, 2002
2. Banu, C., Preda, N., Vasu, S., Produsele alimentare şi inocuitatea lor, Editura Tehnică, Bucureşti, 1982
3. Cháves, J., Castellote Ana, Martin, M., Chifré, R., López-Sabater Carmen, Stability during storage of LC-PUFA supplemented infant formula containing single cell oil or egg yolk, 2009, In: Food Chemistry, 113, 484-492
4. Flåtten, A., Bryhni, A., Kohler, A., Egelandsdal, B., Isaksson, T., Determination of C22:5 and C22:6 marine fatty cids in pork with Fourier transform mid-infrared spectroscopy, 2005, In: Meat Science, 69:3, 433-440
5. Guş Camelia, Laptele şi produsele lactate-ghid practic de laborator, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2003
6. Leonte, M. şi Florea, T., Tratat de chimia alimentelor, I, Ed. Pax-Aura Mundi, Galaţi, 1998
7. Naz, S., Siddiqi, R., Sheikh, H., Asad Sayeed, S., Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying, 2005, In: Food Research International 38, 127-134
8. Olsen Elisabeth, Rukke, E.O., Flátten, A., Isaksson, T., Analysis of the early stages of lipid oxidation in freeze-stored pork back fat and mechanically poultry meat, 2005, In: Journal Agicultural Food Chemistry, 53:2, 338-348
9. Popescu, N., şi Meica, S., Bazele controlului sanitar veterinar al produselor de origine animală, Ed. Diacon Coresi, Bucureşti, 1995
10. Tofană Maria, Aditivi alimentari. Interacţiunea cu alimentul, Ed. Academicpres Cluj-Napoca, 2006
11. Vito, V., Ferioli, F., Riciputi Ylenia, Iafelice Giovanna, Marconi, E., Caboni Maria Fiorenza, Evaluation of lipid oxidation in spaghetti pasta enriched with long chain n-3 polyunsaturated fatty acids under different storage condition, 2008 In: Food Chemistry 78, 384-392
12. ***Standard român SR EN 661, 1998
13. ***Standard român SR EN 14082, 2003
14. ***International Standard ISO 3976, 2006

ACTIVITATEA PSEUDOCOLINESTERAZEI ŞI NIVELUL SERIC AL GLUCOZEI ŞI UREEI LA PUII-BROILER TRATAŢI CU BIOR

PSEUDOCHOLINESTERASE ACTIVITY, BLOOD SERUM GLUCOSE AND UREA IN BROILER CHICKENS TREATED WITH BIOR

PUTIN V.[1], MACARI V.[1], GUDUMAC V.[2]
[1]Universitatea Agrară de Stat din Moldova
[2]Universitatea de Stat de Medicină şi Farmacie "Nicolae Testemiţanu"
Republica Moldova, MD-2049, Chişinău, str. Mircești, 44
e-mail: lenamed.dec@rambler.ru

This study's purpose is to clear up the influence of the natural remedy BioR of algal origin obtained due to the modern technology from Spirulina platensis on the health and some biochemical indices that reflect first of all the proteosynthetic function of the liver and the metabolism of the glucose at broiler chickens in the conditions of the avicol factory.

The BioR remedy has been administrated at broiler chickens in four lots in doses of 0.3-0.6 ml twice: at the age of nine days and in doses of 0,4-1,0 ml at the age of twenty one days for a broiler chicken. The research has been proved that this remedy doesn't affect the chickens' health, on contrary it has a good influence on the improvement of the proteosynthetic function of the liver.

Key words: Remedy BioR, broiler chickens, avicol factory, spirulin platensis, proteosynthetic function

În ultimii ani, atât pe plan internațional, cât şi național se studiază tot mai intens aspectele legate de elaborarea, testarea şi utilizarea preparatelor biologic active în diverse ramuri ale zooveterinăriei, prioritate acordându-se celor de origine naturală şi inofensive pentru om şi animale (3, 8, 9, 15, 19).

În acest context rezultate pozitive au fost semnalate la utilizarea mannanoligozaharidelor fosforilate (BioMos), ingredient natural obținut din unele tulpini de drojdie (7) şi care au fost testate pe porcine şi în R. Moldova (2). De o incontestabilă actualitate şi valoare sunt cercetările consacrate elaborării şi perspectivelor aplicării în practică a unor noi remedii bioactive, obținute prin sinteză dirijată din diverse tulpini de microalge (9, 16, 17). De notat că remediul BioR obținut din Spirulina platensis influențează asupra proceselor fiziologico-metabolice la porcine (8, 16).

Din aceste considerente ne-am propus să elucidăm efectele administrării remediului BioR de origine algală asupra unor indici biochimici ai metabolismului bazal la puii-broiler în condițiile de fabrică.

MATERIAL ŞI METODE

Studiul nostru a fost realizat pe 5 loturi a câte 30 pui-broiler în condițiile fabricii avicole "Avicola Şaver", or. Bucovăț, R. Moldova. Principiul de organizare a cercetărilor cu utilizarea preparatului BioR este redat în tabelul 1.

Tabelul 1. Schema administrării remediului BioR puilor-broiler

Loturile de pui	Nr. de pui	Calea de administrare	Regimul administrării	Doza, ml	
				1 dată	2 dată
Experimental-1	30	i/mus	de 2 ori: la a 9-a şi 21-a zi de viață a puilor	0,3	0,4
Experimental-2	30	i/mus		0,4	0,6
Experimental-3	30	i/mus		0,5	0,8
Experimental-4	30	i/mus		0,6	1,0
Martor	30	i/mus		0,4 ml 0,9% sol. NaCl	0,6 ml 0,9% sol. NaCl

Remediul BioR de origine algală a fost obţinut pe cale biotehnologică în Laboratorul de Fotobiotehnologie al Institutului de Microbiologie al AŞ din R.Moldova. Preparatul BioR conţine un complex de substanţe bioactive cum ar fi: aminoacizi, în special imunoactivi, ficobiliproteine (C-ficocianina), oligopeptide, glucide, macro- şi microelemente, etc.

Pe parcursul investigaţiilor tineretul avicol a fost permanent examinat, iar la intervalul de 7-10 zile a fost cântărit în scopul elucidării indicilor bioproductivi. S-a recoltat sânge, pentru efectuarea examenului de laborator la 5 pui la a 9-a zi până la administrarea remediului BioR şi la a 41-a zi, prealabil sacrificării, de la câte 5 pui din fiecare lot.

Activitatea pseudocolinesterazei (PCE), precum şi nivelul glucozei şi ureei, a fost determinată în serul sanguin la analizorul biochimic FP-900 (firma Labsystems Finlanda), prin metoda cinetică şi fotometrică, respectiv, cu utilizarea seturilor de reagenţi ai firmei Eliteh "Franţa", conform instrucţiunilor anexate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Administrarea preparatului BioR tineretului avicol n-a provocat reacţii adverse, careva abateri în sănătatea sau dezvoltarea lor. Reieşind din faptul că acest remediu pentru prima dată a fost testat de noi pe păsări, în special pe pui este importantă elucidarea influenţei lui şi asupra unor indici biochimici a metabolismului bazal. În acest aspect, specificăm, că la testarea preparatelor bănuite cu proprietăţi biostimulatorii şi evident adaptative şi antistresorii un loc aparte revine indicilor biochimic care caracterizează metabolismul celular, îndeosebi al ficatului (8, 13, 17).

Importanţa covârşitoare a ficatului în metabolismul proteinelor este astăzi unanim recunoscută. Ficatul produce albuminele serice, factorii plasmatici de coagulare lipoproteine beta şi alfa şi un şir de glicoproteine cu funcţii importante. Un rol esenţial aparţine şi PCE, enzimă hepatică care constituie un test de apreciere a funcţiei proteosintetice a ficatului (1, 5, 8).

Importanţa aprecierii nivelului glicemiei constă în aceea că glucoza îndeplineşte funcţii metabolice importante în organism – ea nu numai că serveşte sursă energetică de bază, dar este, de asemenea, implicată în diverse procese plastice (sinteza glicoproteinelor, glicozaminogliconilor, acizilor nucleici etc.).

Ureea este produsul final al metabolismului azotic care se sintetizează în ficat şi se formează în urma catabolismului proteinelor şi aminoacizilor.

Rezultatele privind determinările PCE, glucozei şi ureei serice sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Valorile medii ale unor indici biochimici în serul sanguin la puii-broiler la administrarea preparatului BioR

Loturile de pui	Nr. de pui	Pseudocolinesteraza, UI/l	Glucoza, mmol/l	Ureea, mmol/l
La debutul cercetărilor	5	1846,5±124,28	6,43±0,69	2,05±0,28
Martor	5	1137,78±51,01***	6,89±0,50	0,69±0,04**
Experimental-1	5	1610,0±103,79**	6,72±0,24	1,58±0,08***
Experimental-2	5	1282,5±50,32	6,51±0,59	0,96±0,06**
Experimental-3	5	1350,6±174,45	6,77±0,18	0,96±0,28
Experimental-4	5	1419,1±174,77	6,71±0,11	1,45±0,14***

Notă: ** p<0,01; *** p<0,001

Aşa cum se observă din tabelul 2, nivelul bazal al PCE la puii-broiler în serul sanguin, la a 9-a zi de viaţă, până la administrarea remediului testat (intacţi) constituie în medie 1846,5±124,28 u/l.

Din datele prezentate în tabelul 2, constatăm că la a 41-a zi, prealabil sacrificării, nivelul funcţional al PCE determinat în toate loturile de animale, manifestă o tendinţă de scădere, fiind mai pronunţat în cel de referinţă (p<0,001). S-a constatat că remediul BioR contribuie la stoparea declinului PCE la puii din loturile experimentale, unde acest parametru depăşeşte cu 12,7-41,5% valorile lotului martor (p<0,01). Rezultate

similare au fost obţinute şi în cazul testării acestui produs pe şobolani şi porcine în diverse stări fiziologice (Macari V., 2000, 2003; Macari V., Donică, Gudumac V., 2008; Rudic V., ş.a., 1995). Astfel, remediul testat influenţează pozitiv funcţia proteosintetică a ficatului şi posibilităţile de adaptare metabolică la nivelul hepatocitelor.

O informaţie mai amplă despre starea fiziologică a păsărilor oferă şi nivelul glucozei în sânge. În cercetările noastre (tabelul 2) s-a constatat că nivelul glicemiei la puii-broiler cu vârsta manifestă o tendinţă de diminuare, fiind mai mare în lotul martor cu 7,1% faţă de nivelul bazal, fapt semnalat de unii cercetători la purcei şi alte specii de animale (Macari V., 2003; Павалюк П.П., 1999; Холод В.М., Ермолаев Г.Ф., 1988).

Remediul BioR administrat tineretului avicol de 2 ori consecutiv, conduce la o diminuare moderată a glicemiei la toate loturile experimentale cu 1,7-5,5% faţă de lotul de referinţă. Această diminuare neînsemnată a glicemiei poate fi explicată prin intensificarea utilizării glucozei de către ţesuturi în perioada intensivă de creştere a puilor-broiler, fapt ce denotă efectul pozitiv al remediului BioR asupra metabolismului glucidic în special şi asupra organismului în general.

Un rol important în realizarea efectelor pozitive ale produsului testat la nivel molecular îl poate avea şi modificările ureei în sânge, înregistrate în experienţele noastre la administrarea remediului BioR şi care reflectă direct derularea metabolismului proteic şi contribuie la creşterea rezistenţei generale a organismului (Кричевская А.А., и.др., 1978; Ţurcanu Şt., 2006).

În tabelul 2 sunt prezentate valorile medii ale uremiei, analiza cărora scoate în evidenţă diminuarea lor cu vârsta, prealabil sacrificării, mai pronunţată fiind în lotul martor ($p<0,01$), particularitate de vârstă semnalată de unii cercetători pe tineretul porcin în creşă (Macari V., 2003) şi la alte specii de animale (Холод В.М., Ермолаев Г.Ф., 1988).

Din datele redate în tabelul 2 reiese că la a 41-a zi, prealabil sacrificării, nivelul ureei în serul sanguin în toate loturile experimentale 1, 2, 3 şi 4 depăşeşte de 1,4-2,3 ori valorile lotului de referinţă ($p<0,001$). Aceste valori mai mari ale uremiei, în loturile experimentale, după opinia noastră, pot fi considerate benefice, relevând intensificarea funcţiei ficatului şi tangenţional o rezistenţă naturală mai bună, lucru confirmat de noi în urma studiului indicilor hematologici la puii-broiler trataţi cu remediul BioR (Macari V., Putin V., ş.a., 2008; Макарь В., Путин В., 2008).

Rezultatele obţinute au relevat faptul că remediul BioR administrat puilor-broiler a influenţat pozitiv funcţia proteosintetică a ficatului în special şi metabolismul proteic în general, precum şi intensificarea utilizării glucozei de către ţesuturi în perioada intensivă de creştere a puilor-broiler.

CONCLUZII

1. Remediul BioR obţinut prin tehnologii moderne din Spirulina platensis, administrat puilor-broiler de 2 ori consecutiv are o toleranţă locală şi generală foarte bună.
2. S-a demonstrat experimental, în condiţii de fabrică avicolă, că produsul BioR administrat intramuscular tineretului avicol contribuie esenţial la îmbunătăţirea funcţiei ficatului şi, în special, a celei proteosintetice.
3. Rezultatele obţinute impun necesitatea continuării cercetărilor referitor la influenţa remediului BioR asupra altor laturi ale metabolismului puilor-broiler, privind optimizarea dozei şi regimului de administrare.

BIBLIOGRAFIE

1. Baciu E. Aspecte metabolice ale proceselor reparative în ficat la regresia cirozei hepatice experimentale şi efectele administrării trifluoracetatului de zinc cu γ-picolină / Autoreferatul tezei de doctor în ştiinţe biologice. – Chişinău, 2001. – 24 p.
2. Bălănescu S., Holban D., Chiosa A., Savtiuc V. Efectul administrării produsului SEL-PLEX în profilaxia diareei neonatale la purcei // Rezumatele Simpozionului a 140 ani Alma mater Veterinaria Bucurescensis. – Bucureşti: Ed. ALL, 2001. – P. 19.

3. Curcă D., Constantinescu I., Pantă L., Bogdan A. Modificări sanguine după efort susținut la caii româneşti de sport a căror hrană a fost suplimentată cu seleniu // Rezumate. Al X-lea Congres Național de Medicină Veterinară, 18-21 septembrie 2007, Poiana Braşov, România, 2007. – p. 164-166.
4. Holod V.M., Ermolaev G.F. Spravocinic po veterinanoi biohimii / Mn.: Eradjai, 1988. – 168 s.
5. Kolk S.A., Van Der, Wisse H., Duk S. Von. Inhibition of pseudocholinesterase activity in a 20-year old gelding //Veterinary record. – 1995. – 137, N 22. – P. 564-565.
6. Kricevskaia A.A., Lucaş A.I., Şugalei V.S., Mocevina i arghinin – prirodnâe metabolitî, povîşaiuşie rezistentnosti organisma k deistviu stressornâh factorov // Stress i adaptația: Tez. Vsesoiuz. Simpoziuma – Chişinău: Ştiința, 1978. – S. 179-180.
7. Lyons P. Globalizarea industriei alimentare şi de nutreţuri: cine va fi ținta marketingului acum? // The food revolution. Bucureşti: Ed. Coral Sanivet, 2000. – P. 59-69.
8. Macari V., Aspecte fiziologico-metabolice ale acțiunii preparatului BioR de origine algală asupra organismului animal / Autoref. tezei de dr. hab. În biologie. – Chişinău, 2003. – 48 p.
9. Macari V., Buza V., Gangal N., Balan I., Vrâncean V., Donea V. Bazele zooveterinăriei / Chişinău: Centrul editorial al UAŞM, 2002. – 188 p.
10. Macari V., Donica A., Gudumac V., Influența remediului BioR asupra pseudocolinesterazei în serul sanguin la tineretul porcin alimentat cu rații carențate. Luct.şt., vol. 51 (10). Medicină Veterinară, partea I. Iaşi, 2008. – p. 87-89.
11. Macari V., Putin V., Macari Ana, Pozdârcă E., Manifestările indicilor hematologici la puii-broiler tratați cu remediul BioR. Lucr. şt., vol. 51 (10). Medicină Veterinară, partea I. Iaşi, 2008. – p. 90-92.
12. Macari V.I., Putin V.N. Vlianie biostimuliatora na ghematologhiceschie pocazateli țâpleat broilerov // Agrarnâi vestnik priciornomoria: Cbornic Haukovâh praț. – T. 42, ciasti 1. – Odessa, 2008. – S. 34-38.
13. Pârvu Gh., Coste H., Costea M. Nutriția, răspunsul imun şi sănătatea animalelor. – Bucureşti: Ed. Ceres, 1996. – 160 p.
14. Pavaliuc P.P. Vozrastnâie ocobennosti vliania odinocinâh i combinirovannâh stress-factorov na stress-rezistentnosti i adaptativnâe sposobnosti poroseat v rannem postnatalinom ontogheneze // Stress, adaptația i funcționalinâie naruşenia i sanocreatologhia. – Chişinău, 1999. – S. 102-110.
15. Popescu D., Brad G., Viitorul naturist al creşterii puilor de carne şi eficiența economică a utilizării probioticelor în alimentația acestora // Rezumate. Al X-lea Congres Național de Medicină Veterinară, 18-21 septembrie 2007, Poiana Braşov, România, 2007. – p. 222-223.
16. Rudic V., Cojocari A., Cepoi L., Chiriac T., Rudi I., Gudumac V., Macari V., Codreanu S. ş.a. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale şi realizări practice / Chişinău: s.n. 2007 (Tipografia "Elena V.I." SRL). – 365 p.
17. Rudic V., Gudumac V., Popovici M. Fotobiotehnologie – realizări noi în biomedicină / Chişinău: Cuant, 1995. – 207 p.
18. Rudic V., Macari V., Gudumac V. Influența remediului BioR-S1 asupra nivelului funcțional al pseudocolinesterazei în serul sanguin la tineretul porcin // Anale ştiințifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria „Ştiințe chimico-biologice". Chişinău. 2000. – p. 47-49.
19. Sandul P.A. Ăffectivnosti primenenia broileram conțentrata vitaminov E i F uz rapsovogo masla // Ucennîe zapiski. Haucino-prakticeskii jurnal. – Vitebsk. – T. 43. – Vâpusk 1. – 2007. – C. 210-212.
20. Țurcanu Şt. Fiziologia animalelor domestice. – Chişinău: Centrul Editorial al UAŞM, 2006. – 600 p.

MICROCLIMATE PARAMETERS MONITORISATION IN A CLOSED CICLED FARM WITH PRDC

RADOI I.[1], STAICU ELENA[1], IONITA L.[1], TUDOR N.[1]
Faculty of Veterinary Medicine, Bucharest

The researches were conducted in a closed cycled pig farm from Romania. The pig categories that were taken in to consideration were represented by fattening pigs of 10-14 weeks old and 14-21 weeks old, and also by young sows for reproduction. When the studies were conducted the farm was making some improvements on here ventilation system, something that aloud us to make a compare between the impact of the natural ventilation system and thus of computer assisted ventilation system.

The factors taken into consideration here are physical factors, the chemical factors and the biological air parameters, total number of bacterial germs (NTG) and total number of fungus (NTF) from the shelters air. All the collected data were correlated to the porcine respiratory disease complex (PRDC) incidence in the pig herd.

In the shelters of young sows, with computer assisted ventilation the number of morbidities due to the evolution of PRDC, decreased by approximately 1,68 times. Also in the shelters with computer assisted ventilation the number of mortalities due to the evolution of PRDC, decreased by approximately 1,87 times.

For the fattening pigs was also noticed a decrease of the PRDC incidence in the assisted computer ventilation system, compared to the natural one, in both pig categories with 2,13 times for morbidity and of 1,51 times for mortality.

Key words: microclimate, fattening pigs, young sows, PRDC

In the last period of time many of the Romanian pig farms with intensive rearing system, took a lot of decision in order to improve the quality of shelter environment, complying with the Five Freedom of the Animals. Under the influence of environmental factors the body swine suffers a lot of changes in order to adapt to its environment. The importance of this fact results from the impact that these factors have upon the swine health, welfare and production. The quality of this microclimate or that of the shelter environment is related to the factors that make it, like chemical factors, physical factors and biological factors. The research took place intro a swine farm, with close circuit, that changed, partially the natural ventilation system with the computer assisted ventilation system.

MATERIALS AND METHODS

The researches took place in a Romanian farm with close cycle, in 10 shelters, 6 shelters for fattening pigs and 4 shelters for young sows. The six shelters for fattening pigs were selected in this manner: 1 shelters with pigs of 10 -14 weeks old, and 2 shelters for pigs of 14-21 weeks with natural ventilation, and 1 shelters with pigs of 10 -14 weeks old, and 2 shelters for pigs of 14-21 weeks with computer assisted ventilation system. The 4 shelters for young sows were selected like this: 2 shelters with natural ventilation system, shelters A and B, and two shelters with computer assisted ventilation system, shelters C and D.

The factors taken into consideration here are physical factors like temperature, relative humidity and noises and the chemical factors like carbon dioxide, ammonia and hydrogen sulphide, and the biological air parameters, total number of bacterial germs (NTG) and total number of fungus (NTF) from the shelters air.

In order to establish the levels of physical and chemical factors, it was used the Dräger Miniwarn multi gas detector for CO_2, NH_3, H_2S, the sound meter BK 2250 and the Multifunctional LM 8000 for temperature and relative humidity.

In case of the biological air parameters we have used the passive sedimentation of air in plates methods. For this purpose we used plates with agar and Sabouroud media, which were exposed in pig houses for 3 minutes.

The obtain date were correlated with the incidence of porcine respiratory disease complex (PRDC). The diagnostic for porcine respiratory disease complex (PRDC) was made based on the clinical and laboratory investigations and on the necropsy examination of dead sows, in witch case was identify characteristic lesions of the respiratory tract.

RESULTS AND DISCUSSIONS

One of the most important air physical parameter is the temperature. The importance of this parameter comes from the influence that has over the levels of other microclimate factors like humidity, gases, dust. In the shelter for young pigs, 10 -14 weeks old, with natural ventilation, the value of temperature was higher from the maximal admitted one, with 9° C, and with 7° C in the finishing pigs, of 14-21 weeks old.

In case of the young sows the temperature reiterated an exceeding of 7 time, in one shelter and of 4,5 time in the second one, but in the shelters with computerised ventilation system the values were in normal limits.

The relative humidity is in the normal limits, but still is tending to the superior limit, in the 10 – 14 weeks old pigs, and in the 14 -21 weeks old pigs the normal limits exceeds with 7 %. For the young sows in natural ventilation the exceeding of the maximum limit is of 8% and 6 %, but in the computerised ventilation system the values were in the normal limits.

The noise also exceeds the normal limits in both age categories, for the natural ventilation system.

All these facts are presented in table 1.

Table 1

The comparative average values of the physical factors

Shelter	Assessed parameters					
	Temperature (°C)		Relative humidity (%)		Noises (dB)	
	I	II	I	II	I	II
Pigs 10-14 weeks old	28,8	18	75	48	91	78
	21,9	21	70,7	54	89,2	60,3
Pigs 14-21 weeks old	23,2	18,3	79	63	86,7	72,5
	23,6	19,1	77	67	94,2	66,7
	27	20	82	14	91,5	70,5
	22,2	19,9	51,6	55	90	69,7
Normal limits for fattening pigs	17° - 20° C		55-75 %		80 – 90 dB	
Shelter A	25	-	78	-	94,5	-
Shelter B	22,5	-	76	-	92	-
Shelter C	-	18	-	67	-	72,5
Shelter D	-	16,7	-	63	-	78
Normal limits for young sows	15°-18° C		60-70%		80 – 90 dB	

Legend: I – natural ventilation

II - computer assisted ventilation system

Regarding the chemical factors the normal ammonia gas level of 26 ppm is exceeded with 11 ppm, around 1.42 times, in young pigs shelter, and with 23,7 ppm, approximately 1,91 times, for finishing pigs, in the natural ventilation. For the young sows also it was registrated an exceeding of 1,8 times in one shelter and of 1,3 times for the second one. The H_2S gas also exceeded the normal limit, 10 ppm for fattening pigs and of 13 ppm for young sows, in the natural ventilation, with 1,62 ppm young pigs and 5 ppm in finishing pigs, and with 1,07 times in the shelters for young sows. The dates are presented in table 2.

Table 2

The comparative average values of the chemical factors

Shelter	Assessed parameters					
	CO_2 (ppm)		NH_3(ppm)		H_2S (ppm)	
	I	II	I	II	I	II
Pigs 10-14 weeks old	3000	3000	37	7	0	0
	3000	3000	21	14,5	11,62	3,62
Pigs 14-21 weeks old	3000	3000	49,7	25	7.5	1,09
	3000	3000	45,1	14	7,73	1
	3000	3000	21	14,3	15	0,92
	3000	3000	36,1	17	13,96	1,69
Maximal limits admitted	3000 ppm		26 pmm		10 ppm	
Shelter A	3000	3000	49,1	-	13,94	-
Shelter B	3000	3000	35,2	-	14	-
Shelter C	3000	3000	-	16,7	-	11,54
Shelter D	3000	3000	-	16,3	-	7,62
Normal limits for young sows	3000 ppm		26 pmm		13 ppm	

Legend: I – natural ventilation

II - computer assisted ventilation system

The exceeding of maximum limits for the microclimate physique-chemical parameters, in natural ventilation, caused a physiologic unbalance of the pig's body. This caused an immunity decrease, making a perfect environment for the pathogens at different levels, but especially at the respiratory system. This situation was favourable to the biological air parameters, total number of bacterial germs (NTG) and total number of fungus (NTF) that found a favourable medium in the lungs of the pigs. In table 3 are presented the dates for NTG and NTF, registrated in shelters with natural ventilation system and with computer assisted ventilation system for young sows. In shelters with natural ventilation system for young sows the limit of 250. 000 UFC/m^3 was exceed by 2,52 times, in shelter A, and by 2,12 times for shelters B. The introduction of computer assisted ventilation system, proved ones again to be a success do to the lower values obtained.

Table 3

The comparative average values of the biological factors for young sows

Place of determination	Assessed parameters			
	NTG UFC/m^3		NTF UFC/m^3	
	Shelter A	Shelter B	Shelter A	Shelter B
Natural ventilation system	631.921	532.020	2532	2631
Computer assisted ventilation system	Shelter C	Shelter D	Shelter C	Shelter D
	245.000	185.894	1998	2355
Normal limits	250.000		12.500	

In table 4 are presented in the same pattern the dates for fattening pigs. When the natural ventilation was on, we observed an exceeding values of 2,29 times, for the first category, pigs of 10-14 weeks old, and also for the second one, pigs of 14-21 weeks old, of 2,16 times in one shelter and of 1,95 times in the second one. Like the others microclimate parameters the biological one reiterated normal values in the computer assisted ventilation system.

The NTF values for booth pigs categories and ventilation system was in normal limits.

Table 4
The comparative average values of the biological factors for fattening pigs

Place of determination	Assessed parameters					
	NTG UFC/m^3			NTF UFC/m^3		
	Pigs 10-14 weeks old	Pigs 14-21 weeks old		Pigs 10-14 weeks old	Pigs 14-21 weeks old	
Natural ventilation system	573812	542120	489854	2771	1997	2654
Computer assisted ventilation system	245000	244322	231510	1977	1817	1653
Normal limits	250.000			12.500		

All these facts are demonstrated due to the increase level of morbidity in the herd, based on the health observation by necropsy test.

The incidence of morbidity and mortality in fattening pigs and young sows for reproduction, according to the system of ventilation used in the shelters, natural or computer assisted system is presented in table 5 and 6.

In table 5 it can be observe the incidence of PRDC in the shelters with natural ventilation in a period of 6 month, from January to June. As the dates are showing the incidence of PRDC was of a 575 cases in fattening pigs and of 267 cases in young sows, figures that were higher in the first three month, in booth categories. The number of mortalities in the shelters with natural ventilation was of 260 cases for young sows and 710 cases for fattening pigs.

Table 5
The PRDC incidence evolution over 6 month in natural ventilation

No.	Morbidities January – March		Morbidities January – March do to PRDS		Mortality January – March		Mortality January – March do to PRDS	
1.	Young sows	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs
	441	1026	201	480	436	1426	222	618
2.	Morbidities April - June		Morbidities April - June do to PRDS		Mortality April - June		Mortality April - June do to PRDS	
	172	244	66	95	83	235	38	92

Comparing this number with the ones from the shelters with computer ventilation, presented in table 6, it can be notice an improvement in the health of the animals. Referring to the health of the pigs, the

incidence of morbidities do to the PRDC evolution, has decrease about 1,68 times for the young sows and about 2,13 times for fattening pigs. The number of mortalities was lower in the computer-assisted ventilations than in the natural one. The dates show a reduction of approximately 1,51 times for fattening pigs and of 1,87 times for young sows.

Table 6
The PRDC incidence evolution over 6 month in computer ventilation

No.	Morbidities January – March		Morbidities January – March do to PRDS		Mortality January – March		Mortality January – March do to PRDS	
1.	Young sows	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs
	251	214	112	203	228	396	106	222
2.	Morbidities April - June		Morbidities April - June do to PRDS		Mortality April - June		Mortality April - June do to PRDS	
	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs	Young sows	Fattening pigs	Young sows
	104	112	46	66	69	64	33	38

We need to mention that, regarding of the ventilation system, in all the shelters included in the study, the same sanitary, prophylactic measurements were taken. At the necropsy examination lesions of PRDC were identify.

CONCLUSIONS

1. All the microclimate factors, physical, chemical and biological factors, registrated an exceeding of the normal limits in booth pigs categories, in the shelters with natural ventilation.
2. In case of the young sows the temperature reiterated an exceeding of 11,5 time, for all shelters, and for pigs of 10 -14 weeks old, the temperature was with 9° C and with 7° C in the finishing pigs, of 14-21 weeks old, higher from the maximal admitted one.
3. The ammonia gas, one of the chemical factors, registered higher values and thus normal limits in assist computer ventilation system, cooperated to the natural ventilation system where most of the registered values were over the higher accepted limits.
4. In shelters with natural ventilation system for young sows, the limit of NTG of 250.000 UFC/m^3 was exceed by 2,52 times, in shelter A, and by 2,12 times for shelters B, and for fattening pigs the limit was exceeded by 4,11 times.
5. The total number of fungus, NTF, in both tips of ventilation system was on hygienically norms.
6. The incidence of morbidity do to the evolution of PRDC, decrease by aproximally 1,68 times for young sows and by 2,13 times for fattening pigs, in case of computer assisted ventilation system use.

7. The mortality registrated in shelters with computer assisted ventilation system were lower than the ones from the shelters with natural ventilation, by aproximally 1,51 times in case of fattening pigs and by 1,87 times in case of young sows.
8. The improvement of life quality of the pigs, by introducing the computer assisted ventilation, proof to be of great help, improving the level of all microclimate factors, physical, chemical and biological factors, but also the health of the pigs.

REFERENCES

1. Donald M Broom – Science, ethics and public concern about welfare, In Proceedings of the Fourth European Colloquium on Acute Phase Proteins, Segovia, Spain, 83-89.
2. Decun Mihai – Etologia, bunastarea si protectia animalelor, Editura Mirton, Timisoara, 2004.
3. Fraser D. & Weary D.M. – Quality of life for farm animals: linking science, ethics and animal welfare.

I. Radoi – Ghid practic de supraveghere nutritional-metqabolica si activitate in clinica suinelor, Editura Asclepius, Bucuresti, 2008

4. Bernard E. Rollin – Farm Animal Welfare, Social, Bioethical and Research Issues, Iowa State University Press 2003.
5. Teusdea Valer – Igiena veterinara vol. I: Factorii naturali de mediu si inluienta lor asupra animamlelor, Editura Printech, Bucuresti 2001.
6. Teusdea Valer – Bunastarea si protectia animalelor, Editura Omega Print, Bucuresti, 2005.

A. Velarde, R. Geers – On farm monitoring of pig welfare, Wageningen Academic Publishes 2007

CERCETĂRI PRIVIND VARIAȚIA UNOR PARAMETRII AI MEDIULUI INTERN LA BOVINE ACHIZIȚIONATE DE PE PIAȚA UNIUNII EUROPENE ÎNTR-O FERMĂ DIN JUDEȚUL DOLJ

RESEARCH REGARDING THE VARIATION OF SOME BIOLOGICAL PARAMETHERS IN COWS PURCHEASED FROM THE EU – IN A FARM IN THE DOLJ COUNTY

RETEA C.[1],, IONITA L.[2], ORASANU ADRIANA[3], RETEA GENICA[4]
[1]Direcţia Sanitară Veterinară şi pentru Siguranţa Alimentelor Dolj
[2]Facultatea de Medicină Veterinară Bucureşti
[3]Institutul de Diagnostic şi Sănătate Animală Bucureşti
[4]Circumscripţia Sanitară Veterinară Bratovoieşti, Dolj

A variety of factors are responsible for individual and herd variation in blood enzyme activity, hormonal and matabolite concentrations. In addition, the cow has an system of checks and balances, wich maintains normal physiologic function within a wide array of dietary and enviroment conditions. As a result of these physiologic regulatory mechanism, simple blood concentration analysis has not beenn highly rewarding in accurately assessing nutitinal, adaptation and fertility status of a cow.A new approach to metabolic profiling, wich involves pooling larger sample numbers, specific animals selection relative to physiologic state and stage of lactation has been examined in an effort to better interpret serum enzyme activity, serum hormonal and metabolite concentrations on a herd basis. The objective of the study was to determine variations of some internal parameters in a commercial dairy farm with cows acquisition from European Union in Dolj district.This paper presents the variations in serum gamma-glutamyltransferase(GGT), gluocose, total protein and beta-caroten concentrations in prepartum and postpartum Holstein dairy cows.Significant differences were noted in total protein glucose and GGT. Metabolic profiles were coupled with animal facility evaluations, body condition score and ration evaluation. This approach is an useful diagnostic tool in nutritional evaluations of the dairy herd.

Key words: beta-caroten, gamma-glutamyltransferase, metabolic profile, postpartum, total protein

La sfarsitul perioadei de gestatie sistemul neuro hormonal declanseaza procesele fiziologice de pregatire a organismului animal pentru fatare.Fatarea este evenimentul cel mai important in viata productiva a unei vaci.Mai multi factori si interactiunea unor factori cum sunt nutritia, metabolismul, productia de lapte si managementul afecteaza starea de sanatate la vacile de lapte

Spre sfarsitul perioadei de gestatie si mai ales la inceputul lactatiei sistemul imuno endocrin al vacii intensifica procesele de gluconogeneza, glicoliza si lipolizapentru acoperirea nevoilor crescute de energie si mai ales de glucoza necesara sintezei lactozei din lapte.Vacile cu productii mari de lapte in sistemele intensive de producere al laptelui, intensifica utilizarea depozitelor de grasime proprie rezultand o balanta energetica negativa (BEN) BEN are efectv negativ asupra sanatatii. Cunoscandu-se mediul intern si mai ales dinamica unor metaboliti in asociere cu statutul energetic sau proteic cat si corelatiile dintre acesti metaboliti putem realiza un nivel acceptabil de sanatate si productivitate animala.

Testarea sangelui luat individual de la animale a fost si este folosit pentru diagnosticul unor boli la taurinele de lapte. Testele de profil metabolic (TPM) se refera la utilizarea unor teste de diagnostic al bolilor subclinice nutritionale sau metabolice la vacile de lapte le nivel de efectiv. În general sangele de la 5-7 animale pe fiecare grupa de productie este testat biochimic si hematologic.

TPM este cel mai mult folosit in diagnosticul si managementul bolilor antepartum si postpartum la vacile de lapte. TPM monitorizeaza sanatatea metabolica a unui efectiv de animale, este un instrument de diagnostic al problemelor metabolice si al bolilor de productie si identifica vacile cu metabolism superior.

Prelucrarea datelor rezultate din profilul metabolic presupune calcularea mediilor si determinarea schimbarilor dinamice pe perioada determinata. Costul acestei abordari este destul de mare(peste 100 RON pe animal). Ne propuneam in studiul initial si o alta abordare. Amestecarea sangelui de la 10 animale apropiate fiziologic si determinarea parametrilor.

Partea negativa a acestei abordari este neposibilitatea realizarii evaluarilor statistice, in special analiza variantei la nivel de populatie.

Obiectivul acestui studiu a fost de a determina variaţiile unor parametri interni la vaci achiziţionate de pe piaţa Uniunii Europene într-o fermă comercială din judeţul Dolj. În această lucrare sunt prezentate variaţiile serice ale concentraţiilor gama-glutamiltransferazei(GGT), glucozei, proteinelor totale si beta-carotenului prepartum si postpartum la vacile Holstein.

MATERIAL SI METODE

Studiul a fost efectuat intr-o ferma comerciala cu vaci de lapte din judetul Dolj. Au fost achizitionate juninci din mai multe tari europene:Estonia, Franta, Cehia, Ungaria şi Germania in anii 2006-2007.

Au fost adaptate adaposturi cu stabulatie libera prevazute cu cusete individuale si paturi de odihna din saltele de poliuretan acoperit cu panza da cauciuc. Aleile de circulatie a animalelor sunt din beton cu raclarea de doua ori pe zii a dejectiilor. Programul de nutritie a fost intocmit de mai multe firme de nutritie. Mulsul se efectua centralizat intr-o sala cu 2x16 locuri in sistem paralel,cu inregistrarea si prelucrarea automata a datelor,cu program de management si poarta de selectie electronica. Fluxul tehnologic asigura intrarea si iesirea animalelor in urmatoarele grupe de productie:grupa animalelor gestante 21-0 (prepartum), grupa animalelor 0-21 postpartum),grupa animalelor 21-120 zile de lactatie, grupa animalelor peste 120 de zile de lactatie si grupa animalelor gestante in repaus mamar.

Au fost recoltate probe de sange din vena jugulara si vena sau artera coccigiana in vacuteste 9 ml si vacuteste 6 ml cu EDTA de la urmatoarele categorii de animale:grupa animalelor prepartum 21-0,grupa animalelor fatate recent 0-21 si grupa animalelor in lactatie 21-40.

Ratia furajera pentru aceste grupe era o ratie total amestec (RTA) cu concentratia energetica de 4,8;5,1;5,7 MJ/kg si concentratie proteica de 12,2;14,5 si 14,6%

La fiecare 10 zile era apreciata conditia corporala individuala dupa scara in 5 puncte EDMONDSON cu diviziuni la sfert de punct (Edmondson et all .1989)

Insamantarea artificiala a animalelor se efectua dupa 60 de zile postpartum (postp.). Consumul de furaje a fost estimat prin observatii zilnice.Probele de sange au fost analizate la Institutul de Diagnostic si Sanatate Animala Bucuresti (IDSA). Au fost efectuate teste hema-tologice cantitative si calitative si teste biochimice.In aceasta lucrare sunt prezentati urmatorii parametrii: concentratia din sange a proteinelor totale, a glucozei,a gamaglutamiltransferazei si a betacarotenului

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conditia corporala. Nota medie a conditiei corporale la intrarea junincilor in grupa 21-0 (prepartum-prep), a fost de 3,73. Dupa 10 zile aceasta a urcat la 3,83. Dupa fatare nota scade destul de accentuat astfel ca la 30 de zile postp ajunge la 2,25 iar la 40 de zile 2,53 (figura 1).

Concentratia proteinelor totale

In prezent nu exista un singur metabolit care sa fe masurat si sa reflecte statusul proteic al unui anumal.Ca urmare se folosesc mai multi parametri incluzand aici proteinele totale, albumina, azotul ureic din sange, creatinina. Proteinele totale si albumina reflecta disponibilul de proteina iar concentratia lor scade cand apar deficiente nutritionale. Concentratia proteinelor totale este prezentata in tabelul numarul 1.

Tabelul 1

Valorile medii ale unor parametrii studiati(media,deviatia standard)

Parametrul	21-0 prep	0-21 postp	21-40 lactatie
Proteine totale(g/dl)	6,73±0,12	6,75±0,13	6,90±0,11
Glucoza(mg/dl)	29,5±13,99	37,66±15,20	51,21±18,07
GGT media (U/L) minim-maxim	55 25-114	131 30-246	54,76 10-286
Betacaroten(y/dl)	-	88	71,4

Glucoza

Media concentratiilorglucozei din sange este prezentata in tabelul 1.Masurarea glucozei nu ofera exact statusul energetic intrucat concentratia glucozei din sange este strans legata de regularizarea homeostatica.

Gamaglutamiltransferaza (GGT)

Este o enzima produsa in principal de ficat si catalizeaza glutationul, principalul antioxidant din organism. Prezenta ei in plasma este semnificativa cand apar boli ale sistemului hepatobiliar. Activitatea ei este accentuata in ficatul vacilor,cailor,oilor si caprelor (Tenant 1997 citat de Stojevic 2005). Concentratiile GGT sunt pe cele 3 grupe studiate,sunt prezentate in tabelul 1.

Betacarotenul

Este un carotinoid prezent in tesuturile plantelor fiind sursa principala de vitamina A. Are efect antioxidant si influenteaza functia de reproductie si a tiroidei. 1mg de betacaroten este echivalent cu 400UI de vitamina A. O vaca are nevoie de 0,18 mg betacaroten/kg/zi. Concentratia betacarotenului este prezentata in tabelul 1.

Concentratia proteinelor totale

In prezent nu exista un singur metabolit care sa fe masurat si sa reflecte statusul proteic al unui anumal.Ca urmare se folosesc mai multi parametri incluzand aici proteinele totale, albumina, azotul ureic din sange, creatinina. Proteinele totale si albumina reflecta disponibilul de proteina iar concentratia lor scade cand apar deficiente nutritionale. Concentratia proteinelor totale este prezentata in tabelul 1.

Tabelul 1

Valorile medii ale unor parametrii studiati(media,deviatia standard)

Parametrul	21-0 prep	0-21 postp	21-40 lactatie
Proteine totale(g/dl)	6,73±0,12	6,75±0,13	6,90±0,11
Glucoza(mg/dl)	29,5±13,99	37,66±15,20	51,21±18,07
GGT media (U/L) minim-maxim	55 25-114	131 30-246	54,76 10-286
Betacaroten(y/dl)	-	88	71,4

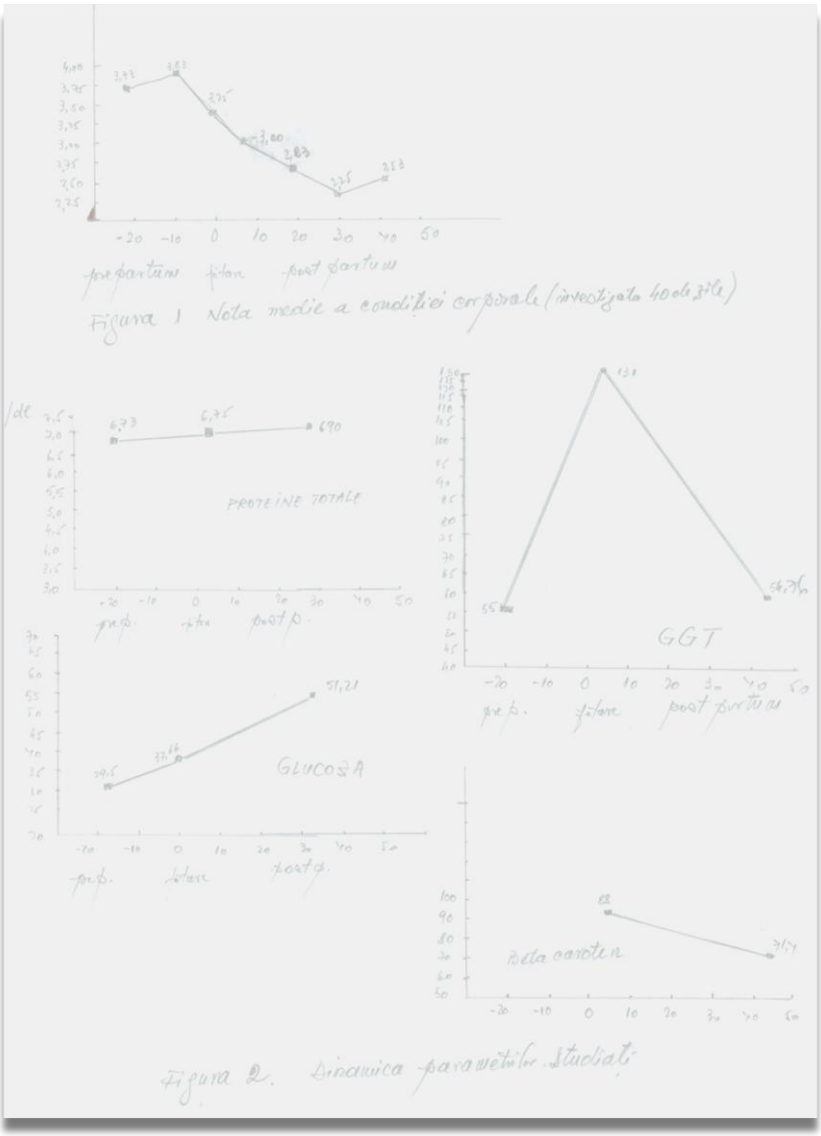


Figura 1 Nota medie a conditiei corporale (investigata 40 de zile)

Figura 2. Dinamica parametrilor studiati

DISCUTII

Dinamica concentratiilor proteinelor totale, glucozei,GGT si betacarotenului este prezentata in graficul 2.

Pe masura ce se apropie fatarea concentratia glucozei creste de la 29,5mg/dl la 37,66mg/dl dupa fatare,ca la 21-40 de zile dupa lactatie sa ajunga la 51,21mg/dl.Aceasta este in concordanta cu cele afirmate de Herdt(citat de Eliotok et all).Aceasta este asociata cu schimbarile hormonale la fatare care intensifica si mai mult gluconeogeneza si glicogenoliza.

Valorile de referinta sunt prezentate in tabelul nr.2 .Concentratiile GGT prezinta valori foarte ridicate comparativ cu domeniile de referinta din tabelul 2 si 3. Concentratiile crescute se intalnesc in: proliferari epiteliale ale canalelor biliare,perturbari colestatice, hepatopatii cronice si toxice, terapia steroidica, ciroze, fascioloze, infiltratii si carcinoame metastatice.

Deficienta de betacaroten prelungeste perioada estrala, amna ovulatia, creste mortalitatea embrionara si apar predispozitii pentru chisti ovarieni,retentie placentara, metrite,creste rata fatarilor de vitei morti,slabi sau orbi. Concentratiile betacarotenului scad iarna comparativ cu vara. O varietate de factori

sunt responsabili de variatia individuala sau la nivel de efectiv a activitatii enzimatice sau a concentratiilor unor hormoni sau metaboliti sanguini. In plus vaca are un sistem de verificari şi echilibrari care mentine functia fiziologica normala, în condiţii diferite de nutriţie si mediu. Ca rezultat al acestui mecanism regulator, simpla analiză a concentraţiilor serice al unor metaboliţi nu a fost pe deplin răsplătită în stabilirea statutului nutriţional, de adaptare sau fecunditate al unei vaci.

Tabelul 2
Valori de referinta pe stadii de productie(AHL LabNote University of Guelph Canada)

Parametrul	Vaci gestante	Vaci fatate recent	Vaci la mijlocul lactatiei
Proteine totale(g/L)	67-88	69-87	73-86
Albumina(g/L)	32-41	35-42	31-43
Globulina(g/L)	32-54	30-50	36-54
Glucoza(mmol/L)	3.5-4.4	2.6-3.5	3.0-4.0
GGT(U/L)	10-30	15-37	12-49

Tabelul 3
Valori de referinta pentru GGT

Categoria	n	Media	Deviatia standard	Referinte
Vitel 6 luni	11	10.7	2.8	Findeisen 1972
Juninci 2-1/2	16	15.1	3.6	Findeisen 1972
Vaca 2-1/2	60	15.5	3.0	Findeisen 1972
Vitel 3-12 luni	88	17.0	4.7	Simesen et all 1974
Vaca adulta	51	26.13	8.81	Simesen et all 1974
Vaca -primavara	51	18.6	7.7	Simesen et all 1974
-toamna	32	25.9	7.2	Simesen et all 1974
Vaca adulta	111	10.8	5.3	Unglaub et all 1973
Vaca adulta	19	17.2	8.9	Meissonier et all 1976
Vaca -plasma	54	17.7	5.7	Rico et all 1977
-ser	54	18.6	6.2	Rico et all 1977
Taurine	-	de la 0 la30	-	Biochemistry Data Sheet 2005

CONCLUZII

1. Investigatiile noastre indica cresterea accentuata as valorilor GGT. Interpretarea clinica a acestor valori arata prezenta unor afectiuni.
2. Interpretarea medicala a profilului metabolic trebuie facuta cu prudenta si inglobata intrun ansamblu (examene clinice si morfologice,indici de consum,fecunditate, curba lactatiei).
3. Simpla analiza a concentratiilor serice ale unor metaboliti nu ofera pe deplin statusul nutritional ,de adaptare sau fecunditate al unui efectiv de vaci.
4. Profilele metabolice cuplate cu evaluarile privind adapostirea,conditia corporala si nutritia animalelor,constituie un instrument valoros in aprecierea starii nutritionale a unui efectiv de vaci.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Parvu Gheorghe (1992). Supravegherea nutritional metabolica a animalelor. Editura Ceres Bucuresti.
2. Robert J. Van Saun (1999). Blood Profiles as Indicators of Nutritional Status. E-mail.
3. Ryszard Mordak, Jozef Nicpon (2006). Values of some blood parameters in dairy cows before and after delivery as a diagnostic monitoring of health in herd. Volume 9.
4. XXXX. AHL LabNote May 2003, Number 4, University of Guelph Canada.

IMPLICAŢIILE SPECIEI *PASTEURELLA MULTOCIDA* ÎN LEZIUNI ORALE LA PISICĂ ŞI EXPRIMAREA CLINICĂ LA OM, ÎN PLAGĂ MUŞCATĂ

IMPLICATIONS OF SPECIES PASTEURELLA MULTOCIDA IN THE CAT ORAL LESIONS AND CLINICAL EXPRESSION OF HUMAN AT BITTEN PLAGUE

RIMBU CRISTINA[1], GUGUIANU ELEONORA[1], HORHOGEA CRISTINA[1], SINDILAR E. V.[1], SCUTARIU RAMONA[2], CARP CARARE C.[1], CARP CARARE M.[1]
[1]FMV Iaşi
[2]TRITEST Iaşi

*We have studied three cats that produced bitten plague to three different persons. At the study we made, **t**wo of the above cats had oral lesions, respectively severe gingival, but the third one was clinically healthy. Three strains of Pasteurella multocida was isolated from the oral cavity of the three incriminated cats and from the bitten plagues.*

Three persons had lesions with different clinical stages, depending on the depth of the bite. It was also observed that plagues caused by cats with oral lesions were more severe than that one produced by the healthy cat.

Based on an antibiogram data, it could be observed that the three strains of P. multocida were sensitive (with very small variations) in the amoxicillin-clavulanic acid, penicillin, erythromycin, chloramphenicol, sensitivity moderated to tetracycline, polimixina B and resistant to streptomycin.

Three strains of Pasteurella multocida was isolated from the oral cavity of the three incriminated cats and from the bitten plagues.

Key words: Pasteurella multocida, cat, oral cavity, bite, human infection

Necesitatea prezentării unor astfel de cazuri, apare din consideraţii practice, cunoscându-se faptul că muşcăturile de câini şi pisici se află pe primul lor ca frecevenţă şi gravitate. Majoritatea cazurilor nu sunt raportate, pacienţii umani apelând la medic doar în cazul apariţiei complicaţiilor, astfel încât implicaţiile epidemiologice sunt dificil de monitorizat. Pisicile care au produs aceste leziuni la om nu pot fi întotdeauna identificate. (2,3,5,7)

P. multocida este o bacterie comensală în cavităţile bucale ale mai multor specii de animale, dar în proporţii mai reduse decât cele ale pisicii, a cărei salivă o conţine în 50-90 % din cazuri (faţă de 30 % din cazuri la câini, 40 % la porci, 50% la oi şi 60 % la cai). (2,3,4,6)

Sunt bacterii mici, cocoide sau cocobacilare, nesporulate, neciliate, capsulate, Gram negative, dispuse în frotiuri de regulă izolat, uneori câte două sau în lanţuri. Unii autori susţin că habitatul real al acestor germeni este în ţesuturi, de unde sunt preluate şi recirculate la suprafaţa mucoaselor, de către macrofage.(1,8).

Germenii pătrunşi în organism se multiplică la poarta de intrare, având capacitatea de a se multiplica în ţesuturi atât extracelular cât şi intracelular îşi manifestă patogenitatea prin virulenţă, dată de microcapsulă care nu permite distrugerea pasteurelelor în interiorul fagocitului şi toxicitate datorate endotoxinelor care modifică permeabilitatea vasculară determinând apariţia de hemoragii, edeme sau leucopenie periferică, corelată cu concentrarea leucocitelor în capilarele pulmonare, fenomen care generează bronhopneumonii. Tulburările circulatorii asociate cu acţiunea necrozantă a toxinelor pasteurelice produc dermonecroză la om. (3,4,5)

La pisică, pasteureloza este sporadică dar prezenţa acestor microorganisme la nivelul cavităţii bucale, mai ales la cele supresate, induc uneori infecţii în sfera orală şi respiratorie.

Cercetările bacteriologice ale plăgilor produse prin muşcături de pisică au arătat că infecţiile cu *P. multocida* sunt mult mai frecvente decât decât cele produse de alte specii bacteriene.

La om, *P.multocida* este implicată frecvent în infecţiile produse prin muşcături produse de pisici sau prin contactul cu saliva acestora. (6,8)

Perioada de incubaţie la om este foarte scurtă, infecţia progresând rapid, (în câteva ore) (2,3,6).

Clinic, la locul muşcăturii, apare un edem roşiatic, cald, şi dureros, sunt afectaţi apoi ganglionii regionali (limfangită) urmate de tenosinovite, artrite septice, osteomielite, etc (2,3,5,7)

MATERIALE ŞI METODA

Investigaţiile s-au efectuat pe probe recoltate de la trei pisici cu proprietar. Două pisici prezentau leziuni la nivelul cavităţii bucale si o pisică era sanatoasă din punct de vedere clinic.(foto)

Utilizând tampoane sterile, au fost prelevate probe de material patologic din leziunile orale şi de pe mucoasa bucală la pisica sănătoasă, în vederea efectuării examenelor microbiologice. .Deasemenea, pentru un studiu comparativ, s-au recoltat probe şi din plăgile muşcate la indivizii agresaţi de aceste pisici. Probele recoltate au fost supuse examinării în Laboratorul de Microbiologie, din cadrul FMV Iaşi şi Laboratorul de analize umane TRITEST Iaşi.

Intrucât stomatitele de natură infecţioasă por fi produse de microorganisme potenţial potegene, răspunsul imun umoral postinfecţie poate fi evaluat prin determinarea titrului de anticorpi (IgA, IgG, IgM) şi *Complement* din serul sangvin. Pentru aceasta s-a utilizat sistemul de analiză automat CHEMWELL MANAGER 2902 a cărui principiu de lucru are la bază tehnica ELISA (tehnici *in vitro)*, sistemul având aplicaţii atât pentru medicina veterinară cât şi pentru cea umană, iar dozarea *Complementului* s-a efectuat prin sistemul de analiză IMMULITE.

Examenul bacteriologic a urmat etapele clasice de diagnostic, probele prelevate fiind etalate pe lamă şi colorate Gram şi cu albastru de metilen, urmând a fi însămânţate pe medii de cultură uzuale, pentru bacterii aerobe şi anaerobe (bulion, geloză nutritivă, mediul Kitt Tarozzi), la care s-a adaugat ser de cal pentru a satisface eventuale exigenţe nutritive şi au fost termostatate la 37^0C, timp de 24 ore. Identificarea tulpinilor de *Pasteurella* spp. izolate, s-a făcut pe baza caracterelor morfologice, culturale, biochimice şi de patogenitate.

Testarea capacităţii metabolice şi biochimice s-a efectuat pe medii politrope MIU şi TSI. Pentru testarea patogenităţii s-a efectuat bioproba pe soricei, inoculându-se subcutanat 2 ml din cultura purificată.

Testarea sensibilităţii antibacteriene a tulpinilor izolate, s-a efectuat prin metoda difuzimetrică.

Persoanele agresate prin muscături, s-au prezentat la medic, pentru investigaţii şi tratament. La sugestia acestora, s-au recoltat probe din plăgile muşcate, pentru examenul microbiologic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Au fost studiate trei pisici care au provocat plăgi muscate la persoane aflate în perimetrul acestora. Ce doua pisici cu stomatită prezentau fragilitate vasculară cu gingivită hemoragică severă şi orofaringită iar pe mucoasa orală se puteau observa abcese nodulare.(fig,1,2).

Fig.1. Cazul 1 - Gingivita hemoragică, hemoragii pe mucoasa bucală, orofaringită

Fig.2 Cazul 2 –Stomatită proliferativă cu hemoragii

La examenul bacterioscopic direct, utilizând coloraţia cu albastru de metilen, s-a constatat predominarea formelor cocobacilare, colorate bipolar.

Ca urmare a însămânţării probelor prelevate, pe medii de cultură, s-au dezvoltat pe agar colonii de dimensiuni mici, semitransparente, de tip S, nepigmentate iar în mediul lichid s-a constatat turbiditate moderată, şi formarea în timp, a unui sediment aderent pe fundul tubului şi care, prin agitare, se ridica sub forma unui tirbuşon.

Microscopic, în frotiurile din culturile obţinute şi colorate Gram, au fost observaţi coci şi cocobacili,0,3-1/1-2μm, nesporulaţi, Gram negativi, fără aşezare caracteristică. (Fig. 2)

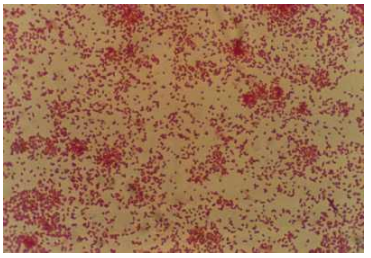


Fig.3 Pasteurella multocida, coloraţie Gram (90x10)

Testele biochimice pe MIU şi TSI au relevat: indol (+), uree (-), lactoza (-), glucoza (+), H_2S (+), mobilitate (+).

Coroborarea aspectelor culturale, morfologice şi biochimice au încadrat tulpinile izolate ca fiind *Pasteurella multocida*.

Pe baza antibiogramelor efectuate s-a constat ca cele trei tulpini de *P. multocida* erau sensibile (cu foarte mici variaţii) la amoxicilin-acid clavulanic, penicilina, eritromicina, cloramfenicol, sensibilitate moderată la tetraciclina, polimixina B şi rezistente la streptomicină.

Infecţia experimentală pe şoricei s-a efectuat pentru a stabili potenţialul patogen al acestor tulpini. Ca urmare a inoculării subcutanate s-a constatat că şoriceii inoculaţi cu *Pasteurella multocida* izolate de la pisicile cu stomatite, au produs moartea soriceilor în 24 ore, tulpinile fiind reizolate din ficat şi măduva osoasă. La necropsie s-a constatat uşoară hepatomegalie, hemoragii în cavitatea peritoneală.(fig.3)

Fig.4 Aspecte ale necropsiei unui soricel supus bioprobei cu Pasteurella multocida

Tulpina de *Pasteurella multocida* izolată din cavitatea bucală a pisicii sănătoase, a afectat starea de sănătate a soriceilor, manifestându-se o stare de abatere, apatie, dar nu a produs moartea acestora.

La cazul 1, coroborarea valorilor crescute ale C_3 cu cele ale IgG şi IgM, denotă prezenţa unei infecţii cronice severe. Deasemenea activarea complementului duce la apariţia durerii si disconfortului oral. Întrucât două pisici din cele trei luate în studiu, prezentau doar leziuni orale cu diverse grade de distrucţii tisulare şi infecţii locale, valorile crescute ale efectorilor umorali pot fi consecinţa acestora.

Rezultatele obţinute ca urmare a evaluării imunităţii umorale sunt redate în tabelul nr.1.

Tabel 1

Parametrii imunităţii umorale obţinuţi din serul indivizilor investigaţi

mg/dl	**Valori normale**	Probele de ser recoltate de la		
		pisica sanatosa	Pisici cu stomatita	
			Caz 1	Caz 2
IgA	**9-45** mg/dl	**44**	**45**	46
IgG	**80-200** mg/dl	**180**	**320**	263
IgM	**6-28** mg/dl	**22**	**60**	40
C_3	**4-5 u/L**	**3,8**	**8,8**	**2,9**

La cazul 2, deşi IgG (263 mg/dl) şi IgM (40 mg/dl) prezintă valori crescute, valoarea complementul C3 se situează sub limita normala. Acest fapt s-ar putea datora unor deficienţe imune.

Plăgile produse la om prin muşcare au evoluat diferit. Astfel tulpinile cu patogenitate ridicată (provenite de la pisicile cu stomatită) au produs infecţii locale cu gravitate accentuată în funcţie de profunzimea penetrării ţesuturilor moi. Analizele de laborator au confirmat prezenţa microorganismelor din genul *Pasteurella*. Pacienţilor umani li s-a oferit îngrijiri medicale cu toaletarea şi antisepsia locală urmat de tratament antiinfecţios pe bază de amoxicilin şi acid clavulanic injectabil şi oxitetraciclină administrată local.

CONCLUZII

1. Au fost investigate trei pisici, care au produs proprietarilor acestora, plăgi prin muşcare, una fiind clinic sănătoasă şi celelalte două cu stomatite severe.
2. Ca urmare a examenului microbiologic, au fost identificate şi confirmate biochimic şi prin teste de patogenitate, trei tulpini de *Pasteurella multocida*.
3. *Pasteurella multocida*, bacterie comensală a cavităţii bucale la pisică îşi poate manifesta patogenitatea atât la animale cât şi la om, prin muşcătură şi salivă.
4. Evoluţia procesului infecţios este dependent de virulenţa germenilor şi de rezistenţa organismului gazda.
5. Coroborarea valorilor imunogramei cu cele ale complementului reflectă implicaţiile sistemului imun în apărarea antiinfecţioasă atât locală cât şi generală.
6. Pisicile, trăind în permanenta proximitate a omului, pot reprezenta o ameninţare morbidă reală, care nu trebuie ignorată.

BIBLIOGRAFIE

1. CARP-CĂRARE M., GUGUIANU ELEONORA, TIMOFTE DORINA, 1998- Lucrări practice de Bacteriologie, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iaşi
2. CHRISTENSEN H., BISGAARD M., ANGEN Q., FREDERIKSEN W. et OLSEN J.E., 2005- Characterization of sucrose-negative Pasteurella multocida variants, including isolates from large-cat bite wounds. J. Clin. Microbiol., 43, 259-270.
3. DIRE DJ, HOGAN DE, RIGGS MW. A prospective evaluation of risk factors for infection from dog bite wounds. Acad. Emerg. Med. 1994; 1 : 258–66.
4. PERIANU T., 2004 – Boli infecţioase ale animalelor, Bacterioze, vol.I, Ed.venus, Iaşi, pag. 243-265
5. PEEPLES E, BOSWICK JA, SCOTT FA. 1980 -Wounds of the hand contaminated by human or animal saliva. J. Trauma 1980; 20 : 383–9.
6. TOMESCU V., GAVRILĂ I., GAVRILĂ DORINA, 1987- Zoonoze- Boli transmisibile de la animale la om, Ed. Ceres, Bucureşti,
7. TALAN DA, CITRON DM, ABRAHAMIAN FM, MORAN GJ, GOLDSTAINEJ.1999 .- Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites.N. Engl.J. Med. 1999; 340: 85–92.
8. ŢOGOE I., DOBRE MIMI, 2006- Bacteriologie veterinară, Editura Printech, Bucureşti,

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HONEY, HONEYDEW HONEY AND PROPOLIS FROM DIFFERENT REGIONS OF TRANSILVANIA AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

RINDT IULIA KRISZTINA, SPINU MARINA, BRUDASCA F., NICULAE MIHAELA, SZAKACS BIANCA, KISS TIMEA, URICARU A., BIANU G. T.
University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, 3-5 Manastur, Cluj – Napoca, Romania
rindttini@yahoo.com

This study evaluated the antimicrobial activity of propolis and honey samples from different regions of Transilvania. Ethanolic extract of Propolis (EEP) was prepared using 70 % ethanol. The honey and honeydew honey samples were diluted to a concentration of 50 % in sterile saline solution. These preparations were tested for antimicrobial activity against five strains of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis, in a radial diffusion method. Artificial honey and ethanol 70% were used as control.

All four samples of propolis were active against the tested bacterial strains, with a significant antimicrobial effect, more powerful than the one exerted by the honey and honeydew honey. Ethanol and artificial honey were inefficient under similar experimental conditions.

Key words: propolis, honey, honeydew honey, antibacterial activity, Staphylococcus aureus.

INTRODUCTION

Resistance to antimicrobial agents has become an increasingly important and pressing global problem. Honey and propolis are bee products that have been used for centuries in folk medicine (Ghisalberti 1979; Zumla and Lulat, 1989; Meda et al., Nacoulma, 2005; Nagai et al., 2006; Orhan et al., 2003), and have received increasing attention from the general population because of their health claims (Dobrowolski et al. 1991). In Romania, honey had been used as a sweetener or preservative in food (Marghitas, 2005). Nevertheless, Romanian propolis and honey have not been yet studied regarding the antibacterial properties; therefore, our purpose was to estimate this activity. These products, due to their potential antimicrobial activity, could represent an alternative strategy for the development of novel drugs.

Floral honey is produced by honeybees from the blossom nectar, while honeydew honey is made of secretions of living parts of plants or excretions of plant-sucking insects on the living part of plants (Prodolliet & Hischenhuber, 1998). Propolis is a resinous bee product collected by honeybees (Apis mellifera L.) from tree buds. The antimicrobial properties of propolis have been widely investigated, confirming its antibacterial, antiviral, antifungal and anti-protozoan activities (Castro and Higashi, 1995; Kujumgiev et al. 1999, Lu et al., 2005).

The aim of this investigation was to study the antibacterial activity of honey, honeydew honey and propolis samples against *S. aureus* stains isolated from bovine mastitis.

MATERIALS AND METHODS

Propolis, honey and honeydew honey: four (10%) ethanol extracts of propolis (P1, P2, P3, P4), two types of poly floral honey and two types of honeydew honey from different areas of Transilvania, were obtained from the Apiculture Departament of Agricultural University from Cluj. The honey and honeydew honey samples were used in a 50% dilution.

Microorganisms: five stains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis were used in this study. All of these stains were resistant to antibiotics commonly used for treatment of infections caused by

these bacteria (penicillin, ampicilline, cloxacyline, oxacyline, tetracicline, amoxyclav, thrimetoprime, lymcomicine, cephoperazone).

Stock cultures of *S. aureus* stains isolated from bovine mastites were maintained on Tryptose agar (Difco laboratories, Detroit, Michigan, USA) at 4°C. Prior to inoculation, all strains were transferred from the stock cultures to Mueller-Hinton agar and incubated 24h at 37°C. All strains were subsequently sub cultured under the same conditions. The cultures were used for preparation of suspensions in sterile saline solution (pH 7.2) with densities adjusted to 1 according to McFarland scale.

For agar well diffusion method five *S. aureus* strains were used. Microbial suspensions were inoculated onto plate surfaces with a sterile cotton swab. Test plates (diameter 8 cm) were prepared with 12 ml of Mueller-Hinton agar (Difco laboratories, Detroit, Michigan, USA), and holes of 5 mm in diameter were punched in the agar plates. The holes were filled with 10 µl of EEP 10% (P1, P2, P3, P4), poly floral honey 50% (MP1, MP2), honeydew honey 50% (MM1, MM2) and 10 µl of 70% ethanol as a control for propolis samples and 10 µl artificial honey as a control for honey samples. Artificial honey (100 g) was prepared by solving 1.5g sucrose, 7.5g maltose, 40.5g fructose and 33.5g glucose in 17 ml sterile saline solution. This solution contains the proportions of the four dominant sugars in natural honey samples (Cooper et al. 2000).

Inhibition zones of microbial growth (mm) were measured after a 24 h incubation at 37 °C.

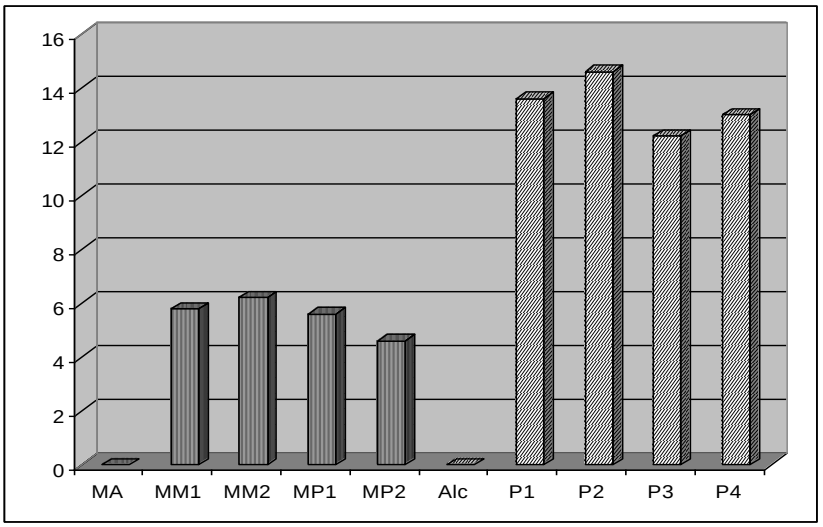


*Fig.**1. Mean growth inhibition zones for different types of honey and propolis 10%***

All tested ethanolic extracts of propolis exhibited antimicrobial activity against the studied *Staphylococcus aureus* stains, zones of inhibition ranging from 11 to 17 mm. The inhibition zones for various types of tested honey ranged from 0 to 11 mm.

The honey extracts showed moderate inhibition of growth in the studied *Staphylococcus aureus* stains, when compared to the effects of the propolis samples. The tested honeydew honey had a stronger antibacterial effect than the polifloral honey.

The antibacterial activity of honey is attributed to some physical (acidity, osmolarity) and chemical (H_2O_2, nectar, pollen, propolis) factors (Weston, 2000), and a part of the antibacterial activity is attributed to the enzyme composition of honey. The obtained results indicated the necessity of rendering the medicinal use of various types of honey and propolis not only based on their concentrations, but on their chemical composition as well.

CONCLUSIONS

The results indicated that propolis is more effective than honey and honeydew honey regarding antibacterial activity. Honeydew honey is more efficient than polifloral honey, probably due to differences in enzymes contained. Both propolis and honey preparations could represent a valid alternative in the antibacterial treatment of mastites in cows.

REFERENCES

1. E.L. Ghisalberti, 1979, Bee Word 60, 59–84.
2. J.W. Dobrowolski, S.B. Vohora, K. Sharma, S.A. Shah, S.A.H. Naqvi, P.C. Dandlya,1991 Journal of Ethnopharmacology 35, 77–82.
3. Zumla, A. Lulat, 1989, Journal of Royal Society of Medicine 82, 384–385.
4. J. Prodolliet, C. Hischenhuber, 1998, Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung A, 207, 1–12.
5. SL Castro, KO Higashi, 1995, Journal of Ethnopharmacol 46:55–58
6. A Kujumgiev I. Tsvetkova, Yu Serkedjieva et al, 1999, J Ethnopharmacol 64:235–240
7. L.-C. Lu, Y.-W. Chen, C.-C. Chou, 2005, International Journal of Food Microbiology 102, 213–220.
8. R. J. Weston, 2000, Food Chemistry, 71, 235–239.
9. L. Al. Marghitas, 2005, In Ceres Ed., Bucharest.
10. A.Meda, C. Lamien, M. Romito, J. Millago, O. Nacoulma, 2005, Food Chemistry, 91, 571–577.
11. T. Nagai, R. Inoue, Kanamori N, N.Suzuki, N. Nagashima, 2006, Food Chemistry, 97(2), 256–262.
12. F. Orhan, B. E. Sekerel, C. N. Kocabas, , C. Sackesen, G. Adaliog˘lu, A. Tuncer, 2003, Asthma and Immunology, 90, 611–615.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF DIFFERENT PROPOLIS CONCENTRATIONS AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STAINS ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS

RINDT IULIA KRISZTINA, SANDRU CARMEN DANA, BRUDASCA F., NICULAE MIHAELA, KOBOLKUTI L., CADAR D., UNGVARI A., SPINU MARINA

University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, 3-5 Manastur, Cluj – Napoca, Romania

rindttini@yahoo.com

Propolis is a resinous natural hive product derived from plant exudates collected by honeybees. Due to its biological and pharmacological activities, it has been extensively used in ethno- medicine. The present study aimed to investigate the antibacterial activity of different concentrations of ethanolic propolis (EEP) against Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastites.

Our results indicated that EEP had a significant antimicrobial activity on all tested clinical strains. All the propolis samples were active against the bacterial test strains used; the 10% solution was more active than the 5% solution and the 40% solution was not significantly more effective than the 10% one.

Key words: propolis, antibacterial activity, Staphylococcus aureus, bovine mastitis

INTRODUCTION

Propolis or bee glue is a complex resinous mixture of different plant exudates, which is gathered, modified and used by honeybees not only as a building material but also to keep a low concentration of bacteria and fungi in the hive.

Propolis is relatively non-toxic (Burdock, 1998; Cuesta et al., 2005; Jasprica et al., 2007) and displays a wide range of antimicrobial activity against a variety of bacteria, fungi, parasites, and virus (Grange and Davey, 1990; Dobrowolski et al., 1991; Amoros et al., 1992,1994; Serkedjieva et al., 1992; Higashi and de Castro, 1994; Bankova et al., 1995; Steinberg et al., 1996; Kujumgiev et al., 1999; Sforcin et al., 2000; Ito et al., 2001; Orsi et al., 2005; Freitas et al., 2006, Marcucci, 1995). Other biological and pharmacological properties have also been demonstrated for propolis, including anti-inflammatory, antitumor, cytotoxic, hepatoprotective, antioxidant, hematostimulative, and immunomodulatory properties (Banskota et al., 2000; Ahn et al., 2004; Orsolic and Basic, 2005; Sforcin, 2007, Isla et al., 2001, Strehl et al., 1993, Frenkel et al., 1993). More than 160 constituents have been identified in different propolis samples (Greenaway et al., 1991; Marcucci, 1995, Bonvehi et al., 1994).

Due to varied biological and pharmacological effects of propolis, it has been widely used in medicine, cosmetics and food industry (Bankova et al., 1998).

The antimicrobial activity of the propolis has driven the attention of researchers as an alternative to traditional antimicrobial agents, due to increasing number of multi drug-resistant bacteria (Cragg et al., 1997; Normark and Normark, 2002; Sheldon, 2003) and frequent side effects of antibiotics (Cunha, 2001; Gleckman and Czachor, 2000).

The antibacterial activities of different concentration of propolis ethanolic extract were evaluated against *Staphylococcus aureus* stains isolated from bovine mastitis.

MATERIALS AND METHODS

Propolis: four (5%; 10%; and 40%) ethanol extracts of propolis (P1, P2, P3, P4) originating from different areas of Transylvania, was obtained from the Apiculture Departament of Agricultural University from Cluj.

Microorganisms: five stains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines with mastitis were used in this study. All of these stains were resistant to antibiotics commonly used for treatment of such infections (penicillin, ampicilline, cloxacyline, oxacyline, tetracicline, amoxyclav, thrimetoprime, lymcomicine, cephoperazone).

Stock cultures of bacteria were maintained on Tryptose agar (Difco laboratories, Detroit, Michigan, USA) at 4°C. Prior to inoculation, all strains were transferred from the stock cultures to Mueller-Hinton agar and incubated overnight at 37°C. All strains were subsequently subcultured under the same conditions. The 24 hours old cultures were used for preparation of suspensions in sterile saline solution (pH 7.2) with densities adjusted to 1 according to McFarland scale.

Five microbial strains were used for agar well diffusion method. Suspensions of microorganisms were inoculated onto plate surfaces with a sterile cotton swab. Test plates (diameter 8 cm) were prepared using 12 ml of Mueller-Hinton agar (Difco laboratories, Detroit, Michigan, USA), and holes of 5 mm in diameter were punched in the agar plates. Each hole was filled with 10 µl of EEP, while the control well was filled with 10 µl of 70% ethanol. The diameters of the growth inhibition zones were measured after 24 h of incubation at 37 °C.

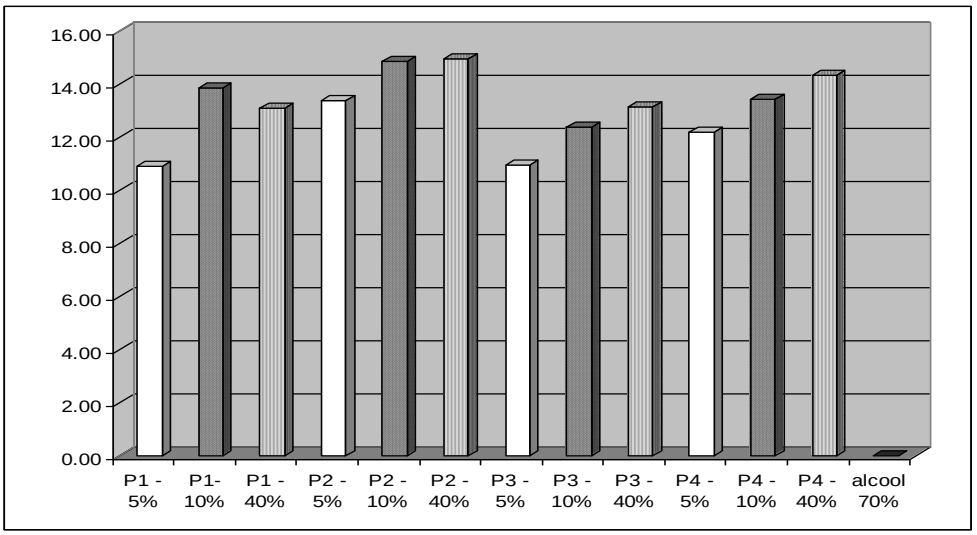


Fig.1. Growth inhibition zones for different concentrations of propolis (mean values)

All tested ethanolic extracts of propolis exhibited antimicrobial activity against the studied *Staphylococcus aureus* stains, the inhibition zones ranging from 10 to 18,6mm in diameter. The 70%'s ethanol used as control showed no efficiency in the amounts used. The 5% propolis concentration of each type was effective with an inhibition zone ranging between 10 to 14,3mm, depending on its origine. The values were lower then those obtained for both 10% and 40 % concentrations. The inhibition zones for 10% propolis extracts (P1-P4) varied between 11mm and 17,3mm, while for 40% propolis extracts the inhibition diameters were between 10,6 and 18,6mm. The differences between the inhibition zones induced by various types (P1-P4) or various concentrations differed in a statistically significant manner, mainly when concentrations ranged were of 5% and 10 % ($p<0.04$-0.002).

CONCLUSIONS

The overall effect of propolis extracts, independently on its origin, was more pronounced at 10% than in 5% concentrations, but increasing the concentration did not add to the positive antibacterial effect. Therapeutic use of propolis could be enhanced by a better knowledge of its highly variable chemical composition, specific studies on cytotoxicity and guidelines for quality control.

REFERENCES

1. M.R. Ahn, S. Kumazawa, T. Hamasaka, K.S. Bang, T. Nakayama, 2004, Journal 588 of Agricutural and Food Chemistry 52, 7286–7292.
2. M. Amoros, E. Lurton, J. Boustie, L. Girre, F. Sauvager, M. Cormier: 1994, Journal of Natural Products, 57, 644–647.
3. M. Amoros, C. M. O. Simoes, L. Girre, F. Sauvager, M. Cormier: 1992, Journal of Natural Products, 55, 1732–1740.
4. V. S. Bankova, R. S. Christov, Tejera, A. Delgado: 1998, Phytochemistry, 49, 1411–1415.
5. V. Bankova, R. Christov, A. Kujumgiev, M.C. Marcucci, S. Popov, 1995, Zeitschrift für Naturforschung [C] 50, 167–172.
6. J. S. Bonvehi, F. V. Coll, R. E. Jorda: 1994, Journal of the American Oil Chemists Society, 71, 529–532
7. G.A. Burdock, 1998, Food and Chemical Toxicology 36, 347–363.
8. A.Cuesta, A. Rodriguez, M.A.Esteban, J. Meseguer, 2005, Fish and Shellfish Immunology 18, 71–80. 654
9. B.A. Cunha, 2001. Medical Clinics of North America 85, 149–185. 656
10. G.M. Cragg, D.J. Newman, K.M. Snader, 1997, Journal of Natural Products 60, 52–60.
11. J. W. Dobrowolski, S. B. Vohora, K. Sharma, S. A. Shah, S. A. H. Naqvi, P. C. Dandiya: 1991, Journal of Ethnopharmacology, 35, 77–82.
12. K. Frenkel, H. Wei, R. Bhimani, J. Ye, J. A. Zadunaisky, M. T. Huang, et al. 1993, Cancer Research, 53, 1255–1261.
13. S.F. Freitas, L. Shinohara, J.M. Sforcin, S. Guimaraes, 2006, Phytomedicine 13, 170–175.
14. J. M. Grange, R. W. Davey: 1990, Journal of Royal Society of Medicine, 83, 159–160.
15. W. Greenaway, J. May, T. Scaysbrook, F. R. Whatley: 1991, Zeitschrift fu¨ r Naturforschung, Teil 46C, 111–121.
16. R.A. Gleckman, J.S. Czachor, 2000, Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine 21, 53–60.
17. K.O. Higashi, S.L. de Castro, 1994, Journal of Ethnopharmacology 43, 149–155.
18. J. Ito, F.R. Chang, H.K. Wang, Y.K. Park, M. Ikegaki, N. Kilgore, K.H. Lee, 2001, Journal of Natural Products 64, 1278–1281.
19. M. I. Isla, M. I. Nieva-Moreno, A. R. Sampietro, M. A. Vattuone: 2001, Journal of Ethnopharmacology, 76, 165–170.
20. I.Jasprica, A. Mornar, Z. Debeljak, A. Smolcic-Bubalo, M. Medic-Saric, L.Mayer, Z. Romic, K. Bucan, T. Balog, S. Sobocanec, V. Sverko, 2007, Journal of Ethnopharmacology 110, 548–554.
21. A.Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, S. Popov, 1999, Journal of Ethnopharmacology 64, 235–240.
22. M. C. Marcucci: 1995, Apidologie, 26, 83–99.
23. B.H. Normark, S. Normark, 2002, Journal of Internal Medicine 252, 91–106.
24. R.O. Orsi, J.M. Sforcin, S.R. Funari, V. Bankova, 2005, International Immunopharmacology 5, 359–368.
25. N. Orsolic, I. Basic, 2005, Biomedicine&Pharmacotherapy 59, 561–570.
26. Jr. A.T. Sheldon 2003, International Journal of Toxicology 22, 129–130.
27. E. Strehl, R. Volpert, E. F. Elstner, 1993, Zeitschrift fu¨ r Naturforschung, 49C, 39–43.
28. J. Serkedjieva, N. Manolova, V. Bankova, 1992, Journal of Natural Products 55, 294–302.
29. D. Steinberg, G. Kaine, I. Gedalia, 1996, American Journal of Dentistry 9, 236–239.
30. J.M. Sforcin, Jr. A. Fernandes, C.A. Lopes, V. Bankova, S.R. Funari, 2000, Journal of Ethnopharmacology 73, 243–249.
31. J.M. Sforcin, 200, Journal of Ethnopharmacology 113, 1–14.

DETECTION OF PORK SPECIES CONTENT ON BEEF JERKY AND SHREDDED MEAT BY USING ENZYME IMMUNOASSAY TECHNIQUES

ROOSTITA L. BALIA[1], SRI MUDJIARTININGSIH[2], EMMIE ROSIANNIE[2], HENDRONOTO A.W. LENGKEY[1], WENDRY SETYADI P[1], KUSMAJADI SURADI[1], OBIN RACHMAWAN[1], ARIEF RUSFIAN GHANI[3], GEMILANG LARA U.S[3], CACA SUTEJA[2], DIAN ARFIANI[2]

[1]Faculty of Animal Husbandry, Padjadjaran University, Bandung - Indonesia

[2]Veterinary Public Health and Animal Diseases Investigation Center, Lembang – Indonesia

[3]Institute of Ecology, Padjadjaran University, Bandung – Indonesia

The identification of pork species content in beef jerky and shredded meat was perform for a various reasons, both economics and ethnic. The aims of identification were to prevent the substitution of meat destined for human consumption with unsuitable species or inferior kind of meat. The research was held at 3 regions in West Java Province such as Depok city (nine beef jerky samples), West Bandung district (five beef jerky and four shredded meat samples) and Bandung district (six beef jerky and one shredded meat) that twenty five samples have taken. Result showed that two from nine beef jerky samples from Depok (Kitiran Jerky, SP.0079/13.06/90) were positive in pork species content as indicated as adulteration in beef jerky products. The research showed that uses of enzyme immunoassay technique were available for consumer protection and meat safety from products adulteration.

Key words: Pork Species Content, Beef Jerky, Enzyme Immunoassay Techniques

Adulterations with ingredients substitution way were frequently found in meat products such as beef jerky and shredded meat. Ingredients substitution was relatively easy because raw muscle tissue from different species is often similar in appearance and once incorporated in a comminuted product. At another level, substitution of declared or implied meat product ingredients with cheaper ingredients is very common. The cheaper ingredients are either from the species declared (typically offal, blood, connective tissue) or meat which came from different species.

Sometimes these practices break no laws but in the longer term it intent to condemn meat into low price and make more money. In many countries, ingredients of meat product were monitored. Ingredients substitution can also generate religious concerns: pork contains ingredients use or consumption was prohibited in Moslems Countries.

Religious strictures, perceived or real health concerns and cultural likes and dislikes are the main drivers of species identification for consumer protection. All methods to determine species are based on biochemistry in one form or another because qualitative and quantitative biochemical traits set all individuals apart from one another.

Main method for species identification on 1990s period was based on the properties of the proteins (Barai, *et al.*, 1992). In these techniques, proteins are extracted from beef jerky or shredded meat with solvents and subjected to electrophoresis or immunological analysis. Typical immunological methods rely on diffusing the extracted proteins of interest against antibodies to proteins from a range of different animal or plant species.

The difficulties in meat product adulteration test, especially heat processed product like beef jerky and shredded meat, heat process resulting denaturized proteins (Hoffman, 1996). Therefore, antibodies to heat-stable soluble proteins, which retain their antigenicity after high temperature process, must be prepared (Rencova, *et al.*, 2000).

The objective of the research was to detect pork species specific content on heated process meat products such as beef jerky, shredded meat with using enzyme immunoassay technique, hence it could prevent the substitution of meat destined for human consumption with unsuitable species of meat.

MATERIAL AND METHOD

Twenty five samples taken from 3 regions in West Java Province such as Depok city (nine beef jerky samples), West Bandung district (five beef jerky and four shredded meat samples) and Bandung district (six beef jerky and one shredded meat). After that, samples prepared for enzyme immunoassay test which using Tepnel BioKits Pork Cooked Identification Test Kit Cat. No.902012N.

Samples Preparation

Twenty five gram samples from each of beef jerky or shredded meat blended, minced or finely chopped and put into a stomacher bag. Add 100mL of saline water, stomach on medium setting (230 rpm) for 2 minutes. Transfer contents to a microwavable container and heal on full power for 90 seconds, allow standing for 15 minutes. Transfer mixture to clean stomacher bag and stomach for further 2 minutes, allow standing for 15 minutes. An amount of liquid should appear above a settled layer; filter the liquid through whatman no.4 or similar filter paper into clean container; alternatively a slurry may be obtained which may require centrifugation to obtain a suitable extract. Mix the sample extract, which is now ready for immunoassay.

Enzyme Immunoassay Technique

Pipette 100µl sample extract or positive control into respective test wells. Incubate at room temperature for 45 minutes. Wash wells three times with working wash solution. Dispense 50µl anti-species biotinylate into all test wells and then incubate at room temperature (18-22˚C) for 45 minutes. Wash wells three times with working wash solution. Dispense avidin peroxidase conjugate into all test wells. Incubate at room temperature (18-22˚C) for 15 minutes. Wash wells five times with working wash solution. Dispense 100µl TMB substrate solution into each test wells. Incubate at room temperature (18-22˚C) for 45 minutes. Dispense 50µl stop solution into each assay well and mix plate. Measure absorbance (450nm) of each assay well or well contents using plate render or spectrophotometer or visually assess plate.

RESULT AND DISSCUSSION

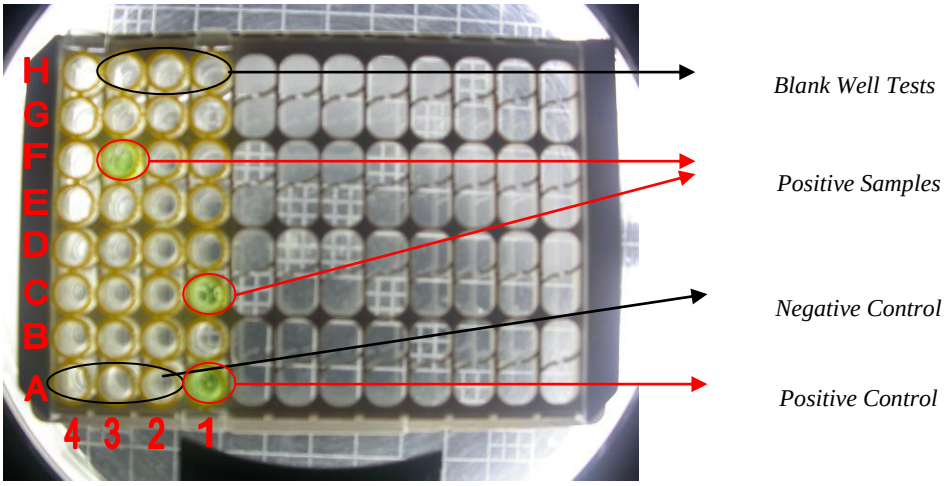


Figure 1. Enzyme Immunoassay Result

Twenty five samples was tested using enzyme immunoassay technique. The test was done at room temperature of 18-22˚C. Under these conditions negative control wells (A2-A4) should appear virtually colorless to the naked eyes, while positive controls (A1) and positive samples (C1, F3) will give medium yellow coloration. Each positive control is equivalent to sample containing significant level of pork meat.

The kit was utilizing a biotin-avidin enhancement process. With increased concentrations of pork-specific protein in the extract, more of the protein will bind to antibody attached to the well. After allowing the reaction to proceed, unbound material is removed by washing. The amount of specific protein bound to the antibody coated well is determined by reaction firstly with biotinylated and also with a streptavidin-peroxidase conjugate. After incubation, access reagent is removed by washing. Finally, bound peroxidase activity is determined by adding a fixed amount of TMB substrate which develops a blue color (changing color to yellow on addition of acid stop reagent) in the presence if peroxidase. Color development is proportional to the original amount of specific pork protein in the samples extract.

The color of positive samples produced by enzyme –peroxidase– which covalently linked to the antibody that amplifies the precipitin complex by generating many more chemical equivalents of (colored) reaction product than are inherent in the precipitin complex (Hui, *et al.*, 2001). Enzyme conjugates an appropriate secondary antibody followed by enzyme catalyzed color reaction (Walker, 2002).

CONCLUSIONS

Enzyme immunoassay technique was effective to detect species specific content on heated process meat products such as beef jerky and shredded meat. Two beef jerky samples positive adulterated by pork meat, it is visible on medium yellow coloration of well test kit (C1, F3).

REFERENCES

1. Barai, B.K., R.R. Nayak, R.S. Singhal, and P.R. Kulkarni. 1992. Approaches to the Detection of Meat Adulteration. Trends. Food.Sci. Technol. 3:69-72.
2. Hoffman, K., Fisher, K., Miller, E., Kemper, V. 1996. Experiments to Demonstrate the Effectiveness of Heat Treatments Applied to Canned Meats and Meat-and-Bone Meals. Fleishwirshaft, 76, 920-923.
3. Rencova, E., Svoboda, I., Necidova, L., 2000. Identification by ELISA of Polutry, Horse, Kangaroo and Rat Muscle Specific Proteins in Heat-Processed Products. Vet. Med. Czech, 45 (12): 353 – 356.
4. Hui. Y.H., Wai-Kit, N., Rogers, R.W., Young, O.A. 2001. Meat Science and Applications. Marcel Dekker, Inc. New York – Basel.
5. Walker J.M (ed). 2002. The Protein Protocols Handbook. Second Edition. Humana Press.

ASPECTE PRIVIND INCIDENŢA ENTEROCOCILOR ÎN SURSELE DE APĂ UTILIZATE PENTRU ADĂPARE

ISSUES ON INCIDENCE OF ENTEROCOCCI IN WATER SOURCES USED FOR ANIMALS CONSUMPTION

LILIANA ROŞCA[1], MIHAI CARP- CĂRARE[2], PETRU ROŞCA[2], CRISTINA RÎMBU[2]
[1]DSVSA Iaşi
[2]Facultatea de Medicină Veterinară Iaşi
lililsv@yahoo.com

The paper presents a study on the incidence of faecal streptococci in natural water sources used for animal consumption.

Study material was composed of 352 water samples collected under the norms of local sources (wells, springs) and from surface sources (rivers, brooks, plashy, lakes) used for animal consumption in Iasi area..

It is known that faecal streptococii alongside faecal coliforms and bacteria of the genus Escherichia coli, are used as indicators of faecal pollution of water sources, their presence in water indicating a risk of contact of pathogens from animals, which may cause true epidemic.

Analyzing bacteriological samples of water both in winter and the hot season, we found that the share of water contaminated with faecal streptococci is higher in the warm season compared with the cold and also the average values of MPN (most probable number) for faecal streptococci is greater in the warm season compared with the cold, and sources of surface water are more polluted due to failure to comply with the hygiene rules in place of animal drinking.

Key words: faecal streptococi, water, water sources for animal consumption

Enterococii (streptococii fecali de grup D) fac parte din microflora rezidentă a intestinului la om şi numeroase specii de animale.

Comparativ cu bacteriile coliforme, streptococii fecali nu sunt la fel de răspândiţi în mediile naturale, în schimb au o capacitate mult mai mare de a rămâne viabili în apă, având o strânsă legătură cu tulburările gastro - intestinale consecutive consumului de apă poluată. (6)

Pe baza acestui considerent, enterococii sunt consideraţi ca indicatori microbiologici ai poluării fecale, cu precădere a surselor de apă naturale, netratate. (8)

Deoarece numărul enterococilor este mai mare în intestinul animalelor comparativ cu cel al omului, unde predominanţi sunt coliformii, aceste bacterii constituie şi un indicator al originii sursei de poluare (1, 2, 3, 4).

În această lucrare sunt prezentate rezultatele cercetărilor efectuate în decurs de 4 ani (2003 – 2006) privind incidenţa enterococilor şi ponderea surselor de apă contaminate cu enterococi pe sezoane şi ani de studiu.

MATERIAL ŞI METODĂ

A fost analizat un număr de 352 de probe de apă din surse de adăpare a animalelor, din care 226 (64,20%) au fost recoltate din surse de apă locale (fântâni, izvoare, cişmele) şi 126 (35,79%), din surse de apă de suprafaţă (râuri, pâraie, lacuri, bălţi).

Probele de apă au fost prelevate atât în sezonul cald (lunile aprilie, mai, iunie, iulie, august şi septembrie) cât şi în sezonul rece (lunile decembrie, ianuarie, februarie, martie, octombrie şi noiembrie).

Prezenţa streptococilor fecali, precum şi numărul probabil al acestora s-au determinat prin metoda numărului celui mai probabil (MPN), respectând protocolul de lucru reglementat prin STAS 3001/1991 şi SR EN ISO 8199.

Probele de apă au fost însămânţate în bulion cu azidă de sodiu, substanţă selectivă care inhibă dezvoltarea florei Gram negative. Au fost considerate prezumtiv pozitive pentru enterococi, tuburile cu turbiditate şi sediment după o incubare de 24-48h la 37°C. Din acestea s-au transplantat câteva picături în eprubete cu mediul lichid de confirmare ce conţine azidă de sodiu şi brom crezol purpur ca indicator. După o incubare de 24h la temperatura de 44 - 45ºC, au fost considerate pozitive pentru enterococi eprubetele în care s-a produs tulburarea mediului şi virarea culorii din violet în galben .(fig. 1)

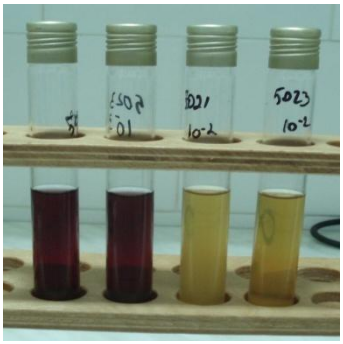


Fig. 1 Confirmarea enterococilor pe mediul lichid cu azidă de sodiu şi bromcrezol purpur

În cazul confirmării pe mediul solid Slanetz Bartley agar, coloniile de streptococi fecali sunt netede şi pigmentate în roz – roşu ca urmare a reducerii 2,3,5 trifeniltetrazolium chlorid (TTC), la formazan.

În tabelul nr. 1 sunt redate valorile obţinute privind ponderea surselor utilizate pentru adăpare confirmate ca fiind contaminate cu enterococi precum şi valorile medii obţinute pentru MPN enterococi /100 ml, pentru apele provenite din surse locale .

Tabel nr.1

Variaţia numărului probabil de enterococi/100 ml în probele de apă provenite din surse locale de adăpare pentru animale

Sezon	An	Total	Probe cu sub 2 MPN enterococi /100 ml	%	Probe cu peste 2 MPN enterococi /100 ml	%	Val. minimă Val. maximă	Medie
Rece	2003	26	16	61,53	10	38,46	0,02 -,78x10^2	5,15x10
	2004	24	13	54,16	11	45,83	0,2 -7,0x10	2,18x10
	2005	26	14	53,84	12	46,15	0,02-1,72x10^2	5,29x10
	2006	30	16	53,33	14	46,66	0,2-7,0x10	2,83x10
Total		**106**	**59**	**55,66**	**47**	**44,33**		**3,86x10**
Cald	2003	30	15	50	15	50	0,02 -,78x10^2	7,09x10
	2004	30	14	46,66	16	53,33	0,05 -1,70x10	4,24x10
	2005	30	12	40,00	18	60,00	0,02-5,00x10^2	6,83x10
	2006	30	14	46,66	16	53,33	0,02-4,90x10^2	1,17x10^2
Total		**120**	**55**	**45,83**	**65**	**54,16**		**7,46x10**
Total general		**226**	**114**	**50,44**	**112**	**49,55**		**5,66x10**

Din cele 106 probe analizate în sezonul rece, 47 (44,33%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu enterococi, în timp ce în sezonul cald ponderea probelor contaminate cu enterococi a crescut la 54,16% (65 de probe) din totalul de 120 de probe analizate în acest sezon.

Media valorilor anuale calculate pentru MPN enterococi/100ml, a crescut de la 5,15x10/100 ml în sezonul rece la 7,09x10/100 ml în sezonul cald al anului 2003, de la 2,18x10/100 ml în sezonul rece la 6,83x10/100 ml în sezonul cald al anului 2004, în anul 2005 pentru sezonul rece s-a calculat o valoare medie de 5,29x10/100 ml, iar pentru sezonul cald al aceluiaşi an de 6,83x10/100 ml, iar în sezonul rece al anului 2006, valoarea medie pentru MPN enterococi /100 ml a fost de 2,83x10, comparativ cu sezonul cald pentru care s-a calculat valoarea de 1,17x102/100 ml.(diagrama 1)

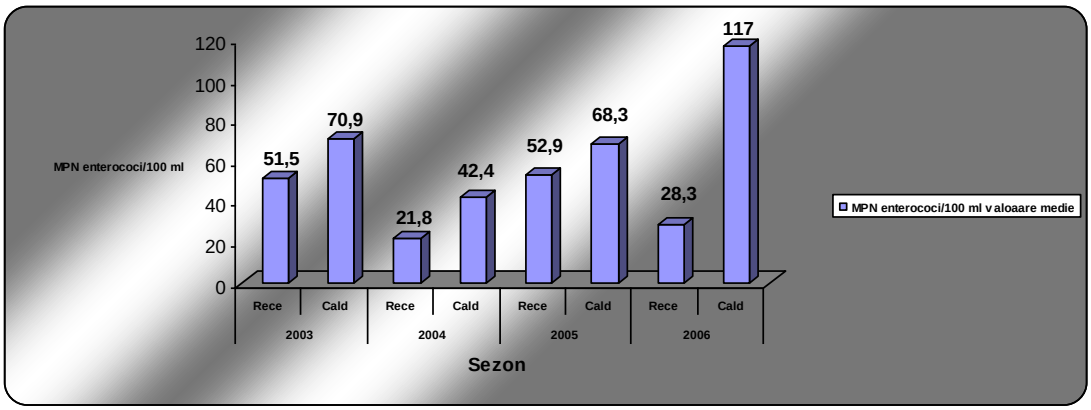


Diagrama nr. 1 *Variaţia sezonieră a MPN enterococi /100ml în apele din surse locale de adăpare*

Tabelul nr. 2
Variaţia numărului probabil de enterococi/100 ml în probele de apă provenite din surse de suprafaţă utilizate pentru adăpare

Sezon	An	Total probe	Probe pozitive pentru enterococi	%	Valoare Minimă Maximă MPN entrococi/ 100 ml	Valoare medie MPN entrococi/ 100 ml
Rece	2003	8	7	87,5	0,06-7,9x10^2	3,16x10^2
	2004	8	8	100	0,04-5,0x10^2	1,28 x10^2
	2005	15	13	86,66	0,09-3,14 x10^2	1,32 x10^2
	2006	15	12	80,00	0,04-7,9x 10^2	2,76 x10^2
Total		**46**	**40**	**86,95**		**2,13 x10^2**
Cald	2003	20	20	100	0,004-1,7 x10^3	3,77x10^2
	2004	20	18	90	0,002-1,7 x10^3	4,02 x10^2
	2005	20	19	95,00	0,004-3,45 x10^3	7,46 x10^2
	2006	20	19	95,00	0,009-7,0 x10^3	1,00x10^3
Total		**80**	**76**	**95,00**		**6,31 x10^2**
Total general		**126**	**116**	**92,06**		**4,22 x10^2**

În tabelul nr. 2 sunt redate valorile obţinute cu privire la ponderea apelor de suprafaţă confirmate pozitive pentru enterococi precum şi variaţiile sezoniere a MPN enterococi /100 ml .

Din cele 46 de probe de apă din surse de adăpare analizate în sezonul rece, 40 (86,95%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu enterococi, în timp ce în sezonul rece ponderea apelor confirmate ca fiind contaminate cu enterococi a fost de 95,00% (76 de probe)din totalul de 80 de probe analizate.

Valorile medii anuale calculate pentru MPN enterococi /100 ml au variat în sensul creşterii acestora în sezonul cald comparativ cu cel rece. (diagrama nr. 2)

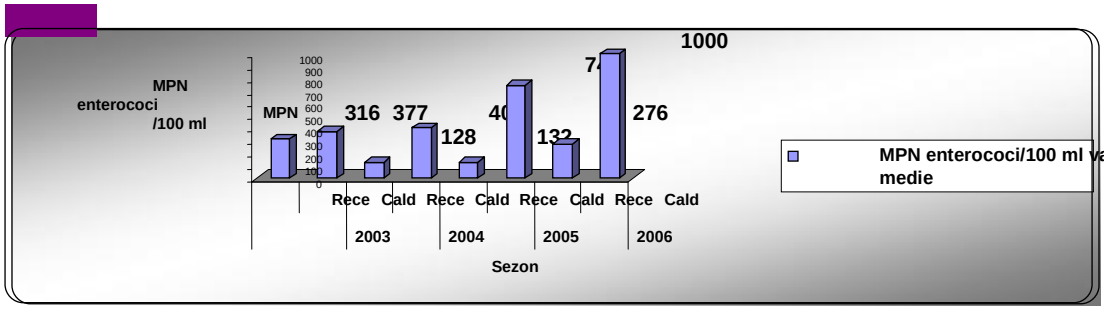


Diagrama nr. 2 *Variaţia sezonieră a MPN enterococi /100ml în apele din surse de suprafaţă utilizate în adăpare*

CONCLUZII

1. Ponderea apelor contaminate cu enterococi a fost mai mare în sezonul cald comparativ cu sezonul rece, atât pentru sursele de apă locale cât şi pentru cele de suprafaţă., întrucât în sezonul cald posibilităţile de poluare ale apelor sunt mai numeroase şi variate.
2. Valorile medii pentru MPN enterococi /100 ml au crescut în sezonul cald comparativ cu sezonul rece pentru ambele categorii de surse de apă , aspect care denotă o exploatare neigienică a acestora.
3. Valorile medii ale MPN enterococi /100ml pentru sursele de apă locale şi sursele de suprafaţă, arată că sursele de apă de suprafaţă sunt mai intens contaminate cu enterococi din cauza nerespectării condiţiilor de igienă la locul de adăpare prin lipsa de amenajarea a acestora .
4. Deşi enterococii intestinali, care în apă sunt asociaţi în mod frecvent cu bacterii patogene, nu sunt acceptaţi de normativele în vigoare, totuşi apele insalubre continuă să fie utilizate în scop potabil pentru animale.

BIBLIOGRAFIE

1. Bârzoi Dobre, Sorin Apostu, 2002, Microbiologia produselor alimentare, Ed. Risoprint Cluj – Napoca
2. Carp-Cărare, M., 1991 – Lucrări practice de microbiologie USAMV Iaşi
3. Drapeau, A., Iancovic, S.,1977 – Manual de microbiologie de l, environnement OMS,
4. Geneve 33.
5. Mănescu , S., 1984 - Tratat de igienă, vol. 1. Ed. Medicală Bucureşti
6. Richardson K., J., Stewart H., and Wolfe R., I., 1991, Aplication of some probe teachnology to water industry. Journals American Waters Norks Association 83, p. 71 – 81.
7. Voltera J., Ronadona J., and Anlicino F., A., 1986, Faecal streptococi recoveries in different aquatic areas. Water Air and Soil Pollution, 29, p. 403 – 413.
8. WHO, 1998, Guidlines for Safe Recreational Water Environements Draft for Consultation . World Health Organisation, Geneva.
9. APHA, 1992, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.18th Edition , APHA, AWWA and WPCF, Washington D.C.
10. STAS 3001/1991 – Apa. Analiza bacteriologică.
11. SR EN ISO 8199 – Calitatea apei. Linii directoare pentru numărarea microorganismelor în mediul de cultură

OBSERVAŢII PRIVIND INCIDENŢA SPECIEI ESCHERICHIA COLI ÎN APELE UTILIZATE PENTRU ADĂPARE CONTAMINATE CU BACTERII COLIFORME TERMOTOLERANTE (COLIFORMI FECALI)

OBSERVATIONS ON INCIDENCE OF SPECIES OF *ESCHERICHIA COLI* IN WATERS USED FOR ANIMAL CONSUMPTION CONTAMINATED WITH *TERMOTOLERANTE COLIFORMS (FAECAL COLIFORMS)*

Liliana Roşca[1], Mihai Carp- Cărare[2], Petru Roşca[2], Eleonora Guguianu[2]
[1]DSVSA Iaşi
[2]Facultatea de Medicină Veterinară Iaşi

This study examines the sources of water used for watering animals in terms of contamination with faecal coliforms (CTT) and species of bacteria Escherichia coli (EC).

Study material was composed of 352 samples of water from sources of watering animals that have been investigated to determine the most probable number (MPN) of faecal coliforms (CTT/100 ml) and bacteria of the species Escherichia coli (EC / 100 ml).

In the hot season are a larger share of local water sources contaminated with faecal coliforms and Escherichia coli compared to winter and the average values of these bacteriological parameters increase from winter to the heat.

For water from surface sources, the number of those contaminated with faecal coliforms and Escherichia coli decreases from winter to the warm, while the average values for these parameters increase during winter compared with the hot season.

Key words: water, faecal coliforms, *Escherichia coli*

Bacteriile coliforme termotolerante (coliformii fecali), sunt un grup aparte al bacteriilor coliforme totale, care au relaţii mult mai strânse cu poluarea de origine fecală a apei.

Aceste microorganisme au toate caracteristicile bacteriilor coliforme: sunt bacterii Gram negative, aerobe şi facultativ anaerobe, nesporulate, necapsulate, care fermentează lactoza în 24-48 de ore cu producţie de gaz şi acid la temperatura de 36ºC ± 1ºC dar care în plus cresc şi fermentează lactoza la 44ºC ± 0,2ºC în 48 ore, de aici şi denumirea de bacterii coliforme termotolerante. *(8)*

Capacitatea acestor bacterii de a rezista la temperaturi mai înalte se datorează adaptării proteinelor bacteriene de a fi stabile la temperaturi asemănătoare tractului gastrointestinal al animalelor. *(1).*

Grupul bacteriilor coliforme, include după unii autori microorganisme din genurile *Escherichia şi Klebsiella,* dar nu se bazează strict pe criterii taxonomice, biochimice sau culturale pe medii selective. De asemenea, bacteriile din genurile *Citrobacter şi Enterobacter* sunt capabile să crească în aceleaşi condiţii.. În schimb *Escherichia coli* este singurul biotip al familiei *Enterobacteriaceae* care are tot timpul origine fecală, deci, grupul de coliformi termotoleranţi ar trebui să fie reprezentat de *Escherichia coli* ca indicator al poluării fecale. (2, 3, 4, 5, 6, 7).

Calitatea apei utilizată de animale în scop potabil, influenţează starea lor de sănătate , randamentul productiv dar şi calitatea produselor acestora. Plecând de la aceste considerente, în prezenta lucrare ne-am propus să analizăm aspecte ale contaminării surselor de apă utilizate pentru adăpare de pe raza judeţului Iaşi, cu bacterii coliforme termotolerante şi cu *Escherichia coli,* pe parcursul a patru ani (2003 – 2006).

MATERIAL ŞI METODĂ

Au fost analizate 352 de probe de apă din surse de adăpare, din care 226 reprezentând 64,20% din totalul probelor analizate au fost recoltate din surse de apă locale (fântâni, izvoare, cişmele) şi 126 reprezentând 35,79% din totalul probelor au fost recoltate din surse de apă de suprafaţă (râuri, pâraie, lacuri, bălţi), utilizate pentru adăparea animalelor.

Probele de apă au fost prelevate atât în sezonul cald (lunile aprilie, mai, iunie, iulie, august şi septembrie) cât şi în sezonul rece (lunile decembrie, ianuarie, februarie, martie, octombrie şi noiembrie).

S-au efectuat analize pentru determinarea numărului probabil de bacterii termotolerante prin metoda determinării numărului cel mai probabil (MPN) de bacterii coliforme termotolerante şi metoda determinării MPN de *Escherichia coli,* conform ISO 9308-2-1990, respectiv ISO 9308-3/1998.

Punctul de pornire pentru determinarea coliformilor termotoleranţi a fost reprezentat de eprubetele cu inocul considerate pozitive pentru numărarea coliformilor totali (fermentarea lactozei cu producere de gaz la 37^{o}C), iar pentru determinarea speciei *Escherichia coli,* tuburile cu inocul pozitive pentru bacterii coliforme termotolerante (fermentarea lactozei cu producere de gaz la 44^{o}C)(fig. 1A) . Confirmarea pentru *Escherichia coli* s-a efectuat prin reacţia de evidenţiere a producerii de indol pe mediul lichid apă triptonată (fig. 1B) şi evidenţierea β- D -glucuronidazei pe mediul lichid cu 4-methylumbelyferyl – β – D glucuronide (MUG), reacţie în care rezultă un produs fluorescent în lumină UV cu λ=366nm (fig. 1C).

A ***B*** ***C***

Fig. 1.*: **A-** Eprubete cu inocul considerate pozitive pentru coliformi termotoleranţi; **B -** Reacţia indolului pozitivă; **C-** Evidenţierea β- D –glucuronidazei în mediu lichid cu MUG – producerea de fluorescenţă în UV.*

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele investigaţiilor efectuate pe probele de apă recoltate din surse locale sunt sistematizate în tabelul 1.

Analiza datelor din tabel arată că din cele 226 de probe analizate, 106 (46,90%), au fost confirmate ca fiind contaminate cu bacterii coliforme termotolerante, din care 95 de probe reprezentând 89,62% au fost contaminate cu *Escherichia coli*.

În sezonul rece, din cele 106 probe de apă analizate, 46 (43,39%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu bacterii coliforme termotolerante, iar 39 (84,78%) din acestea au fost confirmate ca fiind contaminate şi cu *Escherichia coli*, în timp ce în sezonul cald, din cele 120 de probe analizate, 60 (50,00% din probe) au fost confirmate ca fiind contaminate cu bacterii coliforme termotolerante din care 56 (93,33%) au fost confirmate ca fiind contaminate şi cu *Escherichia coli.*

Media valorilor pentru bacteriile coliforme termotolerante înregistrate în cei patru ani de studiu a crescut de la *6,34x10/100 ml* - valoare calculată pentru sezonul rece, la 1,*24x10^{2}/100 ml* - valoare calculată

pentru sezonul cald. În acelaşi mod, variaţia sezonieră a valorilor medii multianuale calculate pentru *Escherichia coli* a înregistrat o creştere de la *2,05x10/100 ml* - valoare calculată pentru sezonul rece , la *6,72x10/100 ml* - valoare medie calculată pentru sezonul cald.

Calitatea microbiologică a apei din sursele de suprafaţă rezultă din analiza datelor sistematizate în tabelul 2. Se constată că din cele 126 de probe de apă analizate, 124 probe (98,41%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu bacterii coliforme termotolerante, din care 118 (93,65%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu *Escherichia coli.*

În sezonul rece, cele 46 de probe analizate (100%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu bacterii coliforme termotolerante, din care 45 (97,82%) au fost confirmate ca fiind contaminate şi cu *Escherichia coli*, în timp ce în sezonul cald, din cele 80 de probe analizate, 78 (97,50%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu bacterii coliforme termotolerante din care 73 (91,25%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu *Escherichia coli.*

Creşterea ponderii apelor de suprafaţă contaminate cu bacterii coliforme termotolerante şi *Escherichia. coli* în sezonul rece ar putea avea drept cauze intensitatea mai redusă a radiaţiilor UV şi antrenarea spre albia apelor de suprafaţă a microorganismelor de pe suprafaţa solului de către apele rezultate din topirea zăpezii.

Media valorilor multianuale calculate pentru *bacteriile coliforme termotolerante* a suferit o creştere de la *2,60x10^2/100 ml* - valoare calculată pentru sezonul rece, la *6,72x10^2 /100 ml* - valoare calculată pentru sezonul cald. Acelaşi lucru s-a observat şi în cazul valorilor medii calculate pentru *Escherichia coli,* care au crescut de la *1,49x10^2/100 ml* - valoare medie multianuală calculată pentru sezonul rece, la *6,23x10^2/100 ml* - valoare calculată pentru sezonul cald.

Tabelul nr. 1

Incidenţa bacteriilor coliforme termotolerante şi a speciei *Escherichia coli* în sursele de apă locale utilizate pentru adăparea animalelor

Sezon	An	Total	Probe cu nr. CTT ≤ 2/ 100 ml	%	Probe cu nr. CTT ≥2 / 100 ml	%	Valoare. minimă Valoare maximă	Medie	Probe cu nr. de E.coli ≥2 / 100 ml	%	Valoare minimă Valoare maximă	Media
Rece	2003	26	15	57,69	11	42,30	0,02 - 5,42x10^2	7,50x10	9	81,81	0,2-9,4x10	1,61x10
	2004	24	11	45,83	13	54,16	0,03-1,70x10^2	4,24x10	11	84,61	0,2-3,1x10	1,30x10
	2005	26	15	57,69	11	42,30	0,06-3,5x10^2	8,74x10	10	90,90	0,02-1,09x10^2	3,24x10
	2006	30	19	63,33	11	48,81	0,02-1,41x10^2	4,88x10	9	81,80	0,2-3,30x10	2,05x10
Total		106	60	56,60	46	43,39		6,34x10	39	84,78		2,05x10
Cald	2003	30	17	56,66	13	43,33	0,02-5,42x10^2	9,96x10	12	92,30	0,02-1,72x10^2	4,25x10
	2004	30	14	46,66	16	53,33	0,02-5,42x10^2	1,21x10^2	15	93,75	0,02-2,78x10^2	5,51x10
	2005	30	14	46,66	16	53,33	0,02-8,0x10^2	1,02x10^2	14	87,50	0,02-6,30x10^2	7,17x10
	2006	30	15	50,00	15	50,00	0,06-5,42x10^2	1,76x10^2	15	100,00	0,02-3,48x10^2	9,98x10
Total		120	60	50,00	60	50,00		1,24x10^2	56	93,33		6,72x10
Total general		226	120	53,09	106	46,90		9,37x10	95	89,62		4,38x10

Tabelul nr. 2

Aspecte privind incidenţa bacteriilor coliforme termotolerante şi a speciei Escherichia coli în sursele de apă de suprafaţă utilizate pentru adăparea animalelor

Sezon	An	Total probe	Probe pozitive pentru CTT	%	Valoare Minimă Maximă Medie	Probe pozitive pentru EC	%	Valoare Minimă Maximă Medie
Rece	2003	8	8	100	0,007-1,60x10^3 5,39x10^2	8	100	0,02-7,0x10^2 2,25 x10^2
	2004	8	8	100	0,09-,42x10^2 3,08x10^2	8	100	0,02-4,0x10^2 1,05 x10^2
	2005	15	15	100	0,07-8,0x10^2 1,22x10^2	15	100	0,02-2,4x10^2 5,9x10
	2006	15	15	100	0,007-1,3x10^3 3,8x10^2	14	93,33	0,02-7,0x10^2 2,07x10^2
Total		46	46	100	2,6 x10^2	45	97,82	1,49x10^2
Cald	2003	20	20	100	0,009-2,78x10^3 9,05x10^2	19	95,0	0,04-9,4x10^2 3,28 x10^2
	2004	20	20	100	0,004-2,21x10^3 7,19x10^2	16	80	0,002-1,2x10^3 4,02x10^2
	2005	20	19	95,00	0,007-7,0x x10^3 9,5 x10^2	19	95,00	0,002-5,0 x10^3 5,63 x10^2
	2006	20	19	95,00	0,0007-1,1 x10^4 1,15x 10^3	19	95,00	0,002-9,0 x10^3 1,20 x10^3
Total		80	78	97,5	6,72 x10^2	73	91,25	6,23 x10^2
Total general		126	124	98,41	4,66 x10^2	118	93,65	3,86 x10^2

CONCLUZII

1. Pentru determinarea numărului probabil de bacterii coliforme termotolerante şi *Escherichia*
2. *coli* /100 ml, au fost analizate 352 de probe de apă din care 226 (64,20%) au fost recoltate din surse de apă locale (fântâni, izvoare, cişmele) şi 126 (35,79%) au fost recoltate din surse de apă de suprafaţă (râuri, pâraie, lacuri, bălţi), utilizate pentru adăparea animalelor.
3. Din cele 226 de probe de apă recoltate din surse locale de adăpare, 106 (46,90%) au fost confirmate ca fiind contaminate cu bacterii coliforme termotolerante, din care 95 (89,62%) au fost contaminate cu *Escherichia coli*
4. Din cele 126 de probe de apă recoltate din surse de suprafaţă utilizate pentru adăpare, 124 (98,41%) au fost contaminate cu bacterii coliforme termotolerante, din care 118 (93,65%) au fost contaminate cu *Escherichia coli*.
5. Apa din sursele de suprafaţă a fost mai frecvent contaminată cu bacterii coliforme fecale şi *Escherichia coli* comparativ cu apa din sursele locale (98,41% din sursele de apă de suprafaţă, comparativ cu 46,90% din sursele de apă locale analizate pentru coliformi termotoleranţi, respectiv 93,65% din probele de apă de suprafaţă pozitive pentru coliformi fecali, comparativ cu 89,62% din probele de apă din surse locale).
6. În cazul surselor locale, ponderea apelor contaminate cu bacterii coliforme fecale şi *Escherichia coli* a crescut în sezonul cald comparativ cu cel rece, de la 43,39% la 50,00% din probele analizate, respectiv de la 84,78% , la 93,33% din probele pozitive pentru coliformi fecali .

7. Ponderea apelor de suprafaţă contaminate cu coliformi fecali (100% din probe) şi cu *Escherichia coli (*97,82% din probe) în sezonul rece, a scăzut în sezonul cald (97,50%, respectiv 91,25% din probe).
8. Valorile medii pentru *MPN* bacterii coliforme fecale şi a ale MPN pentru *Escherichia coli* au crescut în sezonul cald comparativ cu cel rece, atât în apa din sursele de suprafaţă cât şi în apa din sursele locale.

BIBLIOGRAFIE

1. Clark J., A.,1990 - The Presence Absence test for monitoring water quality in G.A. McFeters [Ed] Drinking Water Microbiology, 20: 293 – 298
2. Dufour A.,P.,1977 - Escherichia coli the faecal coliform . In A.W. Hoadlez and B., J., Dutka [Ed] bacterial Indicators; Health Hazard Associated with Water American Societyfor Testing Materials, Philadelphya, 48 – 58.
3. Dutka B.,J., 1975 - Coliforms are Inadequate Index of Water Quality – J. Environ Health, 36: 39 - 46
4. Figueras M.,J., Polo F., Inza I., and Guarro J., 1994 - Past, present and future perspectives of the EU Bathing Waters Directives. Marrine Pollution Bulletin , 34:148 – 156.
5. Gleeson G., and Gray N., 1997 - The colliform index and waterborne disease problems of microbial drinking water. Assesement. Chapmann and Hall, London, 191.
6. Hardina C., M., Fujioka R.,S., 1991 - Soil: The Environmental source of Escherichia coli and Enterococi in Hawaii's stream. Environmental Toxicology Water Quality, 6, p 185 – 195.
7. Noel Krieg , Williams and Wilkins, 1984 - Bergey's Manual of Systemic Bacteriology , vol I.
8. WHO, 1993, Guidlines for Drinking Water Quality 2nd Edition, World Health Organisation , Geneva.

EFECTUL COMPARATIV AL SUPLIMENTĂRII HRANEI TINERETULUI PORCIN CU ANTIBIOTICE (*TIAMUTIN*), ŞI PROBIOTICE (*BIO PLUS 2B*)

COMPARATIVE EFFECT OF FOOD SUPPLEMENT YOUTH SWINE WITH ANTIBIOTICS (TIAMUTIN) AND PROBIOTICS (BIO PLUS 2B)

ROSU M., FALCA C.
DSVSA Arad, USAMVB Timişoara

On the entire experimantal period the most decrease incidence of the digestive disorders was recorded at the TIAMUTIN batch. The administration of the two growth promotors determinated a verz important decrease of the mortality is because of the digestive disorders.

In comparasion with the control batch the administration of the antibiotic TIAMUTIN led to a decrease of the mortality with 56,84%. In which regards the number of low weight pig which was supplied with TIAMUTIN it was observed a decrease with 26,32% and with 2,64% in the case of the probotics BIO PLUS 2B.

Key words: youth swine, antibiotic, probiotic, mortality

MATERIALE ŞI METODE

Experimentul s-a desfaşurat într-un complex de creştere industrială a porcinelor iar animalele incluse in test au fost obţinute în fermă, din mame F1 (Landrace x Marele Alb) şi vieri terminali (50 % Hampshire şi 50 % Petrain) transferaţi în hala de creştere la vârsta de 60 de zile.

Pentru efectuarea determinarilor au fost alcatuite trei loturi iar in cadrul loturilor au fost stabilite boxe de control a cate 20 de animale. Loturile luate în testare au fost:

- Lot martor - M (fără supliment nutritiv) - 439 de animale în compartiment
- Lot experimental - E 1 (cu antibiotic - *Tiamutin*) - 453 de animale în compartiment.
- Lot experimental - E 2 (cu probiotic - *Bio Plus 2B*) - 488 de animale în compartiment

Loturile constituite au fost supuse aceloraşi condiţii de microclimat iar animalele au fost furajate identic cu excepţia suplimentului nutritiv care a fost adugat in cantitate de 150 g/tona de furaj la lotul E1 iar aditivul furajer *BioPlus 2B* ce conţine *Bacillus licheniformis* şi *Bacillus subtilis* a fost introdus în furaj în cantitate de 0,7 kg/tona de furaj.

Pe parcursul perioade de testare au fost înregistrate toate cazurile tratate pentru tulburări digestive şi respiratorii dar şi mortalitatea din fiecare compartiment.

REZULTATE OBŢINUTE

Inregistrările rezultatelor s-au făcut pe două etape a câte 30 de zile, între cântăririle efectuate pentru determinarea sporului de masă corporală şi a sporului mediu zilnic (cântăriri efectuate la vârsta de 65, 95 şi 125 de zile).

Rezultatele globale privind îmbolnăvirile şi mortalităţile sunt redate în tabelul 1 iar în tabelul 2 si figura 1 sunt prezentate sintetic rezultatele privind influenţa promotorilor adăugaţi, asupra incidenţei diareelor la animalele din loturile testate dar şi mortalitatea înregistrată.

Din datele obtinute se poat remarca următoarele aspecte:

- în perioada 65-95 de zile, cea mai scăzută incidenţă a diareei s-a înregistrat la lotul E 2, la care furajul a fost suplimentat cu probioticul *Bio Plus 2B.* Frecvenţa diareei a fost

mai mică la lotul cu *Bio Plus 2B* cu 53,53 % comparativ cu lotul martor şi cu 43,11 % comparativ cu lotul E 1.

- în perioada 95-125 de zile, cea mai redusă incidență a diareei s-a înregistrat la lotul E 1, la care furajul a fost suplimentat cu antibiotic. Comparativ cu celelalte loturi aflate în testare, frecvența diareei la lotul E 1 a fost mai mică cu 47,86 % decât la lotul M și cu 44,56 % comparativ cu lotul E 2
- pe parcursul întregii perioade experimentale (65-125 de zile), cea mai scăzută incidență a tulburărilor digestive a fost înregistrată la lotul E 1 la care furajul a fost suplimentat cuantibiotic. Incidența diareei a fost mai scăzută cu 47,83 % comparativ cu lotul M și cu 32,4 % comparativ cu lotul E 2 la care furajul a fost suplimentată cu probiotic.

Efectul antibioticului *Tiamutin* a fost relativ constant pe toată durata experimentului, diferența dintre numărul de animale înregistrate cu tulburări digestive în perioada 65-95 de zile fiind foarte apropiat de cel al animalelor îmbolnăvite în perioada 95-125 de zile. In acest caz se poate concluziona ca efectul antibioticului nu a fost influențat de vârsta animalelor.

Probioticul *Bio Plus 2B* a avut o influență mai importantă în prima perioadă de testare când numărul de animale îmbolnăvite a fost chiar mai mic decât la lotul la care furajul a fost suplimentat cu antibiotic şi egal cu numărul de îmbolnăviri înregistrate la lotul la care hrana a fost suplimentată cu enzime. In a doua perioadă de testare, numărul de animale îmbolnăvite s-a dublat aspect ce indică faptul ca o dată cu creşterea vârstei, efectul probioticului s-a diminuat considerabil.

Din analiza datelor rezultate cu privire la numărul de animale moarte din loturile aflate în testare se pot evidenția următoarele aspecte:

- în perioada 65-95 de zile cel mai mare număr de animale moarte ca urmare a tulburărilor digestive a fost înregistrat la lotul martor iar cel mai mic a fost înregistrat la lotul E 1, la care furajul a fost suplimentat cu antibiotic. Mortalitatea înregistrată la lotul E 2 a fost mai mică cu 62,64 % comparativ cu lotul M dar cu 15,9 % mai mare decât la lotul E 1.
- în perioada 95-125 de zile, cel mai mare număr de animale moarte ca urmare a tulburărilor digestive a fost înregistrat la lotul martor iar cel mai mic a fost înregistrat la lotul E 1, la care furajul a fost suplimentat cu *Tiamutin.*
- pe întreaga perioadă de testare cea mai scăzută mortalitate datorată cauzelor digestive a fost înregistrată la lotul E 1. La lotul E 2, mortalitatea a fost mai mare cu 34, 1 % comparativ cu E 1şi cu 42,09 % mai mică decât la lotul M.
- numărul de animale tarate înregistrat la loturile experimentale a fost; 28 animale la lotul E 1,respectiv 37 de animale la lotul E 2 şi 38 animale la lotul M. Cel mai mic număr de animale tarate a fost înregistrat la lotul E 1, acesta a fost mai mic cu 26,32 % față de lotul M. La lotul E 2 numărul de animale tarate a fost cu 2,64 % mai mic decât la lotul M.

Tabelul 1

Situația îmbolnăvirilor şi a mortalității la animalele din loturile experimentale

Perioadă (zile)	U.M.	Lotul M				Lotul E 1				Lotul E 2			
		d	r	m		d	r	m		d	r	m	
				d	r			d	r			d	r
65-95	nr. de animale	313	490	12	3	264	322	4	1	204	513	5	1
95-125	nr. de animale	498	588	8	10	254	299	5	19	490	455	8	13
65-125	nr. de animale	811	998	20	13	518	551	9	20	694	968	13	14

d=digestiv; r=respirator; m=morți

Tabelul 2

Incidența diareei la porcinele din loturile aflate în testare

Perioadă (zile)	Specificare	U.M.	Lotul M	Lotul E 1	Lotul E 2
65-95	număr de animale/lot	nr. de animale	439	453	488
	număr de animale tratate de diaree/lot	nr. de animale	313	264	164
	număr de tratamente/animal	%	0,71	0,58	0,33
95-125	număr de animale/lot	nr. de animale	424	448	482
	număr de animale tratate de diaree/lot	nr. de animale	498	254	490
	număr de tratamente/animal	%	1,17	0,56	1,01
65-125	număr de animale/lot	nr. de animale	439	453	488
	număr de animale tratate de diaree/lot	nr. de animale	811	518	694
	număr de tratamente/animal	%	1,84	1,14	1,42
65-125	E 1 si E 2 din M	%	100	61,95	77,17

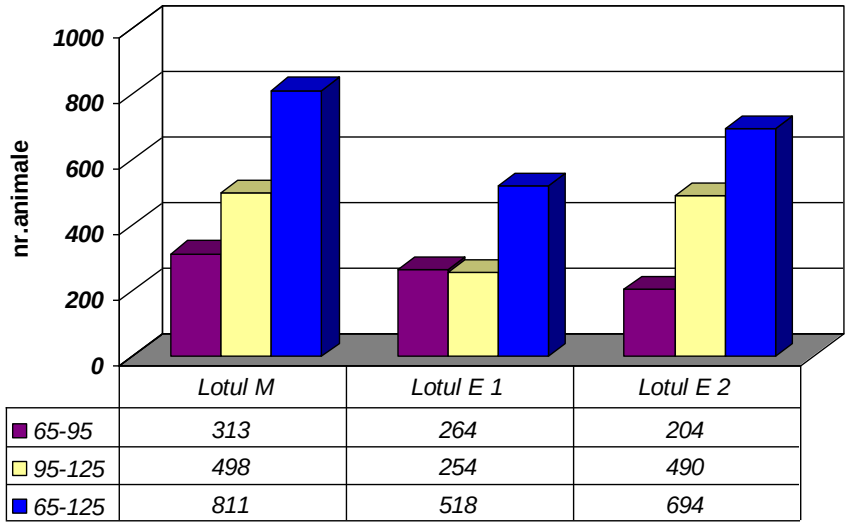


Fig. 1. Incidența diareei la porcinele din loturile aflate în testare

CONCLUZII

1. pe întreaga perioadă experimentală, cea mai scăzută incidență a tulburărilor digestive s-a înregistrat la lotul cu *Tiamutin*
2. pe perioada 65-95 de zile*, Bio Plus 2B* a determinat scăderea semnificativă a numărului de animale tratate pentru tulburări digestive, acesta fiind mai mic cu 43, 11 % comparativ cu lotul suplimentat cu antibiotic. Odată cu creşterea vârstei animalelor, efectul amestecului probiotic s-a diminuat considerabil, pe întreaga peioadă de testare numărul de animale tratate fiind semnificativ mai mic decât la lotul martor (cu 22,83 %) dar mai mare comparativ cu lotul suplimentat antibiotic (cu 15,22%).
3. administrarea celor doi promotori de creştere a determinat o scădere semnificativă a mortalității datorate tulburărilor digestive. Cea mai scăzută mortalitate datorată cauzelor digestive a fost înregistrată la lotul la care furajul a fost suplimentat cu antibiotic. Administrarea antibioticului *Tiamutin* a dus la o scădere a mortalitatii cu 56,84 % comparativ cu lotul martor.
4. administrarea celor doi promotori de creştere a dus la scăderea numărului de animale tarate cu; 26,32 % în cazul lotului la care furajul a fost suplimentat cu *Tiamutin* şi respectiv cu 2,64 % în cazul lotului la care în furaj au fost adăugate bacterii probiotice (*Bio Plus 2B*)

BIBLIOGRAFIE

1. Bartkevičiūtė, Z., Černauskienė, J., Jerešiūnas, A., Kulpys, J., Jeroch, H., 2005. Einfluss des Probioticums Bomvital auf die Mast- und Schlachteistung von Schweinen. 4 BOKU-Symposium Tierernährung, 34-42.
2. Hadani, A., Ratner, D., Doran, O., 2002. Probactrix – Probiotic in the prevention of infectious bacterial diarrhoea of piglets. Israel Veterinary Medical Association, 57(4).
3. Mosenthin, R., Bauer, E., 2000. The potential use of prebiotics în pig nutrition. Asian-Australasian Journal of Animal Science 13: 315-325.
4. Patterson, A.J., 2005. Prebiotic Feed Additives: Rationale and Use în Pig. Advances în Pork Producție, 16: 149.

ASPECTE CITOLOGICE ALE LAPTELUI IN INFECŢIILE INTRAMAMARE LA VACĂ

CYTOLOGICAL ASPECTS OF MILK IN INTRAMAMMARY INFECTIONS IN COW

ROTARU ELENA, TASBAC B., CIOBOTARU EMILIA, MITRANESCU ELENA, NICORESCU V.
Facultatea de Medicină Veterinară Bucureşti
elenrotaru@yahoo.com

The aim of the present research was the investigation of the relation between intra-mammary infections and cellular formula of milk in cow.

There were obtained milk samples for bacteriological and cytological exams from 10 cows diagnosed with clinical mammitis, and also it was performed Californian test in order to appreciate the number of somatic cells.

Bacteriological investigations of the samples lead to the isolation and identification of the following bacterial species: Arcanobacterium pyogenes - 6 strains, Streptococcus agalactiae - 5 strains, Staphylococcus aureus - 3 strain.

Cytological examinations revealed that there was a correlation among the pathogenic agent and the percentage of neutrophils and the epithelial cells: for Arcanobacterium pyogenes , 70.19% - 83.76%, neutrophils and 27.15% - 9.42% epithelial cells, for Streptococcus agalactiae neutrophils values varied from 18.47% to 89.08%, and for the epithelial cells from 17.20% to 1.27% and for Staphylococcus aureus neutrophils value was 39.05%, and of epithelial cells of 10.71%.

Key words: cow mastitis, bacteria, epithelial cells, neutrophils

Supravegherea contaminării laptelui cu bacterii patogene reprezintă preocuparea majoră a producătorilor şi a procesatorilor. De aceea, cercetarerea în domeniu urmăreşte identificarea mijloacelor rapide şi eficiente pentru diagnosticul infecţiilor intramamare. Bibliografia de specialitate demonstrează importanţa lactocitogramelor ca metode pentru diagnosticul mamitelor (2). Cunoscută fiind proporţia procentuală diferită a tipurilor de celule somatice din lapte după diverşi autori, lucrarea a identificat populaţia celulară consecutiv infecţiei intramamare într-o exploatație de vaci din apropierea Bucureştiului.

MATERIALE ŞI METODE

Eşantionul luat în studiu a fost reprezentat dintr-un lot de 10 vaci cu vârste cuprinse între 3 şi 9 ani, aflate în diferite stadii ale lactaţiei şi care prezentau mamită clinică. Probele au fost prelevate la mulsul de dimineaţă şi expediate către laborator în aceeaşi zi. Mai mulţi autori au demonstrat că probele prelevate după muls sunt mai puţin susceptibile de a fi contaminate, deoarece mamelonul şi canalul papilar sunt spălate şi aseptizate (Coulon, 1999; Coulon et al., 1996). Există însă şi autori care susţin că, în cazul în care personalul este specializat şi procedura de prelevare corect executată, diferenţa între contaminarea unui eşantion înainte sau după muls este minimă (Serieys, 1985). În lucrarea de faţă, a fost exclusă prelevarea în zilele de vineri, pentru a se evita congelarea probelor până la începutul săptămânii următoare (când puteau fi transportate către laborator). Tehnica de prelevare a fost cea uzuală utilizând pentru antisepsia glandei mamare produsul Desonet. Eprubetele au fost individualizate iar după recoltare refrigerate şi transportate la laborator. Înainte de prelevare a fost realizat testul californian (Californian mastitis test - CMT) pentru aprecierea numărului de celule somatice. Proba martor a fost prelevată de la o vacă cu glanda mamară sănătoasă clinic şi cu rezultate negative la CMT. Examenele bacteriologice şi citologice au fost realizate conform

protocoalelor clasice. Din cele 10 probe pozitive bacteriologic, s-a realizat examen citologic pentru 6. Au fost numărate neutrofilele şi celulele epiteliale iar valorile au fost exprimate procentual.

REZULTATE ŞI DISCUȚII

Rezultatele acestui studiu care asociază concentrația celulară şi bacteriologia probelor prelevate din sferturile glandei mamare oferă o imagine punctuală relevând efectul infecției intramamare asupra numărului de celule somatice din lapte la vacă.

Rezultatele examenului CMT sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul nr. 1
Rezultatele examenului CMT

Nr. crt.	Număr matricol al vacii	Vârsta animalului	Sfertul / sferturile clinic afectate	Rezultatul examenului CMT	
1	3185	3 ani	SDA	SSA = negativ	SDA = pozitiv
				SSP = negativ	SDP = negativ
2	3009	7 ani	SDA SSP SDP	SSA = negativ	SDA = extrem de pozitiv
				SSP = pozitiv	SDP = intens pozitiv
3	3249	5 ani	SSP	SSA =negativ	SDA =negativ
				SSP = extrem de pozitiv	SDP =negativ
4	2996	8 ani	SSP	SSA = negativ	SDA= negativ
				SSP = intens pozitiv	SDP = extrem de pozitiv
5	3001	6 ani	SSP	SSA =negativ	SDA =negativ
				SSP = intens pozitiv	SDP =negativ
6	3010	5 ani	SDA	SSA = negativ	SDA = intens pozitiv
				SSP =negativ	SDP =negativ
7	2924	9 ani	SDP	SSA =negativ	SDA =negativ
				SSP =negativ	SDP = pozitiv
8	3075	5 ani	SSP SDP	SSA =negativ	SDA =negativ
				SSP = intens pozitiv	SDP = intens pozitiv
9	3005	4 ani	SSA	SSA = pozitiv	SDA= negativ
				SSP =negativ	SDP =negativ
10	3549	4 ani	SSP	SSA =negativ	SDA =negativ
				SSP = pozitiv	SDP =negativ

Legenda
SDA - sfert dreapta anterior; SSA - sfert stânga anterior;
SDP - sfert dreapta posterior; SSP - sfert stânga posterior.

Negativ – până la 200.000 celule somatice; uşor pozitiv – 150.000 – 500.000; pozitiv – 400.000-1.500.000; intens pozitiv – 800.000 – 5.000.000; exterm de pozitiv – peste 5.000.000 celule somatice

Pentru toate cazuri luate în studiu se constată reacţii pozitive la cel puţin unul din sferturi. Toate probele pozitive la CMT au fost analizate bacteriologic. Proba martor a fost negativă pentru toate cele 4 sferturi ale glandei mamare, dar s-a recurs în continuare şi la examen bacteriologic şi citologic.

Rezultatele examenului bacteriologic

În urma examenelor bacteriologice, principalele bacterii izolate au fost următoarele:

- Staphylococcus aureus;
- Arcanobacterium pyogenes;
- Streptococcus agalactiae.

Ponderea acestor specii bacteriene în laptele mamitic este prezentată în Fig. 1, iar rezultatele examenelor bacteriologice în tabelul 2.

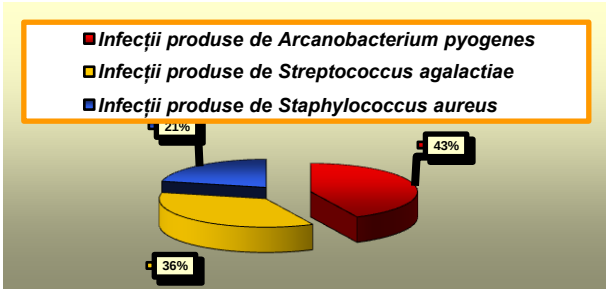


Fig. 1. Ponderea diferiţilor agenţi patogeni în infecţiile intramamare

Tabelul nr. 2
Rezultatul examenului bacteriologic

Nr.crt.	Număr matricol al vacii	Vârsta animalului	Sfertul/ sferturile clinic afectate	Rezultatul examenului bacteriologic
1	3185	3 ani	SDA	*Arcanobacterium pyogenes*
2	3009	7 ani	SDA	*Streptococcus agalactiae*
			SDP	*Streptococcus agalactiae*
			SSP	*Streptococcus agalactiae*
3	3249	5 ani	SSP	*Arcanobacterium pyogenes*
4	2996	8 ani	SSP	*Streptococcus agalactiae*
			SDP	*Arcanobacterium pyogenes*
5	3001	6 ani	SSP	*Arcanobacterium pyogenes*
6	3010	5 ani	SDA	*Staphylococcus aureus*
7	2924	9 ani	SDP	*Staphylococcus aureus*
8	3075	5 ani	SSP	*Arcanobacterium pyogenes*
			SDP	*Arcanobacterium pyogenes*
9	3005	4 ani	SSA	*Staphylococcus aureus*
10	3549	4 ani	SSP	*Streptococcus agalactiae*

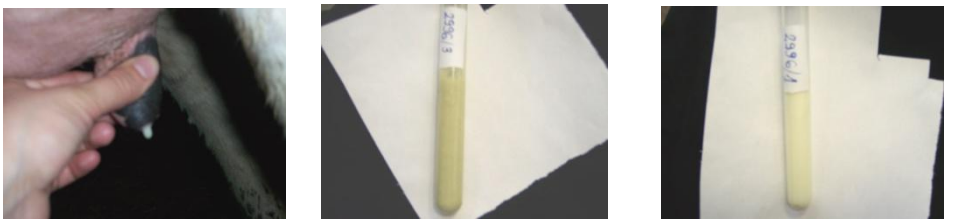
Legenda:

SDA - sfert dreapta anterior; SSA - sfert stânga anterior;

SDP - sfert dreapta posterior; SSP - sfert stânga posterior.

Analizând datele prezentate în tabelul 1 se observă că în 5 din cele 10 cazuri a fost izolat *Arcanobacterium pyogenes,* în 3 *Streptococcus agalactiae* şi 2 *Staphylococcus aureus.*

După izolarea şi identificarea germenilor se constată în infecţia cu *Arcanobacterium pyogenes* laptele prezenta miros ihoros şi modificări pronunţate ale consistenţei (Fig. 2 a, b) comparativ cu infecţia cu *Streptococcus agalactiae* în care nu s-au prezentat modificări organoleptice majore, putându-se sesiza doar prezenţa unor flocoane de mici dimensiuni (Fig. 2 c).



a **b** **c**

Fig. 2. Aspecte ale laptelui mamitic: lapte cu consistenţă crescută (a şi b); lapte fără modificări organoleptice pronunţate (c)

Rezultatul examenului citologic

Interpretarea citologică s-a bazat pe corelaţia existentă între numărul de neutrofile şi celule epiteliale şi existenţa infecţiei glandei mamare, corelaţie observată de numeroase cercetări. Astfel, neutrofilele au un important rol în controlul şi eliminarea infecţiei bacteriene. După Diana Argherie (1), în inflamaţiile foarte grave ale glandei mamare această categorie de celule poate să atingă valori de până la 90%, iar în formele supurative valori de 80-85%. După acelaşi autor, în laptele normal, valoarea celulelor epiteliale este de 6,81 %. Valorile crescute apar ca urmare a alterării epiteliului secretor, consecutiv dezvoltării procesului inflamator si infecţios. În cazul martorului, valorile neutrofilelor au fost de 40,36%, ale celulelor epiteliale de 7,42% şi ale altor celule de 52,22%.

Rezultatele examenului citologic sunt redate în tabelul 3 şi tabelul 4. Din datele prezentate, se constată valori ale neutrofilelor cuprinse între 18,47% şi 89,09% şi ale celulelor epiteliale între 7,45% şi 27,15%.

Analizând datele prezentate în tabelul 4 se constată următoarele:

- în mamita cu *Arcanobacterium pyogenes,* neutrofilele au avut o valoare medie de 76,23% şi celulele epiteliale 16,25%

- în mamita streptococică, valoarea medie a neutrofilelor a fost de 59,70% şi a celulelor epiteliale de 9,83%, comparativ cu 49,85% respectiv 3,11% (2).

- în mamita stafilococică au fost obţinute valori medii ale neutrofilelor de 39,2% şi ale celulelor epiteliale de 10,71%, comparativ cu 33,83% respectiv 1,96% obţinute de Diana Argherie (1) şi martor 40,36% respectiv 7,42%.

Ponderea diferitelor tipuri celulare obţinute. în comparaţie cu martorul este prezentată în figurile 3-5. Se poate constata că răspunsul celular în cazul infecţiei intramamare cu *S aureus* la vacă este scăzut comparativ cu ceilalţi agenţi patogeni izolaţi.

Tabelul nr. 3

Rezultatele procentuale ale celulelor din laptele mamitic analizat

Nr. caz	Nr.matricol al vacii	Sfertul/ sferturile clinic afectate	Rezultatul examenului citologic	
			Tipuri de celule	Procentul
1	3185	SDA	NEUTROFILE	77,70 %
			CELULE EPITELIALE	13,37 %
			ALTE CELULE	8,90 %
2	3009	SDA	NEUTROFILE	89,08 %
			CELULE EPITELIALE	7,45 %
			ALTE CELULE	3,50 %
		SDP	NEUTROFILE	64,15 %
			CELULE EPITELIALE	17,20 %
			ALTE CELULE	18,63 %
		SSP	NEUTROFILE	67,11 %
			CELULE EPITELIALE	13,42 %
			ALTE CELULE	19,42 %
3	3249	SSP	NEUTROFILE	83,76 %
			CELULE EPITELIALE	9,42 %
			ALTE CELULE	6,80 %
4	2996	SSP	NEUTROFILE	18,47 %
			CELULE EPITELIALE	1,27 %
			ALTE CELULE	80,25 %
		SDP	NEUTROFILE	70,19 %
			CELULE EPITELIALE	27,15 %
			ALTE CELULE	2,64 %
5	3001	SSP	NEUTROFILE	73,20 %
			CELULE EPITELIALE	15,07 %
			ALTE CELULE	11,73 %
6	3010	SDA	NEUTROFILE	39,05 %
			CELULE EPITELIALE	10,71 %
			ALTE CELULE	50,42 %

Legenda:

SDA - sfert dreapta anterior; SSA - sfert stânga anterior;

SDP - sfert dreapta posterior; SSP - sfert stânga posterior.

Tabelul nr. 4

Rezultatele procentuale ale celulelor din laptele mamitic analizat şi germenul prezent în proba de lapte

Nr. crt.	Nr. matricol al vacii	Sfertul / rile afectat/e	Rezultatul examenului citologic		Rezultatul examenului bacteriologic
			Tipuri de celule	Procentul	
1	3185	SDA	NEUTROFILE	77,77 %	Arcanobacterium pyogenes
			CELULE EPITELIALE	13,37 %	
			ALTE CELULE	8,90 %	
2	3009	SDA	NEUTROFILE	89,08 %	Streptococcus agalactiae
			CELULE EPITELIALE	7,45 %	
			ALTE CELULE	3,50 %	
		SDP	NEUTROFILE	64,15 %	Streptococcus agalactiae
			CELULE EPITELIALE	17,20 %	
			ALTE CELULE	18,63 %	
		SSP	NEUTROFILE	67,11 %	Streptococcus agalactiae
			CELULE EPITELIALE	13,42 %	
			ALTE CELULE	19, 42 %	
3	3249	SSP	NEUTROFILE	83,76 %	Arcanobacterium pyogenes
			CELULE EPITELIALE	9,42 %	
			ALTE CELULE	6,80 %	
4	2996	SSP	NEUTROFILE	18,47 %	Streptococcus agalactiae
			CELULE EPITELIALE	1,27 %	
			CELULE EPITELIALE	80,25 %	
		SDP	NEUTROFILE	70,19 %	Arcanobacterium pyogenes
			CELULE EPITELIALE	27,15 %	
			CELULE EPITELIALE	2,64 %	
5	3001	SSP	NEUTROFILE	73,20 %	Arcanobacterium pyogenes
			CELULE EPITELIALE	15,07 %	
			ALTE CELULE	11,73 %	
6	3010	SDA	NEUTROFILE	39,05	Staphylococcus aureus
			CELULE EPITELIALE	10,71	
			ALTE CELULE	50,42	

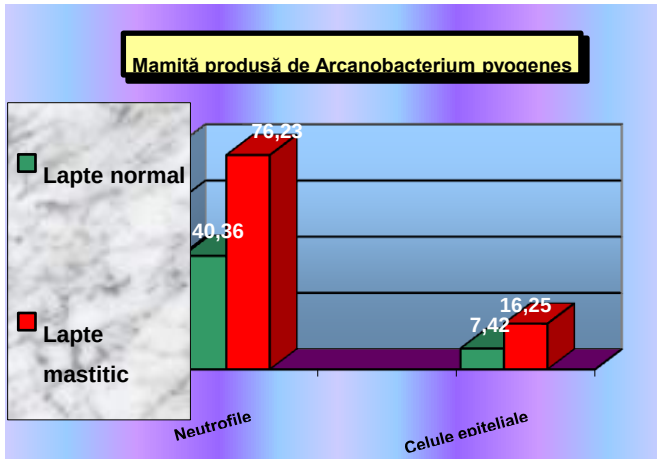


Figura nr. 3 – Variaţia procentuală a neutrofilelor şi celulelor epiteliale în infecţia cu Arcanobacterium pyogenes

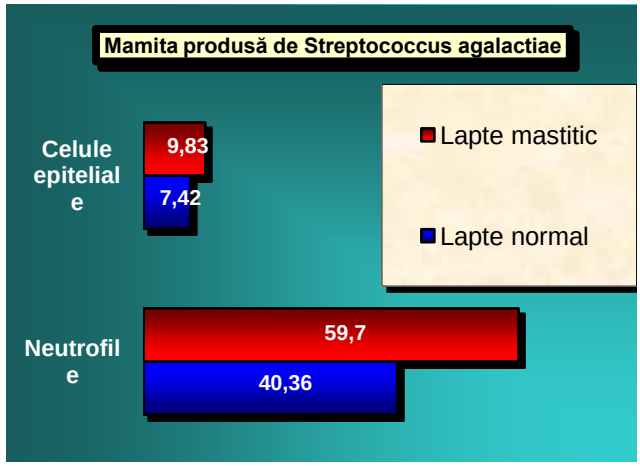


Figura nr. 4 – Variaţia procentuală a neutrofilelor şi celulelor epiteliale în infecţia cu Streptococcus agalactiae

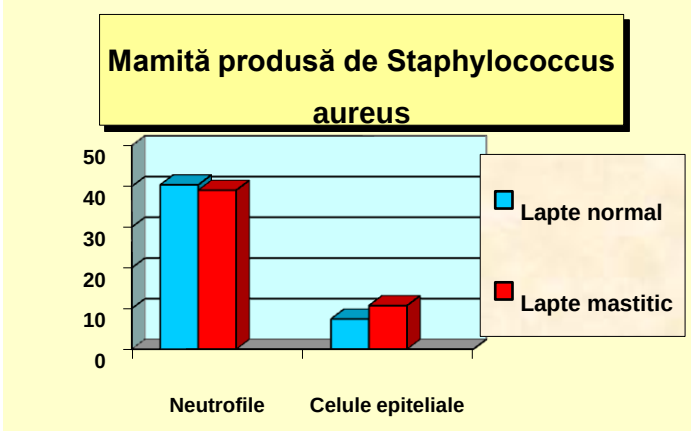


Figura nr. 5 – Variaţia procentuală a neutrofilelor şi celulelor epiteliale în infecţia cu Staphylococcus aureus

Ponderea procentuală a diverselor celule somatice este destul de variată. Este recunoscut faptul ca aceasta nu este pe deplin stabilită, existând încă diferenţe foarte mari între diverşi autori (2, 4).

CONCLUZII

In condiţiile de creştere a taurinelor în exploataţii din jurul Bucureştiului, bacteriile implicate în infecţiile intramamare la vacă sunt: *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*.

Identificarea acestora prezintă utilitate în abordarea strategiei de combatere (antibiograme) şi prevenire (intervenţie asupra lanţului epidemiologic).

Investigaţiile citologice au demonstrat că populaţia celulară consecutiv infecţiei intramare cu patogeni extra- şi intramamari cunoaşte variaţii raportat la agentul bacterian izolat.

Variabilitatea rezultatelor obţinute de la un animal la altul pentru acelaşi agent patogen demonstrează că numărul de celule somatice din lapte prezintă în mod fiziologic diferenţe sub influenţa a numeroşi factori interni şi externi ceea ce justifică continuarea cercetărilor.

Rezultatele obţinute demonstrează faptul că procesul inflamator intramamar determină o diapedeză a celulelor imunitare sanguine care contribuie la limitarea invaziei bacteriene. Prin proprietăţile lor fagocitare şi bactericide ele reprezintă elementul major de control al infecţiei mamare.

.

BIBLIOGRAFIE

1. Argherie Diana - Aspecte citologice ale celulelor din lapte în mamitele bacteriene la vaci - Revista de Politica Ştiinţei şi Scientometrie - Număr Special, 2005, ISSN 1582-1218.
2. Coulon J.B. - Facteurs pshyhologiques de variation des concentrations cellulaires du lait. Cellules somatiques du lait, Nantes, 26,27,28 mai 1999, Journées nationalles GTV-INRA, 131-135.
3. Coulon, J.B., Dover, F. ,Garel, J.P. - Facteurs de variation de la numeration cellulaire du lait chez des vaches indemnes de mammites cliniques, INRA Productions Animales, 1996, 9, 133-139.
4. Paape, M.J., Van, Oostveldt, K., Meyer, E. - Défense phagocytaire de la glande mammaire bovine. Cellules somatiques du lait, Nantes 26, 27, 28 mai 1999, Journées Nationales GTV-INRA, 15-30, 1999.
5. Serieys F. - Interprétation de concentrations cellulaires du lait individuel de vaches pour le du diagnostiques de l'état d'infection mammaires. Ann. Rech. Vet. 16;3, 263-269, 1985.

MODIFICĂRI CANTITATIVE ALE UNOR COMPONENTE BIOCHIMICE DIN COLOSTRUL DE OAIE RAPORTATE LA FACTORUL TIMP

TIME-RELATED QUANTITATIVE CHANGES OF SOME BIOCHEMICAL COMPONENTS OF SHEEP COLOSTRUM

ROTARU ELENA, POP ANETA, FAFANEATA CORNELIA, MITRANESCU ELENA, TASBAC B.
Facultatea de Medicină Veterinară Bucureşti, Splaiul Independentei 105, Bucureşti
elenrotaru@yahoo.com

The aim of the present approach is the evaluation of sheep colostrum composition in relationship to post-partum time. Colostrum samples were taken over a period of 20 hours post-partum from 7 ewes belonging to a private farm. Total proteins, lactose, γ-globulins were assayed. Alkaline phosphatase and γ-glutamyltransferase were also evaluated. All the analysed components presented time-related changes: proteins and γ-globulins decreased, lactose was higher in the first samples, decreased at 2 hours and then slowly started to increase. Alkaline phosphatase and γ-glutamyltransferase were higher in the first colostrum and then constantly decreased.

Key words: sheep colostrum, proteins, lactose, γ-globulins

INTRODUCERE

Alimentaţia post-natală cu colostru are numeroase implicaţii din punct de vedere nutriţional, cât şi imunologic, hormonal, hematologic. Compoziţia chimică a colostrului de la diferite specii a fost studiată de diverşi autori nu doar pentru semnificaţia nutritivă cât şi a conţinutului în compuşi non-nutritivi precum imunoglobulinele, enzimele, nucleotidele, peptidele, factorii de creştere, hormonii (Nardone şi col., 1997, Blum şi col., 2002, Georgiev 2005, Lee şi col., 2007, Molik şi col., 2008, Rudovsky şi col., 2008). Având în vedere faptul că în România creşterea oilor în sistem gospodăresc are tradiţii de secole, şi că atât nutriţia cât şi mediul de viaţă influenţează compoziţia colostrului şi a laptelui, ne-am propus să investigăm dinamica modificărilor cantitative ale unor componente biochimice din probe de colostru recoltate în primele 20 ore post-partum.

MATERIALE ŞI METODE

Lotul experimental de oi a fost reprezentat de 10 capete din rasa Ţigaie, crescute în sistem gospodăresc, provenite de la acelaşi producător. În urma analizei bacteriologice a probelor de colostru recoltate post-partum, au fost selectate pentru studiu 7 capete, cu probe bacteriologic sterile. Probele au fost prelevate imediat post-partum, înainte de primul supt, apoi la 2, 4, 6, 8 şi 20 ore post-partum.

Testele biochimice s-au realizat după ce probele de colostru au fost centrifugate la 4^0C, 30 minute, la 4000 rpm. Lactoza a fost dozată prin metoda UV, enzimatică cu reactivi Roche; proteinele totale au fost determinate prin metoda biuretului cu reactivi Cromatest, γ-globulinele au fost evaluate electroforetic cu un sistem DVSE-electrophoresis, folosindu-se reactivi Cormay, fosfataza alcalină şi γ-glutamiltransferaza au fost dozate colorimetric prin metoda cinetică, folosindu-se reactivi Cromatest..

REZULTATE ŞI DISCUȚII

Toate probele de colostru analizate au prezentat variații ale componetelor biochimice urmărite. Conținutul în proteine totale a scăzut în primele 16 ore post-partum, remarcându-se o creştere uşoară în probele recoltate la 20 ore post-partum (fig.1).

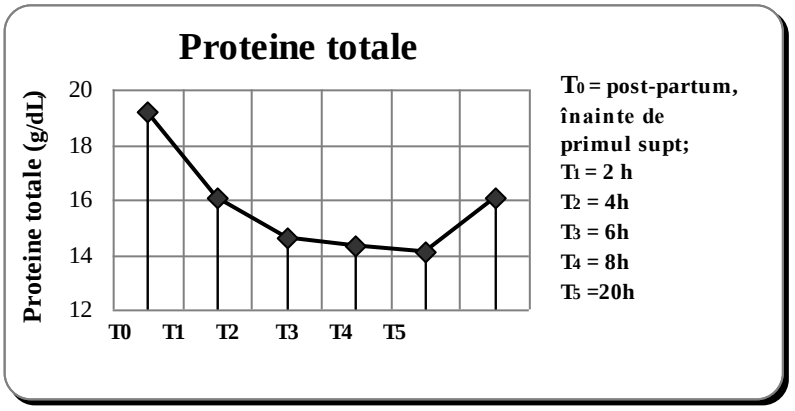


Figura 1. Dinamica concentrației proteinelor totale în colostru la diferite intervale de timp

Procentul de γ-globuline descreşte constant în perioada de timp analizată (fig.2).

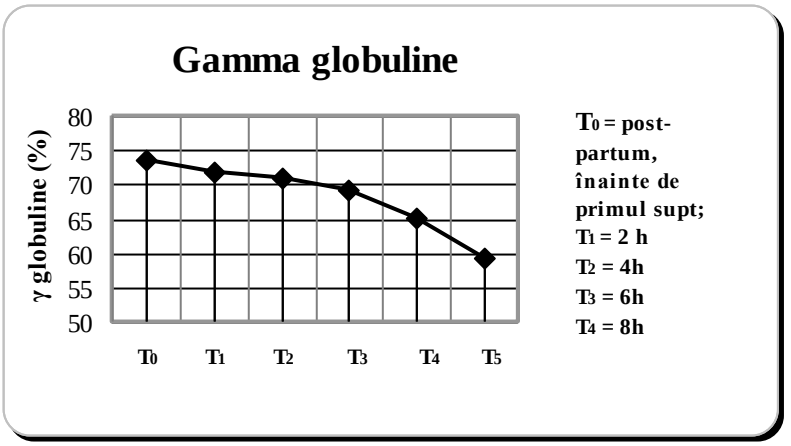


Figura 2.Variația procentului de γ-globuline în colostru

Aceste rezultate sunt în concordanță cu alte date din literatură, fiind semnalată scăderea nivelului imunoglobulinelor la majoritatea speciilor studiate (Arguello si col. 2006, Georgiev, 2005).

Variația conținutului de lactoză urmează un profil diferit de cele ale proteinelor şi imunoglobulinelor, concentrația fiind mai mare în prima probă post-partum, după care scade, iar la probele recoltate la 20 ore înregistrează o uşoară creştere (fig.3).

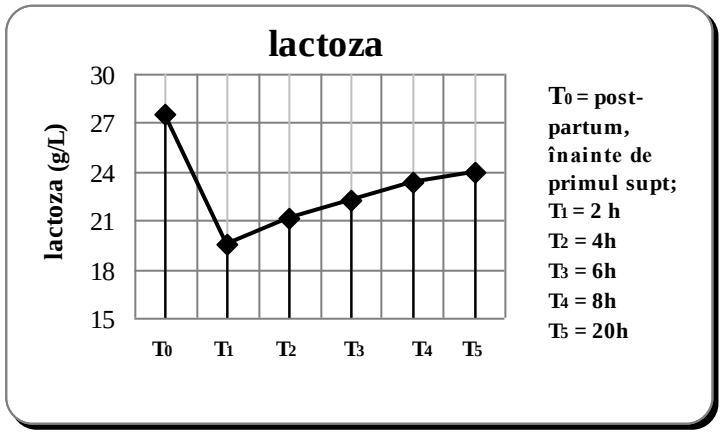


Figura 3. Variația în timp a concentrației de lactoză din colostru

Activităţile enzimelor fosfataza alcalină si γ-GT scad constant de la primul colostru până la ultima probă analizată. Rezultate similare în privinţa scăderii activităţii fosfatazei alcaline odată cu creşterea perioadei de lactaţie raportează şi Maden şi col. (2002).

Rezultatele obţinute prezintă o relevanţă deosebită faţă de informaţiile deja cunoscute privind importanţa alimentaţiei cu colostru pentru supravieţuirea, sănătatea şi imunitatea la nou-născuţilor, prin faptul că evidenţiază importanţa primelor două ore după parturiţie la miel, când se produc modificări semnificative mai ales în ceea ce priveşte variaţia concentraţiilor de lactoză şi proteine (fig. 4).

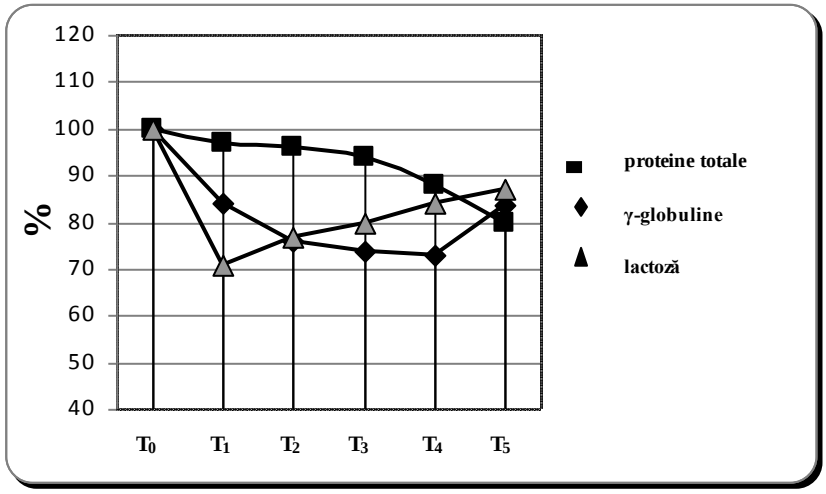


Figura 4.Dinamica modificărilor procentuale ale conţinutului în lactoză, γ-globuline şi proteine din colostru în intervalul de 20 ore post-partum

Scăderea concentraţiei proteinelor cu un procent mai mare decât scăderea γ-globulinelor are o semnificaţie deosebită din perspectiva faptului că reflectă o diminuare a altor tipuri de proteine importante pentru iniţierea funcţiei digestive normale la animalul nou-născut, precum factorii de creştere, citokinele, hormonii (hormonul de creştere, insulina).

CONCLUZII

- În condițiile geoclimatice ale țării noastre şi a sistemelor de creştere a oilor, în primele 20 de ore post-partum apar variații semnificative la nivelul conținutului de γ-globuline şi de proteine (din care fac parte şi factori de creştere, citokine, hormoni) în compoziția colostrului.
- Nivelul crescut de lactoză la prima probă raportată la valorile ulterioare şi implicarea acesteia ca sursă energetică pentru nou-născut are importanță deosebită pentru prevenirea riscului de hipotermie cu condiția administrării colostrului cât mai repede post-partum.

BIBLIOGRAFIE

1. Arguello, A., Castro, N., Alvarez, S., Capote, J.(2006): Effects of lactations and litter size on chemical composition and physical characteristics of goat colostrum, Small Ruminant Research, 65(1-2), 53-59.
2. Blum, J.W., Hammon, M., Ontsouka, E., Georgieva, M., Georgiev, I.P. (2002): Role of colostrum and milk components in the development of the intestine structure and function in calves. Biology of the Intestine in Growing Animals. In: Developments in Animal and Veterinary Sciences, Editori S.G. Pierzynowski, R. Zabielski, Elsevier, Amsterdam, pp. 193-202.
3. Georgiev, I.P. (2005): Alterations in chemical composition of colostrum in relationship to post-partum time, Bulg. J. Vet. Med., 8 (1), 35-39.
4. Lee, J., Kim, H.-M., Choi, H., Hong, J.H. (2007): Effects of colostrum basic protein from colostrum whey protein: increased in osteoblast proliferation and bone metabolism, J. Food Sci. Nutr., 12, 1-6
5. Maden, M., Birdane, F.M., Altunok, V., Dere, S. (2002): serum and colostrum/milk alkaline phosphatase in the determination of passive transfer status in healthy lambs, Journal of Veterinary Medicine Series A, 48(30, 179-185.
6. Molik, e., Murawski, M., Bonczar, G., Wierzchos, E. (2008): effect of genotype on yield and chemical composition of sheep milk, Animal Science Papers and Reports, 26(3), 211-218.
7. Nardone, A., Lacetera, N., Bernabucchi, U., Ronchi, B.(1997): Composition of dairy heifers exposed to high temperatures during late pregnancy and the early postpartum period, J. Dairy Sci., 80, 838-844.
8. Rudovsky, a., Locher, L., Sobiraj, A., Witek, T.(2008): Measurment of immunoglobulin concentration in goat colostrum, Small Ruminant Research, 74(1-3), 265-269

EFECTUL FACTORILOR STRESANŢI ASUPRA TIMUSULUI LA TINERETUL BOVIN ACHIZIŢIONAT PENTRU SACRIFICARE ÎN ABATOR

EFFECT OF SOME STRESS FACTORS ON THYMUS OF YOUTH CATTLE

RUS V., MICLAUS V., CADAR D.,
NADAS G., GAL A.
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
vasilerus2002@yahoo.com

From private breeders at a distance of 30-70 km from the slaughterhouse 10 cattle of youth category were purchased, transported by truck and slaughtered the next day. Fragments of thymus were collected from all the animals and processed for histological examination. The microscopic examination revealed that all thymus taken in the study had morphological changes with varied intensity from one animal to another. The changes are due to stress factors connected to animal acquisition and slaughtering while the differences are mainly related to the transport distance. Prompt response by morphological changes of intensity directly proportional to the stress factors allow us to consider that thymus is most accurately reflected in the morphological stressful situations faced by animals.

Key words: cattle, thymus, morphological changes, stress, transport

Încă din 1936, Seyle a atras atenţia că agenţii stresanţi determină răspunsuri adrenergice exprimate prin hipertrofia suprarenalei, însoţite de ulcere gastrice, involuţie timică etc. Unul dintre cei mai importanţi factorii cauzatori de stres la bovine este transportul (Mormede şi col. 1982). Această părere este împărtăşită şi de Loerch şi Fluharty (1999), care susţin că târgurile de animale şi transportul acestora sunt probabil cele mai epuizante evenimente din viaţa bovinelor. Prezenţa de numeroşi receptori adrenergici şi pentru glucocorticoizi pe suprafaţa limfocitelor (Preisler şi col., 2000; Abraham şi col., 2004) şi scăderea numărului limfocitelor în răspunsul la stres (Odore şi col., 2004) sugerează că alterările din compartimentele limfoide pot influenţa semnificativ răspunsul sistemului imun la stres. De altfel, Murata şi col. (1987) semnalează o scădere a limfocitelor T în sângele periferic al bovinelor după transport, iar Riondato şi col. (2008) afirmă că toate subpopulaţiile de limfocite T scad după transportul bovinelor. În acest context ne-am propus să investigăm histologic efectul asupra timusului a factorilor stresanţi care însoţesc achiziţionarea şi transportul bovinelor pentru sacrificare.

MATERIAL ŞI METODE

Animale

Materialul biologic utilizat în acest studiu a fost reprezentat de 10 bovine din categoria tineret, 5 masculi şi 5 femele, cu greutatea medie de 150 -200 kg.

Procedura generală

Animalele au fost achiziţionate de la diferiţi crescători particulari de pe o rază de 30-70 km distanţă faţă de abatorul din Bistriţa. Animalele au fost îmbarcate în camion şi transportate la abator unde au fost cazate până la sacrificare (a doua zi). Sacrificarea s-a făcut cu respectarea tuturor prevederilor legale legate de sacrificarea bovinelor. După jupuire şi eviscerare au fost recoltate fragmente de timus sub formă de felii cu grosimea de aproximativ 5 mm.

Prepararea ţesutului pentru analiză

Piesele recoltate au fost introduse pentru fixare în soluţie Stieve timp de 24 de ore. În continuare piesele au fost spălate şi deshidratate cu alcool etilic în concentraţie crescândă (70^{o}, 95^{o},

absolut), clarificate cu alcool butilic (n-Butanol) şi incluse în parafină. Au fost practicate secţiuni seriate cu grosimea de 5 µm şi colorate cu hematoxilină şi eozină.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În cazul timusurilor luate în studiu, se remarcă unele diferenţe în ceea ce priveşte aspectele legate de vârsta animalelor de la care provine timusul cercetat. Aceste diferenţe se referă la semne incipiente de involuţie de vârstă, reprezentate de mici depozite adipoase prezente la nivelul ţesutului conjunctiv interlobular. Aceste modificări sunt prezente doar la o parte dintre organele studiate (mai puţin de 50% dintre animalele luate în studiu).

Pe lângă procesele specifice atrofiei incipiente de vârstă se constată fenomene de atrofie acută de stres, mai mult sau mai puţin exprimată, în cazul tuturor probelor studiate. Ele debutează cu procese de aglutinare a timocitelor sub formă de grămezi pe toată întinderea corticalei (Fig.1). În interiorul unor lobuli sunt prezente chiar hemoragii difuze în special la limita cortico-medulară (Fig.2) şi în câteva situaţi în cuprinsul corticalei. Prin liza timocitelor aglutinate se creează spaţii lipsite de timocite, pe toată suprafaţa corticalei, ceea ce dă în ansamblu un aspect particular de „cer înstelat" (Fig.3). Aspectul de „cer înstelat" nu este la fel de pronunţat în cazul tuturor organelor şi chiar în cadrul aceluiaşi organ există zone în care este ceva mai discret, dar toate organele, fără excepţie, prezintă acest aspect. Dar şi în afara acestor zone există numeroase timocite mai mult sau mai puţin afectate. Rezultatul este reducerea marcantă a populaţiei de timocite la nivelul corticalei lobulilor timici, ceea ce duce la reducerea semnificativă a corticalei care apare mult mai subţire decât în mod normal şi ajunge să ocupe cel mult jumătate din suprafaţa de secţiune alobulului timic (Fig.4). Datorită scăderii semnificative a densităţii timocitelor din corticală, reţeaua epitelio-reticulară apare mult mai evidentă decât în mod normal. La câteva dintre timusurile studiate modificările de involuţie acută de stres sunt ceva mai pronunţate. Pe lângă aspectele descrise anterior, se mai constată spaţii create prin existenţa unui edem prezent atât la nivelul corticalei cât mai ales în medulară. Medulara lobulilor prezintă aspect rarefiat, cu evidenţierea foarte clară a reticulului şi mai ales a vascularizaţiei.

Aspectele constatate scot în evidenţă faptul că timusul provenit de la animale sacrificate în abator la categoria tineret bovin, prezintă atrofie acută de stres. Semnele de atrofie acută de stres sunt prezente la toate timusurile luate în studiu dar intensitatea lor este diferită. Diferenţele sunt date de faptul că animalele au fost achiziţionate în condiţii asemănătoare dar nu identice aşa încât expunerea la factorii stresanţi nu a fost aceeaşi în cazul tuturor animalelor studiate. Deşi factorii stresanţi sunt în linii mari aceeaşi, acţiunea unora dintre ei a fost mai lungă sau mai scurtă în funcţie de distanţa de la care au fost transportaţi şi timpul de aşteptare de la sosirea în abator până la sacrificare. Altfel spus, intensitatea modificărilor sesizate în timusul animalelor luate în studiu este direct proporţională cu factorii de stres la care a fost supus fiecare animal în parte şi cu durata de acţiune a acestora. De altfel este cunoscut faptul că timusul reacţionează deosebit de prompt şi semnificativ la acţiunea factorilor stresanţi, aspectul a făcut şi face încă obiectul a numeroase investigaţii (Rotaru, 1977; Price şi col. 1993; Barone şi col. 1993). Şi investigaţia efectuată de noi scoate în evidenţă sensibilitatea deosebită a timusului la acţiunea factorilor stresanţi (în acest caz : contenţie, îmbarcare, transport, cazare în loc străin în compania unor animale străine). În cazul stresului de transport, viţeii cei mai tineri sunt cel mai grav afectaţi (Atkinson, 1992). Efectul factorilor legaţi de stresul de transport poate fi resimţit o perioadă destul de lungă. Astfel, Popescu şi Popescu (1990) constată că la o săptămână de la transportul cu privare de hrană şi apă, viţeii prezentau un nivel al imunoglobulinelor mai mic cu 45% comparativ cu un lot martor. Dar modificările de la nivelul timusului nu sunt nici pe departe singurele care apar în cazul stresului de transport. Suprarenala reacţionează prompt prin creşterea semnificativă a adrenalinei plasmatice şi a cortizolului (Sartorelli şi col. 1992). Dar modificările de la nivelul suprarenalei sunt în primul rând funcţionale şi mai puţin morfologice. Modificările morfologice cele mai prompte şi semnificative la acţiunea factorilor stresanţi apar la nivelul timusului. Datorită acestui fapt, timusul poate fi considerat ca un „semafor"

care, din punct de vedere morfologic, exprimă cel mai rapid şi fidel situaţiile stresante cu care se confruntă organismul şi intensitatea acţiunii factorilor stresanţi.

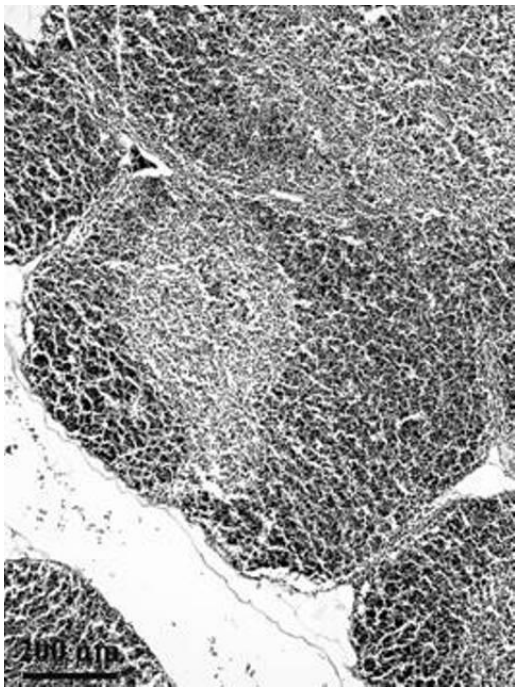


Fig. *1*

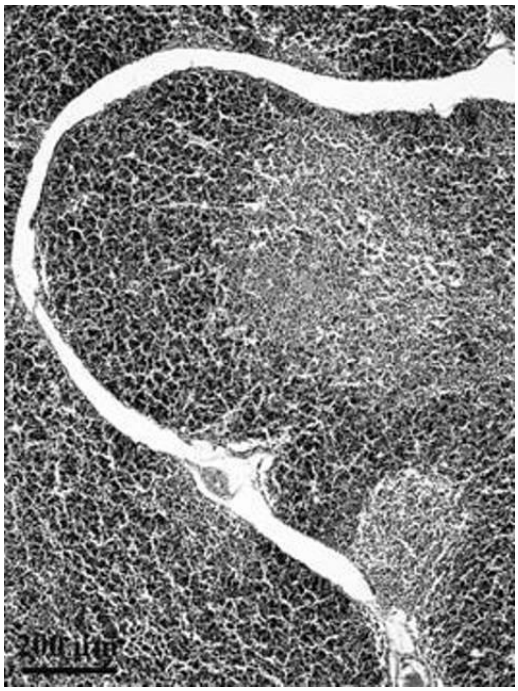


Fig. 2

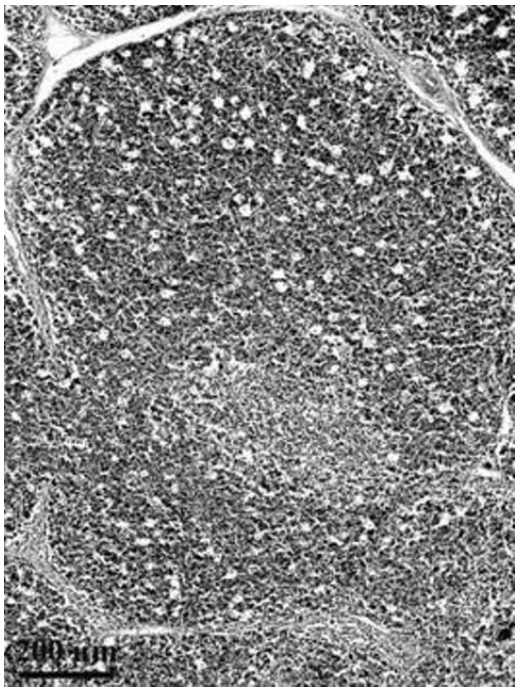


Fig. 3

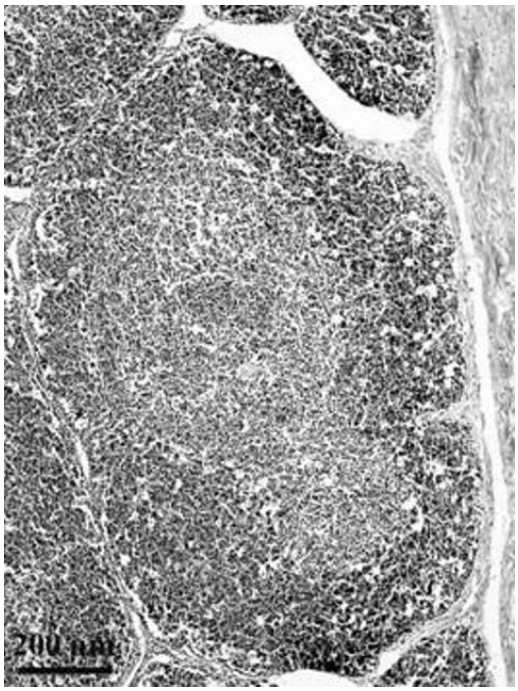


Fig. 4

Fig. 1 Aglutinarea timocitelor în corticală (HE, ob. 10X); Fig. 2 Hemoragii difuze la limita cortico-medulară (HE, ob. 10X); Fig. 3 Timocitoliză zonală (aspect de cer înstelat) (HE, ob. 10X); Fig. 4 Depleţie limfocitară în corticală (HE, ob. 10X)

CONCLUZII

Timusul provenit de la toate animalele luate în studiu prezintă semne de atrofie acută de stres exprimate prin modificări morfologice a căror intensitate este diferită în funcţie de expunerea la factorii stresanţi ce însoţesc achiziţionarea animalelor pentru sacrificare în abator.

Deşi factorii stresanţi sunt în linii mari aceeaşi, perioada lor de acţiune a fost diferită în funcţie de distanţa de la care a fost transportat fiecare animal în parte şi timpul de aşteptare de la sosirea în abator până la sacrificare.

Datorită răspunsului prompt prin modificări morfologice a căror intensitate a fost în relaţie directă cu perioada de acţiune a factorilor stresanţi, timusul poate fi considerat organul care, din punct de vedere morfologic, reflectă cel mai fidel confruntarea cu diferiţi factori stresanţi.

BIBLIOGRAFIE

1. Abraham G., J. Gottschalk and F.R. Ungemach, 2004, Possible role of dexamethasone in sensitising the beta-2-adrenergic receptor system in vivo in calves during concomitant treatment with clenbuterol, Pharmacology 72, pp. 196–204
2. Atkinson J. R., 1992, Investigation of the effects on transport and lairage on hydratation state and resting behavoir of calves for export, Veterinary Recard, 130, 19, p. 413-416.
3. Barone K.S., P. C. O'Brien, J. R. Stevenson, 1993, Caracterization and mecanism of thymic atrophy in protein-malnourished mice; role of corticosterone, Cell. Immunol. 148, 1, p. 226-233.
4. Fulvio Riondato, Antonio D'Angelo, Barbara Miniscalco, Claudio Bellino, Roberta Guglielmino, 2008, Effects of road transportation on lymphocyte subsets in calves, The Veterinary Journal, Volume 175, Issue 3, March 2008, Pages 364-368.
5. Loerch S.C. and F.L. Fluharty, Physiological changes and digestive capabilities of newly received feedlot cattle, Journal of Animal Science 77 (1999), pp. 1113–1119.
6. Mormede P., J. Soissons, R.M. Bluthe, J. Raoult, G. Legarff, D. Levieux and R. Dantzer, 1982, Effect of transportation on blood serum composition, disease incidence, and production traits in young calves. Influence of the journey duration, Annales de Recherches Vétérinaires 13, pp. 369–384.
7. Murata H., H. Takahashi and H. Matsmoto, The effects of road transportation on peripheral blood lymphocyte subpopulations, lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in calves, British Veterinary Journal 143 (1987), pp. 166–174.
8. Odore R., A. D'Angelo, P. Badino, C. Bellino, S. Pagliasso and G. Re, 2004 Road transportation affects blood hormone levels and lymphocyte glucocorticoid and beta-adrenergic receptor concentrations in calves, The Veterinary Journal 168, pp. 297–303.
9. Popescu A.L. şi N.A. Popescu, 1990, stresul la animalele de fermă, Ed. Ceres, Bucureşti.
10. Preisler M.T., P.S. Weber, R.J. Tempelman, R.J. Erskine, H. Hunt and J.L. Burton, 2000, Glucocorticoid receptor expression profiles in mononuclear leukocytes of periparturient Holstein cows, Journal of Dairy Science 83, pp. 38–47.
11. Price P., S. D. Olver, E. A. Gibbons, H. K. Theo, G.R. Shellam, 1993, Caracterization of the thymic involution induced by murine citomegalovirus infection, Immunology, Cell Biology, 71, 3, p. 155-165.
12. Rotaru A. O., 1977, Aspecte morfologice normale şi patologice ale timusului la bovine, Teya de doctorat, F.M.V. Cluj-Napoca.
13. Sartoreli P., Dominoni S, F. Agnes, 1992, Influence of duration stimulated transport on plasma stress markers in the calf, J. of Vet. Med. a. 39, 6, p. 401-403.
14. Selye, H., 1936, A syndrome produced by diverse noxious agents. Nature. 138:32.

DOVEZI HISTOLOGICE ALE INFLUENŢEI UNUI VACCIN VIU INTERMEDIAR PLUS ANTI BURSITĂ INFECŢIOASĂ ASUPRA BURSEI LUI FABRICIUS LA PUII BROILERI

HISTOLOGICAL ASSESMENT OF THE INFLUENCE OF A LIVE ANTIINFECTIOUS BURSITIS ON FABRICIUS BURSA IN BROILER CHICKENS

RUS V., MICLAUS V., SPINU MARINA, CADAR D.
Facultatea de medicină veterinară
Cluj-Napoca
vasilerus2002@yahoo.com

To 30 broiler chickens were given in drinking water live intermediate plus strain vaccine against infectious bursal disease. It was harvested bursa of Fabricius before a day of vaccination, after 7 and 14 days p.i., to carry out histological investigations. Histological examination showed the side effects of the virus vaccine, materialized by progressive lymphocyte lysis and apoptosis, with progressive atrophy of the bursa folliicles. By gradually reducing of the size of lobules, results interlobullar spaces in which proliferate collagen. The general effect of intermediate plus virus vaccine causes progressive atrophy of the bursa of Fabricius and evolution to fibrosis.

Key words: vaccination, avian infectious bursitis, bursa of Fabricius

Vaccinarea puilor faţă de bursita infecţioasă aviară a constituit şi constituie încă o preocupare majoră pentru specialiştii din domeniul patologiei aviare. Au fost utilizate în acest scop vaccinuri cu suşe de virulenţă diferită şi s-a constatat că nu există o corelaţie directă între patogenitatea tulpinii vaccinale şi calitatea răspunsului imun. Mai mult, s-a constatat că suşele cu patogenitate ridicată induc la nivelul bursei lui Fabricius leziuni comparabile cu cele apărute în episoadele acute de bursită (Morales şi col. 2004), pe când cele cu patogenitate mai scăzută determină leziuni asemănătoare cu cele din episoadele subclinice de bursită. În cazul vaccinării in ovo, cele mai severe leziuni apar la 4-5 zile postvaccinal (Rautenschlein şi Haase, 2005). În cazul vaccinării posteclozionale, în funcţie de suşa utilizată, leziunile cele mai severe pot apare între trei şi şapte zile de la vaccinare (Ezeokoli şi col.1990) sau mai târziu, după aproximativ 17 zile postvaccinal. Modificările post vaccinale sunt parţial reversibile, în funcţie de statusul imun, rezistenţa genetică a puilor şi mai ales în funcţie de tulpina vaccinală şi protocolul de vaccinare (Rautenschlein şi Haase, 2005). În unele cazuri s-a constatat apariţia de noi variante antigenice, unele cu patogenitate foarte ridicată, mai ales în efectivele vaccinate (Muller şi col. 2003), ceea ce complică şi mai mult lucrurile în imunoprofilaxia bursitei infecţioase.

MATERIAL ŞI METODE

Animale

Materialul biologic utilizat în acest studiu a fost reprezentat de 30 pui broiler, în vârstă de 8 zile, crescuţi în sistem intensiv, în hale de 17000 capete, pe pardoseală de talaş din lemn de brad.

Procedura generală

La puii luaţi în studiu li sa administrat în apa de băut, vaccin anti bursită infecţioasă (vaccin viu tulpină intermediară plus) în doză de $10^2 DIE_{50}$. Pentru verificarea histologică a modificărilor induse de virusul vaccinal, a fost recoltată Bursa lui Fabricius de la :

10 pui cu o zi înainte de vaccinare (în vârstă de 11 zile),

10 pui la şapte zile de la vaccinare (în vârstă de 19 zile)

10 pui la 14 zile de la vaccinare (în vârstă de 26 zile).

Prepararea ţesutului pentru analiză

După recoltarea Bursei lui Fabricius, au fost obţinute felii cu grosimea de aproximativ 5 mm, prin secţionare transversală cu o lamă foarte ascuţită, care au fost introduse pentru fixare în soluţie Stieve timp de 24 de ore. În continuare piesele au fost spălate şi deshidratate cu alcool etilic în concentraţie crescândă (70^{o}, 95^{o}, absolut), clarificate cu alcool butilic (n-Butanol) şi incluse în parafină. Au fost practicate secţiuni seriate cu grosimea de 5 µm şi colorate cu metoda tricrom Goldner.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La puii de 11 zile, bursa apare cu aspect normal pentru vârsta respectivă, putând fi distinse toate detaliile structurale. Ţesutul conjunctiv de suport este redus cantitativ şi format în cea mai mare parte din fibre subţiri de colagen. El nu apare reacţionat, nici subepitelial nici perilobular nu se observă modificări inflamatorii sau de altă natură. Foliculii bursali apar bine conturaţi şi de mărime mijlocie. Încărcarea cu celule este medie, aşa încât la majoritatea foliculilor corticala şi medulara pot fi apreciate. Corticala nu este foarte groasă, ea ocupând cel mult jumătate din suprafaţa de secţiune a lobulilor (Fig. 1). Aspectul de ansamblu este de organ sănătos aflat în plin proces de creştere şi maturare.

La 7 zile de la vaccinare (19 zile de viaţă), foliculii bursali sunt evident mai mari decât înainte de vaccinare şi apar delimitaţi de ţesut conjunctiv ceva mai consolidat. Corticala şi medulara se disting cu uşurinţă . Un număr mare de foliculi prezintă procese de liză limfocitară, mai pronunţate în medulară unde fie apar mici spaţii goale fie populaţia limfocitară se reduce semnificativ aşa încât reţeaua reticulară este uşor vizibilă (Fig. 2). În alţi lobuli sunt prezente procese intense de apoptoză şi liză limfocitară atât în medulară cât mai ales în corticală, ceea ce face ca cele două zone să nu mai poată fi distinse, foliculul prezentând aspect de omogenizare structurală. Aceşti lobuli nu sunt majoritari, aşa încât aspectul de ansamblu este de organ cu modificări de intensitate moderată ce nu duc încă nici la atrofie foliculară severă şi nici la proliferări conjunctive marcante.

La 14 zile de la vaccinare (26 zile de viaţă) foliculii sunt mai mici decât la 7 zile, deşi în mod normal ar trebui să fie mai mari, deoarece bursa atinge maximul de dezvoltare abia la 6-12 săptămâni de viaţă (Cullen, 1982, Muller şi col., 2003). Ţesutul conjunctiv interlobular este în cantitate mult mai mare, decât la 7 zile postvaccinal. Acest ţesut conjunctiv este format din fibre relativ groase de colagen şi conţine fibroblaste în număr mare, ceea ce sugerează că el este în plin proces de proliferare. Foliculii prezintă procese de liză limfocitară pronunţată cu apariţia de spaţii goale ce dau, în unii lobuli, aspect de „cer înstelat”. Aspectul de ansamblu este de atrofie foliculară şi proliferare de colagen cu tendinţă de fibrozare.

Creşterea în dimensiuni a foliculilor bursali de la 11 la 19 zile este firească, organul la această vârstă fiind în plin proces de creştere şi maturare. Ea nu se datorează în nici un caz acţiunii vaccinului, care dimpotrivă determină leziuni de intensitate moderată, manifestate în primul rând prin liză limfocitară, pe toată suprafaţa de secţiune a foliculilor, mai pronunţate în medulară decât în corticală, la majoritatea foliculilor. Există însă şi foliculi la care liza limfocitară este pronunţată şi în corticală, la astfel de foliculi cele două zone caracteristice ale foliculilor bursali (corticala şi medulara) nu se mai pot distinge, aşa încât se ajunge la o tendinţă de omogenizare a acestor foliculi. În aceşti foliculi, pe lângă liză limfocitară sunt prezente şi procese de apoptoză limfocitară destul de pronunţată, pe toată suprafaţa lor de secţiune existând atât celule în apoptoză cât şi numeroşi corpi apoptotici. Fără aceste procese patologice, foliculii ar fi avut dimensiuni şi mai mari. La 26 de zile de viaţă (14 zile de la vaccinare) foliculii ar trebui să fie de dimensiuni mai mari decât la 19 zile. În cazul nostru situaţia este cu totul alta, foliculi fiind semnificativ mai mici şi după procesele intense de liză limfocitară şi apoptoză care sunt încă în plină derulare este clar că dimensiunea lor se va reduce în continuare. Această atrofie patologică a foliculilor bursali este însoţită de proliferare intensă de colagen în spaţiile perilobulare, proces ce este de asemenea în plină derulare. Atrofia progresivă a foliculilor şi proliferarea colagenului determină involuţia şi fibrozarea bursei, cu mult înainte de involuţia fiziologică de vârstă. Existenţa acestor procese patologice demonstrează că virusul

vaccinal, pe lângă inducerea unui răspuns imun materializat prin producere de anticorpi specifici, determină şi modificări asemănătoare cu cele din infecţia naturală, deşi intensitatea acestora este semnificativ mai mică. Asta demonstrează existenţa unor reacţii adverse ale vaccinului, de care trebuie neapărat ţinut seama atunci când se optează pentru un tip sau altul de vaccin, astfel încât să se utilizeze vaccinul cu reacţiile adverse cele mai reduse.

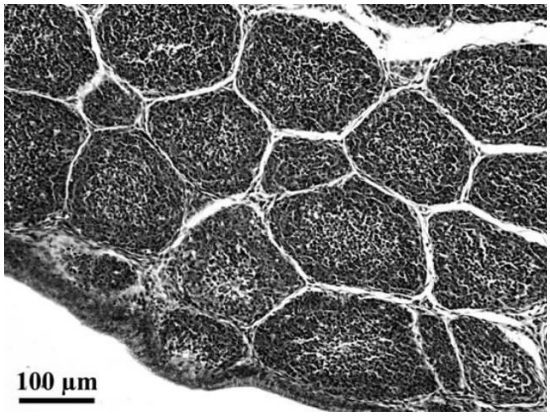


Fig. 1 Aspectul bursei lui Fabricius înainte de vaccinare (Tricrom Goldner, ob. 20X)

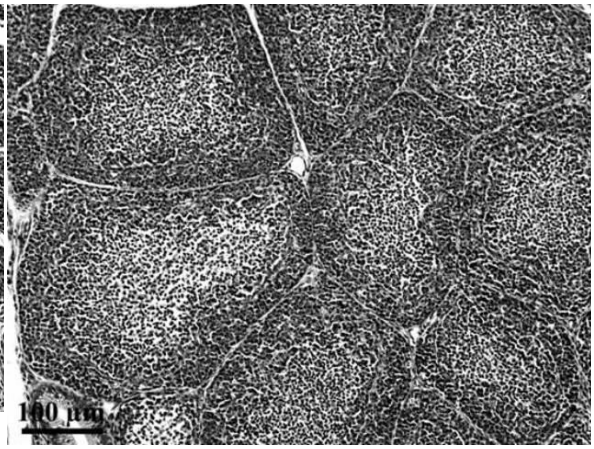


Fig. 2 Aspectul bursei lui Fabricius la 7 zile de la vaccinare (Tricrom Goldner, ob. 20X)

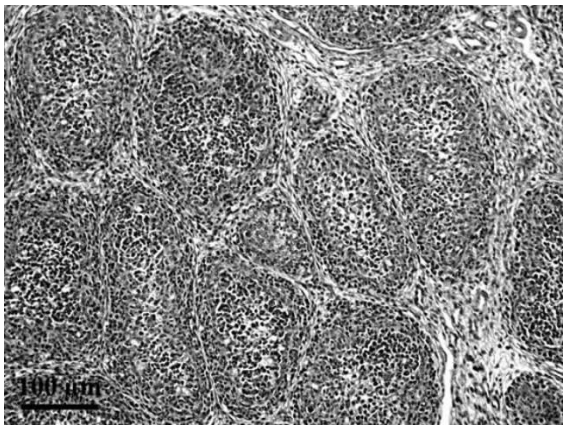


Fig. 3 Aspectul bursei lui Fabricius la 14 zile de la vaccinare (Tricrom Goldner, ob. 20X)

CONCLUZII

Virusul vaccinal viu intermediar plus determină, pe lângă răspunsul imun, reacţii adverse materializate prin liză limfocitară progresivă şi apoptoză, ce au ca rezultat scăderea drastică a limfocitelor şi atrofia foliculilor bursali.

Spaţiile interlobulare mărite prin atrofia foliculară, sunt invadate de ţesut conjuinctiv care determină o modificare drastică a raportului parenchim/stromă, cu evoluţie evidentă spre fibrozarea organului.

Modificările apărute la nivelul bursei lui Fabricius sub acţiunea virusului vaccinal, sunt asemănătoare în multe privinţe cu cele din infecţia naturală, doar că nu sunt la fel de brutale, aşa că

la vaccinarea antibursitică trebuie luate în calcul şi reacţiile adverse nu numai valoarea imunizantă a vaccinului.

BIBLIOGRAFIE

1. Cullen G.A., 1982, The bursa: Fabricius to Delaware, Journal of the Royal Society of Medicine, Vol. 75, July, Pages 507-512
2. Ezeokoli CD, Jtzondo EA, Nwannenna AL, Umoh JU, 1990, Immunossupresion and histopathological changes in the bursa of Fabricius associated whit infectoius bursal disease vaccination in chichen, Comparative Immunology Microbiology and Infectious disease, 13 (4), 181-8
3. Moraes H.L.S., Salle C.T.P., Padilha A.P., Nascimento V.P., Souza G.F., Pereira R.A., Artencio J.O., Salle F.O., 2004, Infection Bursal Disease: Evaluation of Pathogenicitz of Comercial Vaccines from Brazil in Specific Pathogen Free Chichens, Brazilian Journal of Poultry Science, Oct-Dec 2004, v. 6, n. 4, 243-247
4. Müller H., R. Islam, R. Raue, 2003, Research on infectious bursal disease – the past, the present and the future, Veterinary Microbiology, Vol. 97, Issues 1-2, 2 Dec., 2003, Pages 153-165
5. Rautenschlein and Haase, 2005 S. Rautenschlein and C. Haase, Differences in the immunopathogenesis of infectious bursal disease virus (IBDV) following in ovo and post-hatch vaccination of chickens, Vet. Immunol. Immunopathol. 106 (2005), pp. 139–150

CERCETĂRI PRIVIND BURSITA INFECŢIOASĂ ÎN CONDIŢIILE CREŞTERII EXTENSIVE, GOSPODĂREŞTI

RESEARCHES ON BURSAL DISEASE UNDER EXTENSIVE BREEDING CONDITIONS

SERBU ELENA[1], TANASE OANA IRINA[2], PAVLI C.[2], PERIANU T.[2]
[1] DSV FOCŞANI
[2] FMV IAŞI

Considering the huge extent of the avian technology at global level, more complex technologies were developed, therefore new morbid entities appeared, those included in immunodeficiency syndromes. Even so that virus responsible for bursal disease isn't related, taxonomically, with mammal's immunodeficiency viruses, his effect is immunosuppressive because of his effect on primary lymphoid system, represented by Fabricius Bursa and thymus.

Because of the extent of its effects, evolution, economical loss this disease entered in the center of attention, joining other morbid entities involved in avian pathology, as : Newcastle disease, avian influenza, infectious anemia, Marek disease.

Considering extensive breeding conditions, the disease was signaled in 4 exploitations, with a total effective of 579 chicks (various breeds). The eggs were from chickens unimmunized using improvised incubators.

The disease emerged at the age of 19-27 days with an evolution between 6-8 days.The disease chart had an ascendant aspect for the first 3 days, with a peak at the fourth day and a marked drop after 6-8 days of evolution.

The mortality percent was different in each exploitation considering chicks age. The values were between 14.76 and 46.28 percent.

In the chicks with an age of 3-4 weeks were observed the following clinical signs: depression, anorexia, dehydration, nervous signs (prostration, ataxia, myoclonies) diarrhea with whitish feces caused by urates deposits.

Key words: Gumboro disease, chickens, clinical signs, lesions

Boala are consecinţe economice grave, datorate pe de o parte mortalităţii (10-35%) şi deprecierii carcaselor prin apariţia de hemoragii la nivelul musculaturii scheletice, iar pe de altă parte deprecierii indicilor productivi, respectiv scăderea ratei de conversie a furajului, scăderii sporului în greutate. La acestea, trebuie adaugată diminuarea protecţiei faţă de îmbolnăviri microbiene şi reactivitatea slabă la imunizare, ca şi tendinţa de permanentizare a infecţiei în unităţi. Din această cauză, eradicarea este foarte dificilă chiar în condiţiile depopulării şi a unei dezinfecţii riguroase şi repetate.

Având în vedere prezenţa destul de frecventă a îmbolnăvirilor la puii din gospodăriile populaţiei, s-au întreprins investigaţii epidemiologice, clinice şi morfopatologice ale bursitei infecţioase în condiţiile creşterii extensive, gospodăreşti.

MATERIAL ŞI METODE

Investigaţiile s-au efectuat pe un efectiv de 579 de pui, crescuţi în sistem extensiv, gospodăresc. Puii au provenit din ouă recoltate de la găini de diferite rase, neimunizate contra bursitei infecţioase.

Pentru obţinerea puilor, ouăle au fost introduse în incubatoare improvizate. Investigaţiile au urmărit dinamica îmbolnăvirilor, vârsta apariţiei şi dezvoltării procesului morbid, durata de evoluţie al bolii, ca şi estimarea procentului de mortalitate.

Diagnosticul de bursită infecţioasă a fost stabilit iniţial necropsic, bazat pe leziunile intense hemoragice din musculatură şi modificările infiltrative, edematoase sau chiar hemoragice ale bursei lui Fabricius, iar ulterior a fost confirmat prin testul de dublă imunodifuzie în gel de agar.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Investigaţiile epidemiologice efectuate au evidenţiat că îmbolnăvirile au apărut în condiţiile creşterii extensive din 4 gospodării particulare, la un efectiv de 579 de puii rezultaţi din ouă provenite de la găini nevaccinate contra bursitei infecţioase şi introduse la incubatoare improvizate (tabelul 1). De asemenea, din aceleaşi investigaţii rezultă că, cele 4 gospodării particulare sunt situate geografic în apropierea unor ferme de creştere intensivă a puilor pentru carne, unde se practică imunizarea contra bursitei infecţioase, dar unde în anii anteriori au existat cazuri de bursită infecţioasă diagnosticată virusologic şi serologic.

Investigaţiile întreprinse pentru a se stabili gradul de extindere al bolii în localitate sau în localittăţile din împrejurimi nu au evidenţiat prezenţa altor focare, deoarece în gospodăriile învecinarte, la momentul apariţiei şi evoluţiei bolii, existau doar păsări nereceptive la infecţie, respectiv păsări adulte. De asemenea, nu s-a putut controla circulaţia carnivorelor domestice, a păsărilor sălbatice cu acces la cadavrele puilor morţi de bursită şi nu s-a putut stabili originea sursei de infecţiei. Totuşi, având în vedere circulaţia necontroaltă, accesul la sursele de hrană şi de apă, ca şi marea rezistenţă a virusului în condiţiile mediului exterior, se poate aprecia (presupune) că un rol important în difuziunea virusului şi apariţia bolii l-au avut păsările sălbatice (vrăbiile). Mai mult, datorită faptului că puii în toate cele 4 găspodării erau adăpostiţi în încăperi imporvizate, sau în locuri sumar amenajate, mai mult în libertate, acestea au putut servi drept factori favorizanţi în apariţia şi evoluţia bolii.

Tabelul1

Dinamica mortalităţii în episoadele de bursită infecţioasă aviară

Nr. crt	Gos-Pod.	Seria/ luna	Efec-tiv	Vâr-sta apariţ./ zile	Mortalitatea zilnică								Total mortalitate	
					1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	Nr.	%.
1.	G1 A B	I/mart.	103	27	2	6	11	13	8	7	2	-	48	43,63
		II/mai	110	19	3	5	9	10	5	2	1	-	35	33,98
2.	G2	Martie	96	21	1	6	8	8	3	1	-	-	27	28,13
3.	G3	Martie	149	20	1	4	11	4	1	1	-	-	22	14,76
4.	G4	Mai	121	25	3	5	17	15	8	5	2	1	56	46,28
		Total	579		10	26	56	50	25	16	5	1	188	30,74

Din analiza datelor înscrise rezultă că din 579 pui au murit un număr de 188, ceea ce reprezintă 30,74%, (fig. 2). De asemenea, se observă că îmbolnăvirile au debutat începând cu vârsta de 19 şi 27 de zile. La 3 (G_1A, G_2, G_3 şi G_4) din gospodării, boala a apărut la vârsta de 20-27 zile, iar la una (G_1B) la vârsta de19 zile. Curba îmbolnăvirilor a avut un aspect ascendent de la o zi la alta, vârful situându-se la a 3-a a 4-a zi de la declanşare şi cu o scădere marcată după a 6-7-a zi de evoluţie .

Proporţia pierderilor pe gospodării a fost cuprinsă între 14,76 – 46,28%, la efectivul trecut prin boală de 579 pui, cu diferenţe în privinţa valorilor medii ale mortalităţii în funcţie de gospodărie pe zile. Pe tot parcursul evoluţiei bolii, aceste valori medii au oscilat între 3,66 (G_3) şi 7,00 (G_4).

Procentele de mortalitate pot atinge valori foarte variate, dependent de patogenitatea tulpinii implicate. Astfel, în Statele Unite, tulpinile noi au determinat procente de 5, în timp ce în aceeaşi perioadă, în Europa se înregistrau nivele ale mortalităţii de 50-60%. În episoadele semnalate, procentul de mortalitate maxim de 46,28%, s-a înregistrat la G_4. Se poate astfel deduce că, în

comparaţie cu alte episoade descrise în România, în condiţii de creştere intensivă în care procentul de mortalitate a atins maxim 15%, în acest caz, afectarea păsărilor a fost mult mai gravă.

Dinamica mortalităţii a fost diferită în funcţie de gospodărie, perioada de populare (fig. 2), dar mai ales cu vârsta puilor. Incidenţa cea mai mare a fost între a 3-a şi a 6-a săptămână de viaţă; în săptămâna a 7-a, frecvenţa a fost discretă (G_4), pentru ca la vârsta de 8 săptămâni, boala să nu mai fie semnalată lezional.

Incidenţa îmbolnăvirilor a fost mai mare (43,63%) la efectivele introduse în creştere în prima perioadă de populare a gospodăriei, în luna martie (G_1 A) şi mai redusă (33,98%) la seria următoare (în luna mai), în aceeaşi gospodărie (G_1 B).

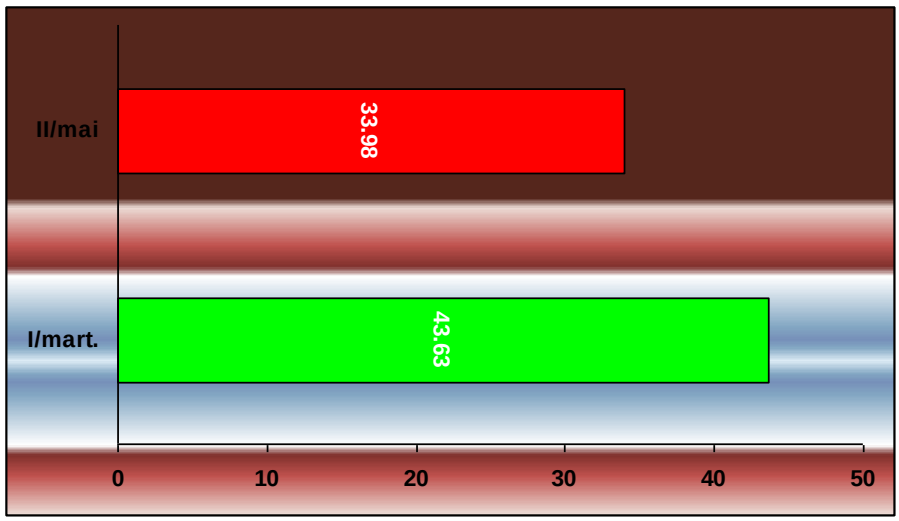


Fig. 2
Incidenţa imbolnăvirilor în funcţie de momentul populării

De asemenea, gravitatea evoluţiei bolii a fost cu atât mai mare, cu cât vârsta puilor a fot mai înaintată . Astfel, evoluţia a fost mai gravă şi exprimarea clinică mai evidentă la efectivele la care boala a debutat la vârsta de 25 şi 27 de zile, unde şi mortalitatea a fost mai mare, de 46,28% şi respectiv 43,63%. În schimb, la puii la care boala a debutat la vârsta de 19 – 21 de zile, mortalitatea a fost cuprinsă între 14,76% şi 33,98%. Unii dintre puii la care infecţia a apărut la vârsta de 19 zile au supravieţuit bolii, dezvoltarea lor ulterioară fiind evident impietată.

Indiferent de vârsta apariţiei şi durata evoluţiei, curba de mortalitate înregistrată în fiecare episod de boală a avut o dinamică specifică, crescătoare în primele 2-4 zile chiar cu dublarea pierderilor de la la o zi la alta, până la atingerea unui vârf, după care în următoarele 2-5 zile, uneori prin dedublare, mortalitatea a scăzut până la parametrii tehnologici.

Datorită modului diferit de intervenţie a factorilkor epizootici în apariţia , evoluţia şi răspândirea infecţiei virale, procesul epizootic a avut aspecte extrem de variate, greu de încadrat din punct de vedere epidemiologic. Totuşi, rezultatele obţinute, pe parcursul evoluţiei bursitei infecţioase în condiţii de creştere extensivă, a evidenţiat că afectarea cea mai gravă a puilor a fost la vârsta de 19-34 de zile de viaţă, ceea ce corespund celor găsite în literatura de specialitate (Dumitru C., 2002). Se poate aprecia că şi în sistemul creşterii extensive bursita infecţioasă are aceleaşi trăsături epidemiologice reprezentate de debutul brusc, proporţie ridicată a morbiditate, cu un vârf al curbei de mortalitate şi revenirea rapidă la normal a lotului.

La loturile bolnave semnele clinice au fost vizibile 6-8 zile, timp în care mortalitatea a crescut rapid, după care a scăzut brusc pe măsură ce aspectele clinice au revenit la normal

Clinic, boala s-a semnalat la pui de găină în vârstă de 3-5 săptămâni, care au prezintat abatere, anorexie, deshidratare, pică, horiplumaţie, semne nervoase (prostraţie, ataxie, astazie, mioclonii), diaree cu fecale albicioase, bogate în urați.

Manifestările clinice au fost mai puțin severe, în imbolnăvirile apărute la loturile următoare din aceeaşi gospodărie (G_1)

La examenul necropsic a 188 de pui care în viață au prezent semne de buristă infecțioasă s-au constatat leziuni congestivo-hemoragice generalizate, distrofia musculaturii pectorale şi a membrelor, cu multiple hemoragii intramusculare (coapse, gambă, piept, aripi) şi articulare, hemoragii la bifurcația sacilor cecali, în cloacă şi uneori în mucoasa proventiculară, hipertrofia rinichilor, cu țesutul renal de culoare galbuie-albicioasă datorită depozitelor de urați, dilatarea şi obstruarea ureterelor. Ficatul, uneori era mărit, prezenta leziuni distrofice generale sau zonale, alternînd cu zone congestive. Splina uşor modificată (congestie, hemoragii, mărire în dimensiuni), iar pancreasul congestiv, uneori cu aspect de icre de peşte.

Constant s-a observat leziuni ale bursei Fabricius traduse prin mărirea în volum până la dimensiunile unui ou de porumbel; aspect anormal al mucoasei (îngroşată, edematiată, congestivă, hemoragică); modificarea conținutului glandei (mucos clar, fibrinos, purulent, sanguinolent, depozite fibrino-cazeoase); schimbarea culorii organului (roz, albicios, galben-murdar). S-au observat şi burse atrofiate, de culoare galben-cenuşie, cu pereții subțiri, aproape transparenți.

Valorile greutății bursei Fabricius, stabilite pe un număr egal (40) de burse hipertrofiate recoltate de la cadavre de pui în vârstă de 28 zile au fost cuprinse între 0,520-2,850 g (media 1,315 g), iar la puii de 35 zile între 0,780-3,750 g (media 1,541 g).

Tipul şi frecvența leziunilor de bursită, în ansamblul celorlalte modificări întâlnite în această boală sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Tipul şi frevența modificărilor anatomopatologice

Vârsta În săp-tămâni	Bursa Fabricius			Bursa Fabri cius	Rini chi	Tub Diges tiv	Fi cat	Spli nă	Congestii hemora gii
	Hiper trofie	Atro fie	Leziuni ale mucu sului						
2-4	2,22	-	+	-	2,22	2,22	-	-	-
3-5	25,45	1,82	+++	14,55	5,45	12,73	3,64	5,45	18,18
3-5	6,09	-	-	-	8,70	-	8,70	-	-
4-6	12,22	-	++	7,78	4,44	4,44	3,33	3,33	4,44
5-7	-	31,11	++	-	11,11	-	6,67	-	-
6-8	14,44	-	+++	6,67	4,44	-	3,33	1,11	3,33
7-9	-	6,25	+	-	2,5	-	2,5	-	-
7-9	2,22	1,11	+	2,22	-	-	-	-	-
Total	7,48	3,21		3,54	4,90	1,98	3,31	1,o7	2,59
		10,69							
		14,21							

Leziunile de bursită, reprezentate de hipertrofie, atrofie, modificări ale mucoasei, pot totaliza 10,69%, iar cele de bursită asociate cu leziuni renale, de 14,21%. În ordine descrescândă se situează distrofia renală (4,90%), hepatică (3,31%), leziuni congestivo-hemoragice generalizate (2,59%), hemoragii proventriculare, cecale (1,98%), renale.

Modificările histopatologice corelate cu aspectul lezional macroscopic au evidențiat că: în cazul burselor hipertrofiate s-a observat edem interfolicular, (fig. 3) hiperemie sau hemoragii intra- şi interfoliculare.

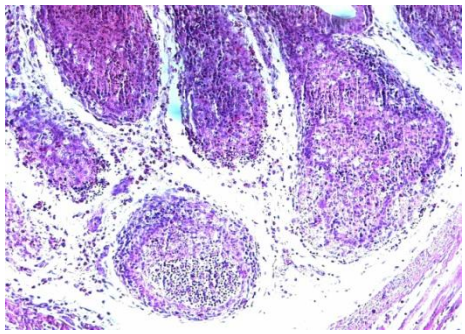


Fig. 3
Bursa lui Fabricius. Bursita infecţioasă aviară.
Edem interfolicular. Met. H.E .x 200

Se remarcă necroza celulelor limfoide din medulară, fagocitoză şi hiperplazia reticulo-endotelială, focare granulomatoase, hipertrofia şi transformarea chistică a burselor Fabricius atrofiate, atrofia lamelelor, foliculi mici şi neregulaţi.

În cazul necrozei centrului folicular urmată de involuţia acestuia are loc formarea de cavităţi chistice, (fig. 4) proliferarea ţesutului conjunctiv interfolicular, distrucţia membranei cortico-medulare şi limfobursoclazie a zonei medulare (fig. 5).

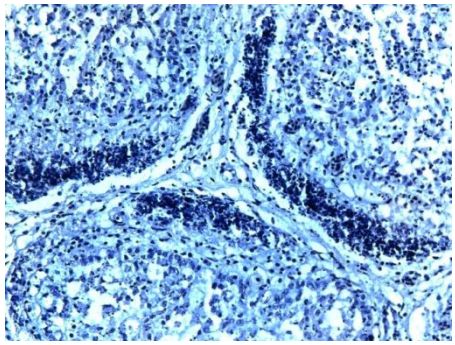


Fig. 4
Bursa lui Fabricius. Bursita infecţioasă aviară.
Hemoragii foliculare în zonele periferice ale foliculilor.
Met. H.E .x 200

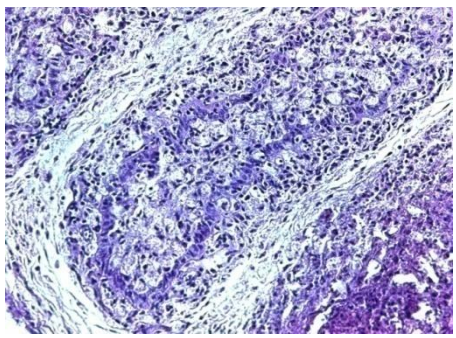


Fig. 5
Bursa lui Fabricius. Bursita infecţioasă aviară.
Distrucţia membranei cortico-medulare şi limfobursoclazie
a zonei medulare. Met. Masson modificată (H.E.A.) x 400

Inocularea embrionilor de 7-9 zile, pe cale alantoidienă sau m.c.a., cu 0,2 ml triturat de burse lezate a determinat, începând cu pasajul 2-4, o mortalitate embrionară de 75-90% între a 3-a şi a 7-a zi de la infecţie, având curba maximă în a 4-a şi a 5-a zi. Leziunile embrionilor au fost diferite cu intervalul de la inoculare. Cei morţi după 48 ore prezintau leziuni hemoragice; după 3-7 zile s-a constatat hemoragii grave (generalizate sau existente numai la cap şi extremităţi), infiltraţii edematoase difuze sau numai în regiunea abdominală, congestie şi hemoragii în organele interne, hepatomegalie, necroze hepatice, culoarea verzuie a ficatului şi vitelusului.

La embrionii morţi după 7-8 zile sau la cei sacrificaţi persistau rare hemoragii, distrofie cardio-hepato-renală şi necroze hepatice. S-au observat şi leziuni ale membranei corioalantoidiene (m.c.a.) de tipul unor colonii albicioase, precum şi piticism al embrionilor, (fig. 6).

Fig. 6
Aspect clinic. Piticism al embrionilor
Clinical aspect. Embryo dwarfism

CONCLUZII

Cercetările privind bursita infecţioasă în condiţiile creşterii extensive, gospodăreşti au dus la următoarele concluzii:

1. Îmbolnăvirile s-au semnalat în 4 gospogării, cu un efectiv de 578 pui de diverite rase, unde se practica creşterea extensivă, gospodărească.
2. Curba îmbolnăvirile a avut un aspect ascendent de la o zi la alta, vârful situându-se la 3-a a 4-a zi de la declanşare şi o scădere marcată după 6-8 zile de evoluţie.
3. Procentul de mortalitate a fost diferit în funcţie gospodărie, perioada de creştere, dar mai ales de vârsta puilor, find cuprinsă între 14,76 şi 46,28%%.
4. Clinic, la pui de găină în vârstă de 3-5 săptămâni, s-a observat abatere, anorexie, deshidratare, pică, horiplumaţie, semne nervoase (prostraţie, ataxie, astazie, mioclonii), diaree cu fecale albicioase, bogate în urați.
5. La examenul necropsic s-au constatat leziuni congestivo-hemoragice generalizate, distrofia musculaturii pectorale şi a membrelor, cu multiple hemoragii intramusculare (coapse, gambă, piept, aripi) şi articulare, hemoragii la bifurcaţia sacilor cecali, în cloacă şi uneori în mucoasa proventiculară, hipertrofia rinichilor,

cu ţesutul renal de culoare galbuie-albicioasă datorită depozitelor de urați, dilatarea şi obstruarea ureterelor.

6. Examenul histopatologic corelat cu aspectul lezional macroscopic a evidențiat în cazul burselor hipertrofiate edem interfolicular, hiperemie sau hemoragii intra- şi interfoliculare; necroza celulelor limfoide din medulară, fagocitoză şi hiperplazia reticulo-endotelială, focare granulomatoase, hipertrofia şi transformarea chistică a burselor Fabricius atrofiate, atrofia lamelelor, foliculi mici şi neregulați, necroza centrului folicular urmată de involuția acestuia şi formare de cavități chistice, proliferarea țesutului conjunctiv interfolicular

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ABDEL-ALIM GA, SAIF YM., 2001 - Immunogenicity and antigenicity of very virulent strains of Infectious Bursal Disease Viruses. Avian Diseases; 45 (1):92-101.
2. AVRAM EUGENIA, IOSIF C., ŞOFEI D., 1994 –Diferența între tulpinile de Birnaviridae sălbatice şi vaccinale. –Al VI-lea Congres Național de Medicină Veterinară Sinaia, pag. 33.
3. COMAN T., TEUŞDEA V., BEJAN C., ELEFTERESCU A., STĂNESCU CORINA, ALEXANDRU AURORA, 1995 – Observații privind influența infecției cu virusul bursitei infecțioase aviare patogen, asupra bursei Fabricius şi greutății corporale la tineretul comercial rase uşoare. – Bull.Inf.Soc.Med.Vet. în Patologia aviară şi a animalelor mici din România, 3, 14-22.
4. COMAN T., ALEXANDRU N., IACOB M., 2001 –Modificări histologice ale structurii organelor limfopoetice la puii contaminați cu virusul bursitei infecțioase.–Al IV-lea Simpozion aniversar IDSA „35 de ani de activitate în diagnosticul medical veterinar pentru apărarea sănătății animale şi umane”,, p. 71, Bucureşti, 27-28 septembrie.
5. LEAU ELENA-SIMONA, BĂRBOI GH., 2006 – Evaluarea nivelului de anticorpi anti—virusul bursitei infecțioase aviare (B.I.A.) la pui, în primele zile de viață. – IDSA, Al V-lea Simpozion Național Aniversar „40 ani de la înființare” 9-10 mai , pag.149.
6. NIELSEN OL, SÆRENSEN P, HEDEMAND JE, LAURSEN SB, JÆRGENSEN PH., 1998 - Inflammatory response of different chicken lines and B haplotypes to infection with infectious bursal disease virus. Avian Pathology 1998; 27 (2):181-9.
7. POPP CRISTIANA MIHAELA, 2004 – Studiu privind incidența bursitei infecțioase într-o fermă cu efective vaccinate antibursitic. - Simpoz. Ştiinț. Inter. „30 ani de învățământ superior medical veterinar din Republica Moldova”, Chişinău 1-2 octombrie, p. 290-292.

STUDIU ASUPRA PRODUCŢIEI DE OUĂ OBŢINUTĂ DE LA GĂINI REGENERATE FIZIOLOGIC (I)

STUDY ON THE EGG PRODUCTION ACHIEVED BY THE PHISIOLOGICALLY RECOVERED HENS (I)

SIMEANU D., GAVRILAS ANGELA, SIMEANU CRISTINA
USAMV Iaşi
dsimeanu@uaiasi.ro

The researches related to physiologic recovery of the hens have been run on a flock comprising 6999 laying hens, belonging to the Roso SL-2000 commercial hybrid. The fowl have been allocated in two experimental versions: V1, which included 1025 hens, aged 67 weeks and version V2, which comprised 5974 hens, aged 85 weeks. The brooding density reached 4 hens/cage in both versions. Consequently to study run, the following data have been acquired: the laying peak across the prolonged production period reached 77.37% in V1 version, during the 14th week post-molting, respectively 64.92% in V2 version, during the 13th week post-molting; average yield/fed hen was of 143.9 eggs in V1 version and 117.9 eggs in V2 version, during the 32 weeks post-molting; the physiologic recovery process induced eggs weight improvement; the morphological anomalies of the eggs produced during the 32 studied weeks were found within normal limits, reaching 2.06% in V1 version and 1.45% in V2 version. The achieved results recommends the appliance of the hens physiologic recovery procedures only if the hens are 65-70 weeks old at the beginning of this program and straight related to fowl condition, observed through their maintenance and health status, as well as through their yield level at that very moment.

Key words: laying hens, moulting, physiologic recovery

INTRODUCERE

Regenerarea fiziologică a găinilor ouătoare poate constitui o soluţie pentru realizarea unui ouat prelungit. Ea este considerată ca fiind un proces fiziologic normal de revitalizare a productivităţii găinilor ajunse la o vârstă înaintată, cu condiţia ca acest proces să nu fie provocat prin metode extrem de dure (*Ruszler, 1974, 1984 şi 1996; Mihailov, M., 1978; Vacaru-Opriş, I., 1993 şi 2002*).

Producătorii de ouă pentru consum din SUA folosesc programele de inducere a năpârlirii, când găinile ating vârsta de aproximativ 65 săptămâni (*Webster, A.B., 2000; Bell, D., 2001; Koelkebeck, K.W. şi col., 2001*).

Cele mai cunoscute programe de regenerare fiziologică a păsărilor se bazează pe suprimarea hranei. În timpul inducerii fenomenului de regenerare fiziologică se reduce greutate corporală a păsărilor cu 25-35%, dar acest fapt nu ar trebui să ne îngrijoreze, pentru că numai astfel se poate provoca fenomenul de „reîntinerire"; apoi, nu trebuie să se uite că şi în năpârlirea naturală, păsările refuză hrana o anumită perioadă de timp (*Mrosovky şi Sherry, 1980; Garlich, 1995*). Nici mortalitatea apărută în zilele de înfometare a păsărilor nu trebuie să ridice mari probleme, deoarece aceasta afectează numai păsările slăbite, epuizate fiziologic, care şi fără inducerea năpârlirii vor muri; năpârlirea indusă nu face altceva decât să accelereze „planul naturii" de selectare a celor mai rezistente păsări (*Ruszler, 1981; Vacaru-Opriş, I. şi col., 2002; Păduraru şi col., 2005*).

Cele mai multe cercetări efectuate de numeroşi autori, în această direcţie, s-au axat în principal pe urmărirea dinamicii greutăţii corporale a păsărilor, consumul de hrană, pierderile din efectiv şi producţia numerică de ouă, şi mai puţin pe calitatea producţiei de ouă obţinută după aplicarea unui proces de regenerare fiziologică.

MATERIAL ŞI METODE DE LUCRU

Cercetările au fost efectuate în Complexul Avicol Şivița, jud. Galați pe un număr de 6.999 găini ouătoare, aparținând hibridului comercial „Roso SL-2000", de proveniență românească. Găinile studiate au fost crescute în baterii tip BP-3, dispuse pe 6 rânduri. Efectivul studiat a fost împărțit în două variante experimentale: variantă V_1 a cuprins un număr de 1025 găini ce aveau vârsta de 67 săptămâni şi varianta V_2 a cuprins un număr de 5974 găini, în vârstă de 85 săptămâni. Densitatea de populare a păsărilor la începutul procesului de regenerare fiziologică a fost de 4 cap./cuşcă în ambele variante.

Conform planului experimental de năpârlire forțată întocmit, după perioada de două săptămâni, în care păsările au fost hrănite numai cu porumb uruit de cea mai bună calitate, la discreție, s-a trecut la administrarea restricționată ca nivel cantitativ (45 g/cap/zi) a unui nutreț combinat cu un nivel foarte redus de PB (10,24%), timp de 3 zile. La sfârşitul celor 3 zile, păsările au primit o altă rețetă de nutreț combinat, caracteristică vârfului de ouat (PB = 17,51%). Când ouatul a scăzut sub 60%, acestea au început să fie hrănite cu o a treia rețetă de nutreț combinat, având un nivel proteic mai redus (PB = 15,32%), adecvat situației date.

În *tabelul 1* sunt prezentate structurile şi condițiile de calitate pentru cele 3 rețete de nutrețuri combinate administrate.

Indicatorii urmăriți pe parcursul experienței au fost: intensitatea ouatului (%); anomaliile morfologice şi de aspect ale ouălor (%); dinamica greutății ouălor (g).

Tabelul 1. *Nutreţuri combinate experimentate*

Materii prime (%)	Cu 10,24% PB	Vârf de ouat	<60% ouat
Porumb	79,00	56,70	62,00
Şrot de floarea soarelui	10,00	7,00	10,00
Şrot de soia	-	23,50	15,00
DL-Metionină	0,20	0,15	0,10
L-Lizină	0,30	-	0,10
Ulei de floarea soarelui	-	2,15	2,10
Cretă furajeră	8,00	8,10	8,40
Fosfat dicalcic	1,20	1,10	1,00
Sare	0,30	0,30	0,30
Premix	1,00	1,00	1,00
TOTAL	100,00	100,00	100,00
Caracteristici nutritive			
EM kcal/kg nc	2835	2766	2796
PB%	10,24	17,51	15,32
Metionină+Cistină %	0,62	0,76	0,67
Lizină %	0,61	0,92	0,82
CB%	3,77	4,32	4,40
Ca %	3,46	3,52	3,60
P%	0,61	0,62	0,61

REZULTATE OBȚINUTE ŞI DISCUȚIA LOR

a) Cu privire la dinamica producției de ouă, anomaliile morfologice şi de aspect ale ouălor

La începutul aplicării programului de năpârlire forțată elaborat de noi, intensitatea ouatului era de 52,97% la varianta V_1 şi de 51,69% la varianta V_2, valori care se situează cu mult sub standardul hibridului „Roso SL-2000", pe care s-au efectuat cercetările, şi aceasta în special, la varianta V_1, cu găini în vârstă de 67 săptămâni, la care intensitatea ouatului trebuia să fie de 76%, conform curbei de ouat standard (*Ghidul de creştere Roso SL 2000*).

După prima zi de suprimare a hranei, ouatul a scăzut semnificativ, ajungând la 10,43% la varianta V_1 şi la 10,26% la varianta V_2, pentru ca după 2 zile de înfometare să se constate o oarecare revigorare a producţiei de ouă, probabil ca urmare a mobilizării rezervelor interne ale organismului păsărilor, intensitatea de ouat fiind de 40,97% la varianta V_1 şi de 39,20% la varianta V_2; o situaţie asemănătoare s-a pus în evidenţă şi după 4 zile de suprimare a hranei, când intensitatea de ouat a fost de 22,03% la varianta V_1 şi de 19,38% la varianta V_2, dar după 5 zile de suprimare a hranei, ouatul a scăzut vertiginos, încât din ziua a 10-a de suprimare a hranei, găinile nu s-au mai ouat la varianta V_1 şi din ziua de 12-a de S.H. la varianta V_2 (*fig. 1*).

Pe toată perioada de suprimare a hranei, numărul de ouă cu anomalii morfologice (ouă prea mici, ouă prea mari, ouă duble, ouă rotunjite la ambele capete, ouă subţiri la ambele capete, ouă cu coaja subţire, ouă fără coajă etc.) şi de aspect (spărturi de ouă) au fost foarte mari, reprezentând 23,37% la varianta V_1 şi 28,16% la varianta V_2 din numărul total de ouă produse.

Odată cu recuperarea pierderilor în greutate de către găinile năpârlite, ca urmare a reînceperii hrănirii acestora şi a creşterii numărului de ore lumină pe zi s-au creat condiţiile de viaţă necesare pentru redeclanşarea ouatului, care s-a produs în ziua a 26-a de la trecerea pe programul de năpârlire forţată (săptămâna a 4-a de năpârlire) la ambele variante experimentale. La două zile de la acest moment, păsările au început să fie hrănite cu o reţetă de nutreţ combinat pentru vârf de ouat.

La varianta V_1, după aproximativ 13 săptămâni de la depunerea primului ou post năpârlire, intensitatea ouatului a ajuns la un nivel constant ridicat, de peste 77% (77,16-77,23%). Acelaşi fenomen s-a produs la varianta V_2, după aproximativ 12 săptămâni de la depunerea primului ou post năpârlire, când intensitatea ouatului a depăşit, de asemenea, în mod constant valoarea de 64% (64,24-65,34%).

Niveluri relativ asemănătoare ale producţiei de ouă s-au menţinut timp de 14 săptămâni la varianta V_1 (între a 14-a şi a 27-a săptămână de ouat post năpârlire) şi de 15 săptămâni la varianta V_2 (între a 13-a şi a 27-a săptămână de ouat post năpârlire). Această perioadă poate fi considerată ca fiind platoul curbei de ouat, după care s-a înregistrat o scădere evidentă a producţiei de ouă, derulată pe parcursul a 5 săptămâni, la ambele variante experimentale (între săptămâna a 28-a şi a 32-a de ouat post năpârlire), cu valori ale intensităţii ouatului destul de fluctuante, cuprinse între 60,80-68,28% la varianta V_1 şi între 48,57-52,42% la varianta V_2.

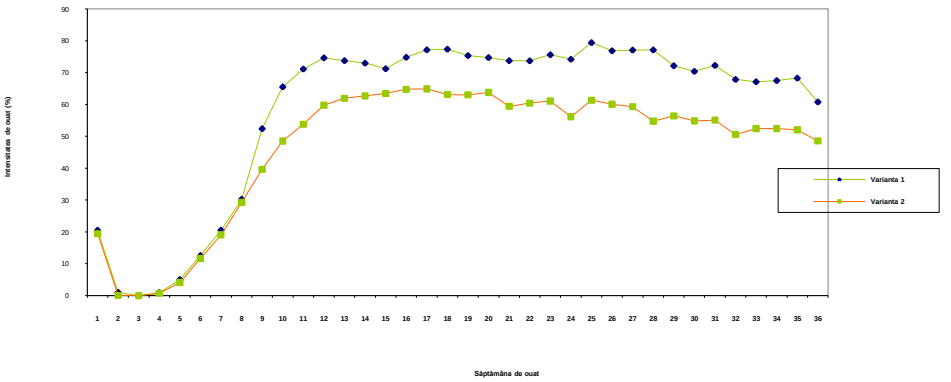


Fig. 1. ***Curba intensităţii de ouat la găinile regenerate fiziologic***

Menţionăm că, la varianta V_2, din momentul în care intensitatea ouatului a înregistrat, în mod constant, valori sub 60%, hrănirea păsărilor nu s-a mai făcut cu nutreţ combinat pentru vârf de ouat, ci cu un alt nutreţ combinat care a avut un conţinut mai redus de PB (PB=15,32%; EM=2796 kcal/kg nc; CB=4,40%; Ca=3,60%; P=0,61%). La varianta V_1, intensitatea ouatului nu a scăzut sub 60% în perioada studiată.

Producţia numerică de ouă realizate în cele 32 săptămâni de ouat post năpârlire forţată a fost de 143,9 buc/găină furajată la varianta V_1 şi de 117,9 buc/găină furajată la varianta V_2.

În privinţa anomaliilor morfologice şi de aspect întâlnite la ouăle studiate se poate afirma că acestea s-au înscris în limitele normale, după cum urmează:

- anomalii morfologice, raportate la întreg ciclul de producţie: 0,98% la varianta V_1 şi 0,75% la varianta V_2 (*fig. 2*);
- spărturi, raportate, de asemenea, la întreg ciclul de producţie: 1,08% la varianta V_1 şi 0,70% la varianta V_2 (*fig. 3*).

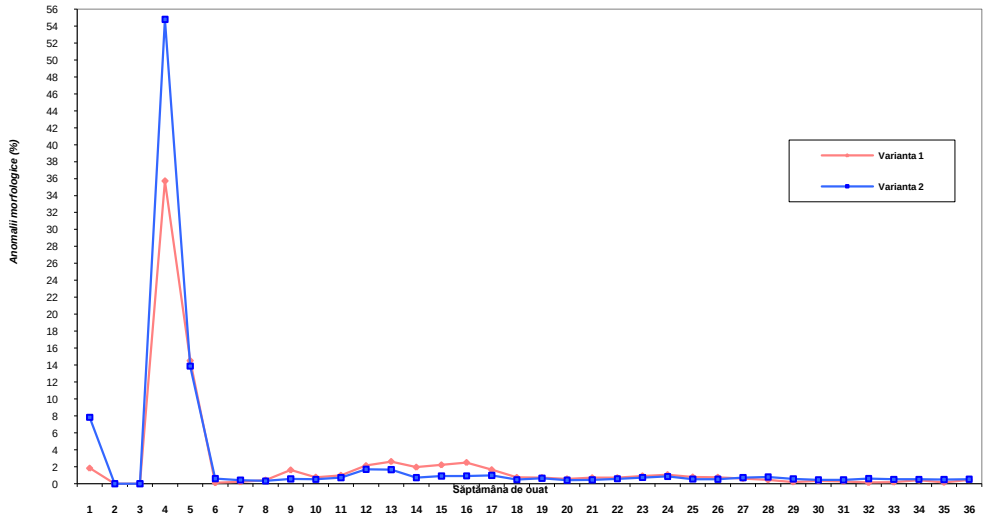


Fig. 2. ***Anomaliile morfologice ale ouălor obţinute de la găinile regenerate fiziologic***

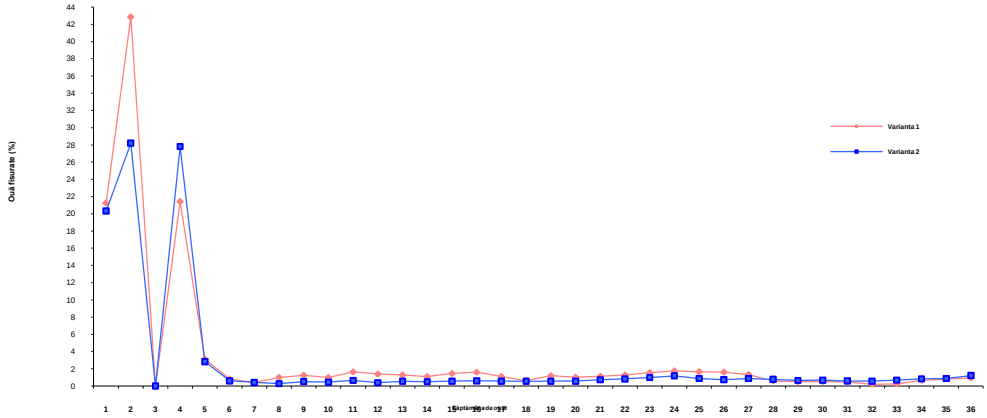


Fig. 3. ***Dinamica ouălor fisurate obţinute de la găinile regenerate fiziologic***

Considerăm că, din punct de vedere al anomaliilor morfologice şi de aspect, valorile obţinute caracterizează o foarte bună calitate a ouălor depuse de către găinile supuse năpârlirii forţate, proces care a determinat o regenerare fiziologică a lor.

Apreciate în ansamblu, rezultatele obţinute de către găinile din cele două variante experimentale ca nivel al producţiei numerice de ouă se poate afirma că acestea nu au exprimat

potențialul productiv cu care este cotat hibridul comercial pe care s-a lucrat, din cauza unor factori obiectivi, care pot să țină atât de valoarea zootehnică a seriei de păsări introdusă în experiență, cât şi de unii factori de natură tehnologică, precum: calitatea mai slabă, uneori, a materiilor prime pe baza cărora s-au fabricat nutrețurile combinate administrate, lipsa de climatizare a halelor de experiență etc.

b) Cu privire la greutatea ouălor

La începutul programului de regenerare fiziologică, greutatea medie a ouălor depuse de către găinile studiate a fost de 65,6±0,81 g la varianta V_1 şi de 67,5±0,59 g la varianta V_2 (*fig. 4*). Comparativ cu standardul hibridului crescut, care prevede o greutate medie a ouălor de 66,4 g la vârsta găinilor de 67 săptămâni şi de 66,8 g la vârsta găinilor de 85 săptămâni, se constată că la varianta V_1, ouăle au avut o greutate mai mică cu 1,21%, iar la varianta V_2, mai mare cu 1,05%. Între cele două variante experimentale nu s-au găsit diferențe statistice semnificative, iar coeficienții de variație calculați au indicat o foarte bună omogenitate a caracterului studiat (V%=8,10 la varianta V_1 şi 9,91 la varianta V_2).

Primele ouă depuse după revenirea în ouat (post năpârlire) au cântărit, în medie, 55,2±0,42 g la varianta V_1 şi 54,8±0,10 g la varianta V_2; din punct de vedere statistic, între cele două variante experimentale (V_1 şi V_2) nu au fost diferențe semnificative. Greutățile obținute pentru ouăle studiate sunt caracteristice găinilor tinere, în vârstă de 23-24 săptămâni.

Coeficientul de variație determinat pentru varianta V_1 a fost de 5,13%, corespunzător unei foarte bune omogenități a caracterului studiat, iar la varianta V_2 de 11,20%, valoare tipică pentru o omogenitate mijlocie a acestui caracter.

Treptat, pe măsura înaintării în ouat, greutatea ouălor s-a mărit, atingând niveluri maxime, de 70,3±0,84 g la varianta V_1, în săptămâna a 19-a de ouat post năpârlire şi de 69,9±0,86 g la varianta V_2, în săptămâna a 17-a de ouat post năpârlire. Între loturile aflate în aceiaşi săptămână de ouat nu s-au găsit diferențe statistice semnificative.

Creşterea greutății ouălor nu s-a produs, însă, liniar, aşa cum rezultă din datele de mai jos.

- ❖ la varianta V_1
- în săptămâna a 6-a de ouat post năpârlire: 63,5±0,88 g față de 66,5±1,08 g în săptămâna a 5-a;
- în săptămâna a 8-a de ouat post năpârlire: 66,3±0,73 g față de 66,5±0,65 g în săptămâna a 6-a;
- în săptămâna a 11-a de ouat post năpârlire: 66,3±0,84 g față de 68,7±0,71 g în săptămâna a 10-a;
- în săptămâna a 12-a de ouat post năpârlire: 67,5±0,71 g față de 68,7±0,71 în săptămâna a 10-a;
- în săptămâna a 13-a de ouat post năpârlire: 68,0±0,68 g față de 68,7±0,71 g în săptămâna a 11-a;
- în săptămâna a 16-a de ouat post năpârlire: 69,0±0,42 g față de 69,5±0,99 g în săptămâna a 15-a etc.;
- ❖ la varianta V_2
- în săptămâna a 2-a de ouat post năpârlire: 60,8±0,77 g față de 61,6±0,68 g în săptămâna a 1-a;
- în săptămâna a 6-a de ouat post năpârlire: 64,6±0,68 g față de 65,9±0,99 g în săptămâna a 5-a;
- în săptămâna a 8-a de ouat post năpârlire: 65,9±0,88 g față de 67,1±0,75 g în săptămâna a 7-a;
- în săptămâna a 11-a de ouat post năpârlire: 64,1±0,73 g față de 69,0±0,80 g în săptămâna a 10-a;

- în săptămâna a 12-a de ouat post năpârlire: 67,0±0,56 g faţă de 69,0±0,80 g în săptămâna a 10-a;
- în săptămâna a 13-a de ouat post năpârlire: 68,5±1,00 g faţă de 69,0±0,80 g în săptămâna a 10-a etc.

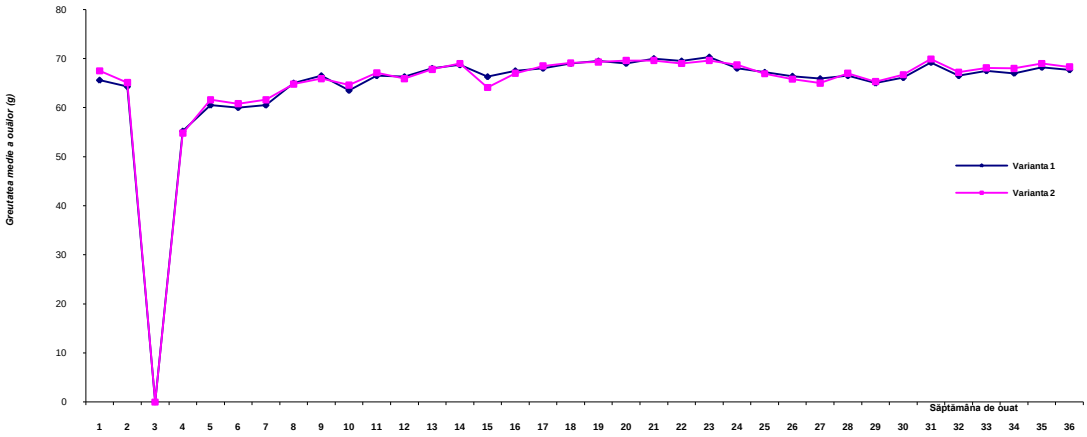


Fig. 4. ***Evoluţia greutăţii ouălor obţinute de la găinile regenerate fiziologic***

Către finalul perioadei experimentale, corespunzătoare sfârşitului de ouat, greutatea ouălor a cunoscut o nouă creştere, astfel încât în penultima săptămână de ouat post năpârlire (săptămâna a 31-a), greutatea medie a ouălor a fost de 68,2±0,67 g la varianta V_1 şi de 69,0±0,53 g la varianta V_2, pentru ca în ultima săptămână de ouat să se înregistreze o nouă scădere de greutate (67,7±0,68 g la V_1 şi 68,3±0,77 g la V_2). Atât în săptămânile de ouat premergătoare atingerii greutăţii maxime a ouălor, cât şi după acest moment, între cele două variante experimentale nu au existat diferenţe statistice semnificative, iar coeficienţii de variaţie au înregistrat valori cuprinse între 10-20%, ceea ce caracterizează o omogenitate mijlocie a caracterului studiat.

CONCLUZII

1. Ouatul a încetat după 9 zile de suprimare a hranei la varianta V_1 şi după 11 zile la varianta V_2 şi a fost reluat, la ambele variante experimentale, spre sfârşitul săptămânii a 4-a a programului de năpârlire, urmare a reînceperii furajării păsărilor; concomitent, în mod treptat, s-au recuperat pierderile în greutate cauzate de suprimarea hranei.

2. Intensitatea de ouat a scăzut semnificativ după prima zi de suprimare a hranei având o tendinţă de creştere după două zile de suprimare a hranei, probabil ca urmare a mobilizării rezervelor interne ale organismului păsărilor, după care a continuat să scadă, astfel încât, găinile din varianta V_1 nu au mai ouat din ziua a 10-a de suprimare a hranei, iar cele din varianta V_2, începând cu ziua a 12-a de suprimare a hranei. Ouatul a revenit odată la ambele variante experimentale, în ziua a 26-a de la implementarea programului de regenerare fiziologică, respectiv către sfârşitul săptămânii a 4-a de năpârlire. La varianta V_1, după 13 săptămâni de la depunerea primului ou post năpârlire, intensitatea ouatului a atins cele mai înalte valori (peste 77%), iar la varianta V_2, după 12 săptămâni de ouat (peste 64%). Niveluri relativ asemănătoare ale intensităţii ouatului s-au menţinut timp de 14 săptămâni la varianta V_1 şi de 15 săptămâni la varianta V_2, cu menţiunea că acestea au prezentat mari fluctuaţii, limitele de variaţie fiind cuprinse între 63,55-85,35% la varianta V_1 şi între 38,63-70,13% la varianta V_2. După 32 de săptămâni de ouat, când intensitatea ouatului a scăzut la 60,80% la varianta V_1 şi 48,57% la varianta V_2 s-a apreciat că nu mai este economică creşterea şi exploatarea, în

continuare, a găinilor studiate, cu deosebire a celor din varianta V_2. Producţia numerică de ouă realizată în 32 săptămâni de ouat post năpârlire a fost de 143,9 buc/găină furajată la varianta V_1 şi de 117,9 buc/găină furajată la varianta V_2.

3. Anomaliile morfologice şi de aspect identificate la ouăle obţinute pe parcursul celor 32 săptămâni de ouat post năpârlire s-au înscris în limitele normale, fiind de 2,06% la varianta V_1 şi de 1,45% la varianta V_2.

4. Urmare a aplicării programului de regenerare fiziologică aplicat s-a îmbunătăţit greutatea ouălor. Astfel, în săptămâna a 18-a de ouat post năpârlire, greutatea medie a ouălor a fost de 70,0±1,05 g la varianta V_1 şi de 69,9±0,86 g la varianta V_2 faţă de 65,6±0,81 g la varianta V_1 şi de 67,5±0,59 g la varianta V_2, la începutul programului de năpârlire studiat.

Rezultatele obţinute în cadrul acestei experienţe ne îndreptăţeşte să recomandăm aplicarea procedeelor de regenerare fizilogică a găinilor, cu condiţia ca vârsta păsărilor la momentul declanşării acestui program să fie cuprinsă între 65-70 săptămâni, variabilă în funcţie de condiţia păsărilor la acest moment, apreciată atât prin prisma stării lor de întreţinere şi sănătate, cât şi a nivelului productiv pe care îl au înacel moment.

BIBLIOGRAFIE

BELL, D.D., 2001 – Flock-Friendly Methods – Alternatives to Feed Removal. Cornell Poultry Conference, Cornell, New-York, June 20, SUA.

KOELKEBECK, C.M.; PARSONS, P.B. and MICHELE, DAUGLAS, 2001 – Application of Non-Feed Removal Methods for Molting Commercial Layers Ken W. CABI Publishing, Wallingford.

MIHAILOV, M., 1978 – Contribuţii la mărirea producţiei speciei Gallus domesticus, prin folosirea năpârlirii forţate. Teză pentru obţinerea titlului de „Doctor în Agronomie", I.A.M.B. Bucureşti.

PĂDURARU, G., SIMEANU, D., 2005 – Contribuţii la prelungirea ouatului găinilor producătoare de ouă consum, prin năpârlirea forţată, în condiţii de eficienţă economică. Lucrări Ştiinţifice, seria Zootehnie, vol. 48, pag. 442-451, USAMV Iaşi, Editura „Ion Ionescu de la Brad" Iaşi.

PĂDURARU, G., COTEA, C., SIMEANU, D., 2005 – Modificări hosto-cito-chimice la găinile năpârlite forţat. Lucrări Ştiinţifice, seria Zootehnie, vol. 48, pag. 430-441, USAMV Iaşi, Editura „Ion Ionescu de la Brad" Iaşi.

RUSZLER, P.L., 1996 – Health and husbandry considerations of induced molting. Poultry Science 77:1789-1793.

VACARU-OPRIŞ, I., 1993 – Tehnologia creşterii păsărilor, vol. I şi II. Centrul de multiplicare al Universităţii Agronomice Iaşi.

VACARU-OPRIŞ, I. şi col., 2002 – Tratat de avicultură, vol. II. Editura Ceres, Bucureşti.

WEBSTER, A.B., 2000 – Behavior of White Leghorn Laying Hens After Withdrawal of Feed. Poultry Science 79:192-200.

WEBSTER, A.B., 2000 – Environmental and Health. Behavior of White Leghorn Laying Hens After Withdrawal of Feed. Poultry Science 79:192-200.

STUDIU ASUPRA PRODUCŢIEI DE OUĂ OBŢINUTĂ DE LA GĂINI REGENERATE FIZIOLOGIC (II)

STUDY ON THE EGG PRODUCTION ACHIEVED BY THE PHISIOLOGICALLY RECOVERED HENS (II)

SIMEANU D., GAVRILAS ANGELA, SIMEANU CRISTINA
USAMV Iaşi
dsimeanu@uaiasi.ro

The researches concerning the hens physiologic recovery have been carried out using 15.145 laying hens, belonging to the Roso SL-2000 commercial hybrid. The studied flock, aged 73 weeks, has been equally divided in two experimental versions - V_3 andV_4; the fowl have been accommodated in BP-3 cage batteries; the density at the experiment onset reached 3 hens/cage at V_3 and 4 hens/cage at V_4. The researches results are listed below: the laying peak recorded during the prolonged production activity reached 82.29% in V_3 version in the 7^{th} week post-molting respectively 73.82% at the V_4 version, during the same period; average yield per fed hen reached 140.1 eggs in V_3 version and 119.05 eggs in V_4 version; the recovery process induced eggs weight improvement. The results achieved during these experiments allow us to advice the usage of the physiologic recovery methods only if fowl age at molting onset is less than 71 weeks and the accommodation density reaches 3 hens/cage.

Key words: physiologic recovery, laying hens, molting

INTRODUCERE

Regenerarea fiziologică a găinilor ouătoare poate constitui o soluţie pentru realizarea unui ouat prelungit. Ea este considerată ca fiind un proces fiziologic normal de revitalizare a productivităţii găinilor ajunse la o vârstă înaintată, cu condiţia ca acest proces să nu fie provocat prin metode extrem de dure (*Ruszler, 1974, 1984 şi 1996; Mihailov, M., 1978; Vacaru-Opriş, I., 1993 şi 2002*).

Producătorii de ouă pentru consum din SUA folosesc programele de inducere a năpârlirii, când găinile ating vârsta de aproximativ 65 săptămâni (*Webster, A.B., 2000; Bell, D., 2001; Koelkebeck, K.W., Parsons, C.M. şi col., 2001*).

Cele mai cunoscute programe de regenerare fiziologică a păsărilor se bazează pe suprimarea hranei. În timpul inducerii fenomenului de regenerare fiziologică se reduce greutate corporală a păsărilor cu 25-35%, dar acest fapt nu ar trebui să ne îngrijoreze, pentru că numai astfel se poate provoca fenomenul de „reîntinerire"; apoi, nu trebuie să se uite că şi în năpârlirea naturală, păsările refuză hrana o anumită perioadă de timp (*Mrosovky şi Sherry, 1980; Garlich, 1995*). Nici mortalitatea apărută în zilele de înfometare a păsărilor nu trebuie să ridice mari probleme, deoarece aceasta afectează numai păsările slăbite, epuizate fiziologic, care şi fără inducerea năpârlirii vor muri; năpârlirea indusă nu face altceva decât să accelereze „planul naturii" de selectare a celor mai rezistente păsări (*Ruszler, 1981; Vacaru-Opriş, I. şi col., 2002; Păduraru şi col., 2005*).

Cele mai multe cercetări efectuate de numeroşi autori, în această direcţie, s-au axat în principal pe urmărirea dinamicii greutăţii corporale a păsărilor, consumul de hrană, pierderile din efectiv şi producţia numerică de ouă, şi mai puţin pe calitatea producţiei de ouă obţinută după aplicarea unui proces de regenerare fiziologică.

MATERIAL ŞI METODE DE LUCRU

Cercetările au fost efectuate în Complexul Avicol Şivița, jud. Galaţi pe un număr de 15.145 găini ouătoare, aparţinând hibridului comercial „Roso SL-2000", de proveniență românească. Găinile studiate au fost crescute în baterii tip BP-3, dispuse pe 6 rânduri. Efectiv studiat a fost împărţit în

două variante experimentale: variantă V_3 a cuprins un număr de 7572 găini ce au avut o densitate la populare de 3 cap./cuşcă; varianta V_4 a cuprins un număr de 7573 găini ce au avut o densitate la populare de 4 cap./cuşcă. Vârsta păsărilor studiate în cele două variante experimentale a fost de 73 săptămâni.

Conform planului experimental de regenerare fiziologică întocmit, după perioada de două săptămâni, în care păsările au fost hrănite numai cu porumb uruit de cea mai bună calitate, la discreţie, s-a trecut la administrarea restricţionată ca nivel cantitativ (45 g/cap/zi) a unui nutreţ combinat cu un nivel foarte redus de PB (10,24%), timp de 3 zile. La sfârşitul celor 3 zile, păsările au primit o altă reţetă de nutreţ combinat, caracteristică vârfului de ouat (PB = 17,51%). Când ouatul a scăzut sub 60%, acestea au început să fie hrănite cu o a treia reţetă de nutreţ combinat, având un nivel proteic mai redus (PB = 15,32%), adecvat situaţiei date.

În *tabelul 1* sunt prezentate structurile şi condiţiile de calitate pentru cele 3 reţete de nutreţuri combinate administrate.

Indicatorii urmăriţi pe parcursul experienţei au fost: intensitatea ouatului (%); anomaliile morfologice şi de aspect ale ouălor (%); dinamica greutăţii ouălor (g).

Tabelul 1. *Nutreţuri combinate experimentate*

Materii prime (%)	Cu 10,24% PB	Vârf de ouat	<60% ouat
Porumb	79,00	56,70	62,00
Şrot de floarea soarelui	10,00	7,00	10,00
Şrot de soia	-	23,50	15,00
DL-Metionină	0,20	0,15	0,10
L-Lizină	0,30	-	0,10
Ulei de floarea soarelui	-	2,15	2,10
Cretă furajeră	8,00	8,10	8,40
Fosfat dicalcic	1,20	1,10	1,00
Sare	0,30	0,30	0,30
Premix	1,00	1,00	1,00
TOTAL	100,00	100,00	100,00
Caracteristici nutritive			
EM kcal/kg nc	2835	2766	2796
PB%	10,24	17,51	15,32
Metionină+Cistină %	0,62	0,76	0,67
Lizină %	0,61	0,92	0,82
CB%	3,77	4,32	4,40
Ca %	3,46	3,52	3,60
P%	0,61	0,62	0,61

REZULTATE OBŢINUTE ŞI DISCUŢIA LOR

a) Cu privire la dinamica producţiei de ouă, anomaliile morfologice şi de aspect ale ouălor

Procesul de regenerarea fiziologică elaborat de noi a cuprins sistarea ouatului după 7 zile de suprimare a hranei păsărilor studiate. De fapt, sistarea ouatului s-a produs din ziua a 6-a de suprimare a hranei, dacă avem în vedere că în ziua a 7-a de la suprimarea hranei, intensitatea ouatului a fost de numai 0,41% faţă de 60,78% în prima zi, la varianta V_3 şi mai redusă, de 0,26% faţă de 59,20% în ziua de referinţă, la varianta V_4.

În zilele a 8-a şi a 9-a de, producţia de ouă realizată a fost mai mică de 10 buc./zi la ambele variante experimentale (V_3 şi V_4) şi de aceea, nici nu a mai fost înregistrată. Revenirea la ouat s-a produs către sfârşitul celei de a 4-a săptămâni de năpârlire forţată, încât în ultima zi a acestei săptămâni, intensitatea ouatului a atins valori de 8,52% la varianta V_3 şi de 4,63% la varianta V_4 (*fig. 1*). Ouatul a continuat să crească într-un ritm intens la varianta V_3 şi mai puţin intens, la varianta V_4, astfel că în săptămâna a 7-a de ouat post năpârlire s-a realizat vârful de ouat, corespunzător unei

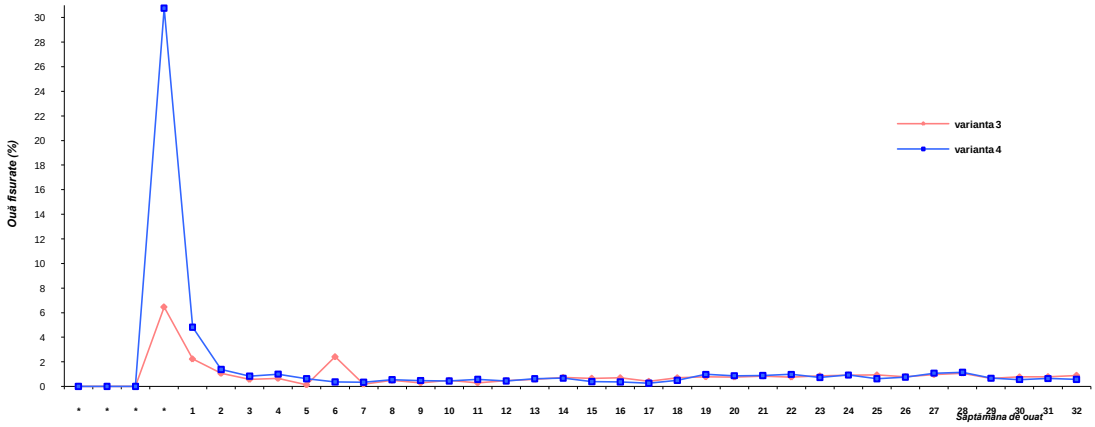
intensităţi a ouatului de 82,29% la varianta V_3 şi de 73,82% la varianta V_4, după care găinile studiate au intrat în platoul ouatului, extins pe 8 săptămâni la varianta V_3 şi pe 2 săptămâni la varianta V_4. În cazul variantei V_3, platoul ouatului s-a caracterizat printr-o intensitate a ouatului care a scăzut de la 82,29% în vârf de ouat la 70,08% în a 15-a săptămână de ouat post năpârlire, iar la varianta V_4, de la 73,82% în vârf de ouat la 70,72% în a 9-a săptămână de ouat post năpârlire.

În ultimele 17 săptămâni de ouat post năpârlire, la varianta V_3, intensitatea ouatului a scăzut de la 70,08%, realizată în săptămâna a 15-a de ouat post năpârlire la 50,52% în săptămâna a 32-a de ouat, după care păsările studiate nu au mai prezentat interes din punct de vedere productiv şi implicit, financiar.

La varianta V_4, intensitatea ouatului a scăzut de la 70,27% în săptămâna a 9-a de ouat post năpârlire la 48,18% în ultima săptămână de ouat post năpârlire (a 32-a). Practic, exploatarea găinilor din această variantă experimentală nu a fost rentabilă din săptămâna a 29-a de ouat post năpârlire, când intensitatea ouatului a ajuns la o valoare foarte scăzută, de 49,90%. Per total, în 32 săptămâni de ouat post năpârlire, producţia medie de ouă pe găină furajată a fost de 140,1 ouă la varianta V_3 şi 119,05 ouă la varianta V_4.

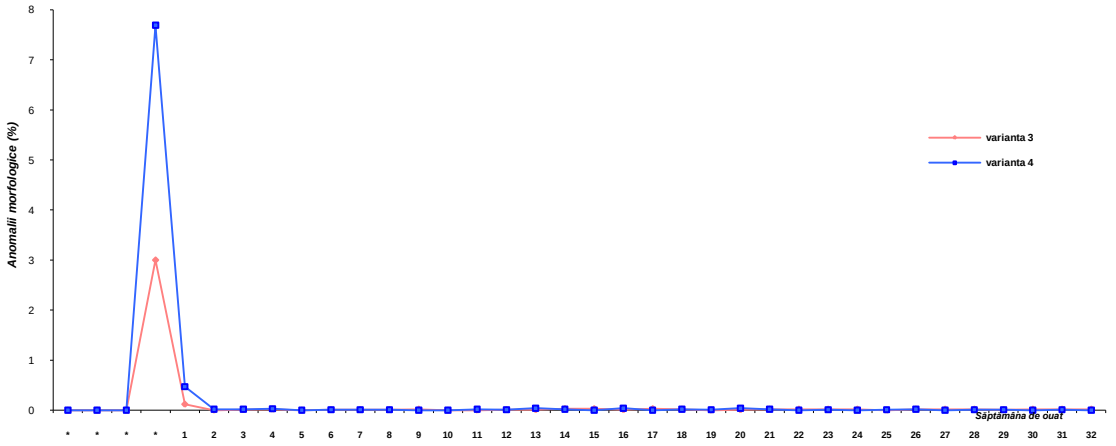
Numărul de ouă cu spărturi, în aceiaşi perioadă de ouat, a reprezentat 0,67% din numărul de ouă produse la varianta V_1 şi 0,64% la varianta V_2 (*fig. 2*), iar numărul de ouă cu anomalii morfologice (ouă ascuţite la ambele capete, ouă rotunjite la ambele capete, ouă duble etc.) raportate, de asemenea, la întreaga perioadă de ouat a atins un nivel de 0,13% la varianta V_3 şi de 0,14% la varianta V_4.

În privinţa anomaliilor morfologice şi de aspect întâlnite la ouăle studiate se poate afirma că acestea s-au înscris în limitele normale. Valorile înregistrate la cele două variante experimentale au fost mai scăzute de 1% pe întregul ciclu productiv.



*Notă: * regenerare fiziologică*

Fig. 1. ***Dinamica ouălor fisurate obţinute de la găinile regenerate fiziologic***



*Notă: * regenerare fiziologică*

Fig. 2. ***Anomaliile morfologice ale ouălor obţinute de la găinile regenerate fiziologic***

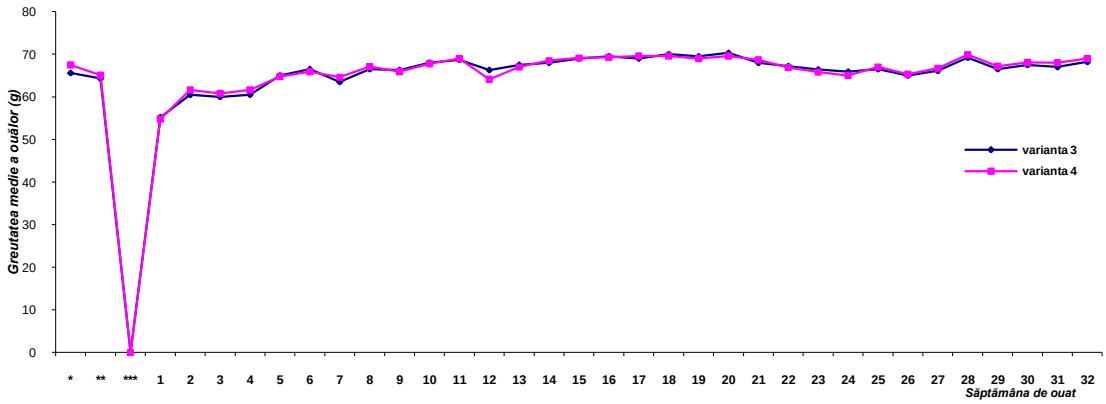
Din cele arătate se constată că, între cele două variante experimentale au existat diferenţe mari ca nivel al producţiei de ouă; astfel, la varianta V_3, producţia de ouă a fost superioară celei înregistrate la varianta V_4 cu 15,02%. O explicaţie pentru această stare este greu de găsit, în condiţiile în care atât păsările din varianta V_3 cât şi cele din varianta V_4 au fost crescute în aceiaşi hală, unde parametrii de microclimat asiguraţi nu au diferit de la o variantă experimentală la alta, iar calitatea hranei administrate a fost aceiaşi pentru toate păsările. Singura diferenţă între cele două variante experimentale a constat în asigurarea unei densităţi diferite pe cuşca de baterie, de 3 cap. la varianta V_3 şi de 4 cap. la varianta V_4.

b) Cu privire la greutatea ouălor

La vârsta declanşării programului de regenerare fiziologic, greutatea medie a ouălor a fost de 65,0±0,67 g la varianta V_3 şi de 66,1±0,43 g la varianta V_4 (*fig. 3*); aceste greutăţi ale ouălor sunt specifice hibridului pe care s-a lucrat („ROSO-SL 2000”), în ultima fază a curbei de ouat.

Conform celor arătate la un punct anterior, după zile 11 zile de suprimare a hranei, la ambele variante experimentale ouatul a încetat, fiind reluat în a doua jumătate a săptămânii a 4-a de experimentare a programului de năpârlire forţată elaborat.

În prima săptămână de năpârlire forţată, când păsările nu au primit nici un fel de hrană, iar programul de lumină s-a redus brusc de la 16 ore/zi la 8 ore/zi, greutatea ouălor s-a menţinut aproape neschimbată la varianta V_3 (65,20±0,62 g), dar s-a redus la varianta V_4 (65,70±0,48 g).



*Notă: * - săptămâna premergătoare declanşării programului de regenerare fiziologică;*
*** - săptămâna 1 de regenerare fiziologică;*
**** - săptămâna a 2-a de regenerare fiziologică – sistare ouat.*

*Fig. 3. **Evoluţia greutăţii ouălor obţinute de la găinile regenerate fiziologic***

Reducerea greutăţii ouălor a fost mai drastică la reluarea ouatului, care a marcat debutul procesului de reglare fiziologică a păsărilor post năpârlire; astfel, primele ouă depuse au avut o greutate medie de 56,70±0,36 g la varianta V_3 şi de 55,60±0,16 g la varianta V_4. Începând, însă, cu săptămâna a 2-a de ouat post năpârlire, greutatea medie a ouălor a crescut la 62,80±0,81 g la varianta V_3 şi la 64,20±0,94 g la varianta V_4, pentru ca în săptămâna a 5-a de ouat post năpârlire, la varianta V_3 să fie depăşită greutatea medie a ouălor înregistrată în săptămâna premergătoare declanşării programului de năpârlire forţată elaborat (65,40±0,95 g faţă de 65,00±0,67 g în săptămâna premergătoare declanşării programului de năpârlire forţată). Acelaşi fenomen s-a pus în evidenţă şi la varianta V_4, dar în săptămâna a 6-a de ouat post năpârlire.

Creşterea în greutate a ouălor a continuat şi în săptămânile următoare de ouat; astfel, în vârf de ouat, corespunzător săptămânii a 7-a de ouat post năpârlire, greutatea ouălor a fost de 67,5±0,58 g la varianta V_3 şi de 66,8±0,95 g la varianta V_4. Către sfârşitul perioadei experimentale (săptămâna a 32-a de ouat post năpârlire), greutatea medie a ouălor s-a menţinut ridicată, dar înscrisă în limitele standardului hibridului pe care s-a lucrat (68,6±1,02 g la varianta V_3 şi de 68,7±1,05 g la varianta V_4). Valorile obţinute pentru coeficientul de variaţie (V%) au indicat o omogenitate mijlocie a caracterului studiat, cu unele mici excepţii. Diferenţele de greutate a ouălor dintre cele două variante experimentale nu au fost asigurate statistic.

CONCLUZII

1. Ouatul a încetat practic după aproximativ 7 zile de suprimare a hranei atât la varianta V_3 cât şi la varianta V_4, fiind reluat la sfârşitul săptămânii a 4-a de năpârlire forţată, urmare a reînceperii furajării găinilor studiate. În săptămâna a 7-a de ouat post-năpârlire s-a atins vârful de ouat, însemnând o intensitate a ouatului de 82,29% la varianta V_3 şi cu mult mai mică, de 73,82% la varianta V_4. În 32 săptămâni de ouat post-năpârlire, s-a obţinut o producţie medie de ouă pe găină furajată de 140,1 buc. la varianta V_3 şi de numai 119,05 buc. la varianta V_4.

2. Greutatea ouălor a avut o evoluţie normală. În săptămâna a 5-a de ouat post-năpârlire, la varianta V_3 a fost depăşită greutatea medie a ouălor din săptămâna premergătoare declanşării programului de năpârlire forţată (65,40 ± 0,95 g faţă de 65,00 ± 0,67 g). Acelaşi fenomen s-a pus în

evidenţă la varianta V_4 în cea de a 6-a săptămână de ouat post-năpârlire (66,8 ± 0,95 g faţă de 66,1 ± 0,43 g).

3. Anomaliile morfologice şi de aspect întâlnite la ouăle studiate au avut o pondere foarte scăzută (sub 1%) pentru ambele variante experimentale.

Pe baza rezultatelor obţinute se recomandă pentru practica creşterii şi exploatării hibridului ouător de găină „Roso SL-2000", implementarea programului de regenerare fiziologică, cu condiţia ca vârsta păsărilor la momentul declanşării acestui program să nu fie mai mare de 71 săptămâni.

În acelaşi timp, considerăm că reducerea densităţii pe cuşca de baterie, tip BP-3 de la 4 la 3 exemplare este benefică, mai ales pentru un material genetic cu caracteristici morfoproductive asemănătoare celui pe care s-a lucrat.

BIBLIOGRAFIE

1. BELL, D.D., 2001 – Flock-Friendly Methods – Alternatives to Feed Removal. Cornell Poultry Conference, Cornell, New-York, June 20, SUA.
2. KOELKEBECK, C.M.; PARSONS, P.B. and MICHELE, DAUGLAS, 2001 – Application of Non-Feed Removal Methods for Molting Commercial Layers Ken W. CABI Publishing, Wallingford.
3. MIHAILOV, M., 1978 – Contribuţii la mărirea producţiei speciei Gallus domesticus, prin folosirea năpârlirii forţate. Teză pentru obţinerea titlului de „Doctor în Agronomie", I.A.M.B. Bucureşti.
4. PĂDURARU, G., SIMEANU, D., 2005 – Contribuţii la prelungirea ouatului găinilor producătoare de ouă consum, prin năpârlirea forţată, în condiţii de eficienţă economică. Lucrări Ştiinţifice, seria Zootehnie, vol. 48, pag. 442-451, USAMV Iaşi, Editura „Ion Ionescu de la Brad" Iaşi.
5. PĂDURARU, G., COTEA, C., SIMEANU, D., 2005 – Modificări hosto-cito-chimice la găinile năpârlite forţat. Lucrări Ştiinţifice, seria Zootehnie, vol. 48, pag. 430-441, USAMV Iaşi, Editura „Ion Ionescu de la Brad" Iaşi.
6. RUSZLER, P.L., 1996 – Health and husbandry considerations of induced molting. Poultry Science 77:1789-1793.
7. VACARU-OPRIŞ, I., 1993 – Tehnologia creşterii păsărilor, vol. I şi II. Centrul de multiplicare al Universităţii Agronomice Iaşi.
8. VACARU-OPRIŞ, I. şi col., 2002 – Tratat de avicultură, vol. II. Editura Ceres, Bucureşti.
9. WEBSTER, A.B., 2000 – Behavior of White Leghorn Laying Hens After Withdrawal of Feed. Poultry Science 79:192-200.
10. WEBSTER, A.B., 2000 – Environmental and Health. Behavior of White Leghorn Laying Hens After Withdrawal of Feed. Poultry Science 79:192-200.

EFECTELE UNOR EXTRACTE VEGETALE ASURA EVOLUȚIEI BURSEI ŞI A METABOLISMULUI BURSAL

EFFECT OF SOME VEGETAL EXTRACT ON EVOLUTION AND METABOLISM OF FABRICIUS BURSA

SPINU MARINA, GIURGEA RODICA, SANDRU CARMEN DANA, BRUDASCA F., NICULAE MIHAELA, CADAR D., KOBOLKUTI L., SZAKACS BIANCA
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară
Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca
marinaspinu@yahoo.com

The research aimed to monitor the age and immunological maturity dependence of bursal growth and its metabolic responses in chickens treated with alcoholic extracts of Calendula officinalis and Echinaceea angustifolia. The investigations were carried out on two groups of immunologically mature, 47 days old (n=28) and immunologically immature, 19 days old (n=28) chickens, treated orraly (0.5 ml/chicken/day, for 7 days) with the extracts (batch I - Calendula, batch II - Echinacea), alcohol (batch III, solvent control) or saline (batch IV, environment control). At the end of experiment bursas were weighed and metabolic parameters (nucleic acids, glucose, respiratory burst, glycogen, total proteins) were quantified.Student t test was used for the statistical significance of the differences.

There was a positive influence of the vegetale extracts on bursal weight depending on immunological immaturity. The Calendula extract positively influenced the respiratory burst, total protein and glycogen, while that of Echinacea acted as a stimulant for glycogen, glucose and nucleic acid synthesis. The obtained data indicated a potential immune metabolic adjuvant effect of the two extracts, positively related to the sate of immunological maturity, more pronounced for the Calendula than for the Echinacea extract.

Key words: chickens, immune stimulation, Fabricius bursa, metabolic burst

INTRODUCERE

Date recente din literatură subliniază efectele benefice observate pentru compuşi sau substanţe extractive vegetale în corelaţie cu tratamentele tradiţionale, în situaţii care solicită intervenţia sistemului imun (Bauer, 2002). Încadrate în context ştiinţific, astfel de informaţii oferă suportul pentru orientarea investigaţiile în direcţia posibilelor elemente imunomodulatoare vegetale, cu potenţial terapeutic mai pronunţat şi efecte secundare reduse sau absente, în comparaţie cu produsele de sinteză (Dattner, 2003). Dacă într-o primă etapă au fost conturate două direcţii principale de investigaţie, vizând în principal efectele anticanceroase şi antimicrobiene, pe baza rezultatelor preliminare obţinute, cercetările s-au extins ulterior, în scopul caracterizării influenţei particulare a extractelor vegetale complexe sau purificate, asupra diferitelor laturi ale sistemului imun. Cu toate acestea, interacţiunea extract – efector/mecanism imun este departe de a fi pe deplin clarificată (Dewick, 1997; Attele şi col., 1999).

Posibilităţile oferite de tehnicile performante puse la punct în ultimii ani (PCR, secvenţializare genomică, HPLC, anticorpi monoclonali, etc.)(Răpuntean, 1996) permit o introspecţie "microscopică" uneori, în modul de vehiculare al compuşilor vegetali la nivelul organismelor receptoare (Berczi şi col., 2000; Kaufman şi col., 1999; Nahrstedt şi Butterwick,1997; Schulz şi col., 1998). Posibilităţile de interacţiune între aceşti compuşi şi macroorganismul tratat par a fi extrem de variate, dependente de starea de echilibru metabolic, de gradul de activare al sistemului imun, de starea fiziologică a întregului organism, în ultimă instanţă. Acestea sunt câteva dintre cauzele pentru care este destul de

dificil de prevăzut, în unele situaţii, rezultatul interacţiunii compus extractiv vegetal- organism supus terapiei (Percival, 2000).

Cu toate că unii factori afectează componentele sistemului imun doar limitat, în mod obişnuit, aceste acţiuni se repercutează şi asupra morfologiei şi gravimetriei organelor limfoide ca şi a activităţii metabolice de la nivelul acestora, ceea ce poate aduce primele informaţii cu privire la influenţa unor principii active vegetale asupra funcţionării bursei lui Fabricius şi implicit asupra activităţii întregului organism, dependent de maturitatea imunologică, obiectiv urmărit în cercetarea efectuată.

MATERIALE ŞI METODE

Studiul a fost efectuat pe pui de găină, în vîrstă de 47 (n=28), maturi imunologic respectiv 19 zile (n=28), imaturi imunologic. Pentru efectuarea experimentului puii au fost distribuiţi în câte 4 loturi fiecare, în fiecare lot fiind repartizate câte 7 păsări. Cele două grupe de vârstă au fost supuse unui tratament peroral similar, timp de 7 zile. Loturile din fiecare grupă au fost numerotate de la I la IV şi au fost tratate cu extracte vegetale astfel: lotul I - s-a administrat extract alcoolic din flori de *Calendula officinalis*, în cantitate de 0,5 ml/pui/zi; lotul II - s-a administrat extractul alcoolic din flori *de Echinaceea angustifolia*, în cantitate de 0,5 ml/pui/zi; lotul III - a fost reprezentat de păsări supuse tratamentului cu alcool 70^{o}, acesta a fost lotul martor pentru acţiunea solventului celor două extracte utilizate; lotul IV – ser fiziologic 0,5 ml/zi/pasăre, a reprezentat martorul pentru influenţa condiţiilor de mediu, a stresului de manipulare şi administrare.

La puii mici, împărţirea pe loturi a fost similară, iar tratamentele cu extracte s-au efectuat cu doze recalculate în funcţie de greutatea corporală.

La finele experimentului, păsările au fost sacrificate, recoltându-se probe din bursă în recipienţi sterili, individuali, pentru estimarea gravimetrică şi a parametrilor de metabolism. Astfel s-au determinat: respiraţia celulară (metoda Warburg), glucoza (colorimetrie), glicogenul (metoda Montgomery), acizii nucleici (metoda Spirin), proteinele totale (metoda Lowry). Datele au fost prelucrate statistic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Unul dintre paradoxurile cu care se confruntă în era biochimiei farmaceutice specialistul instruit pe baze ştiinţifice, este revenirea la remediile populare, respectiv la medicina fitoterapeutică şi la protocoalele tradiţionale de vindecare (Clark, 1996). Acest paradox se încadrează însă în procesul de redescoperire a unei vaste baze de date antropologice legate de tratamentele efectuate prin utilizarea plantelor, imposibil de alcătuit numai pe baza experimentelor ştiinţifice.

Instrumentele de analiză ştiinţifică şi înţelegerea bazată pe experienţă care a permis utilizarea acestor instrumente, permit clasificarea selectivă şi aplicarea adecvată a acestor cunoştinţe de o manieră care să extindă capacităţile terapeutice ale plantelor vizate (Briskin, 2000; World Health Organization Monographs, 1999). Revenirea la fitoterapie reprezintă mai mult decât simpla utilizare a unor "ierburi" în tratamentul unor afecţiuni, fiind bazate pe sute de ani de experienţă umană şi observaţie, uneori aplicarea acesteia în lumea animală. Conform datelor furnizate de OMS, aproximativ 80% din populaţia ţărilor în curs de dezvoltare utilizează fitoterapia tradiţională. Peste 25% din conţinutul farmacopeilor medicale este reprezentat de preparate pe bază de plante. Chiar în unele ţări dezvoltate, fitopreparatele sunt considerate parte a medicinei convenţionale şi nu ale medicinei alternative (Dattner, 2003). Tratamentele cu astfel de preparate acţionează asupra capacităţii de protecţie a organismelor faţă de boli de diferite origini, datorită combinaţiei de principii activi. Influenţa primară este exercitată asupra morfologiei organelor imunoformatoare a căror creştere în volum poate indica şi sporirea activităţii acestor organe.

Observând greutăţile bursei la puii maturi imunologic se poate vedea că ambele extracte inhibă creşterea, extractul de *Calendula* mai mult decât cel de *Echinacea*, în timp ce alcoolul acţionează stimulator, determinând valori apropiate de cele ale lotului martor. În cazul puilor imaturi imunologic, reactivitatea este modificată. Cele două extracte acţionează stimulator comparativ cu alcoolul.

Tabel 1. Greutatea absolută a bursei (grame) la puii de găină trataţi cu extracte vegetale (x±s)

Lot	Pui de 47 zile	Pui de 19 zile
I	1,648±0,612	5,1±1,802
II	1,916±0,278	5,14±0,980
III	2,766±1,763	4,03±1,009
IV	2,58±1,662	5,157±2,230

Lot I - tratat cu extract alcoolic de Calendula, Lot II - tratat cu extract alcoolic de Echinacea, Lot III - tratat cu alcool (martor solvent), Lot IV – lot martor mediu

Organele limfoide primare sunt mai receptive la principii activi din extracte (Jeurissen, 1993; Jeurissen şi col., 1993-1994), îndeosebi dacă administrarea acestora se face pe cale injectabilă. Efectele extractului de *Echinacea* sunt ceva mai intense decât cele ale extractului de *Calendula* (tabel 1).

Este incontestabilă semnificaţia determinării parametrilor de metabolism al celulelor sistemului imun. Orice perturbare a acestui metabolism poate duce la apariţia unor lacune serioase, uneori ireparabile la nivelul răspunsului imun şi ulterior la dezechilibrarea rezistenţei organismului faţă de îmbolnăviri. În acest context, studiul parametrilor de metabolism la păsările tratate cu extracte vegetale permite evaluarea influenţei compuşilor respectivi asupra unor caracteristici bazale.

Tabelul 2 însumează nivelele parametrilor metabolici determinaţi la puii maturi imunologic iar tabelul 3 reprezintă diferenţele procentuale dintre valorile constantelor biochimice obţinute la determinările din bursă la puii trataţi cu extractele de *Calendula, Echinacea* şi alcool faţă de cei martor de mediu.

Din tabele reiese că valori semnificative ale diferenţelor procentuale s-au obţinut pentru proteinele totale în cazul puilor trataţi cu alcool (–23,94; $p<0,001$). Diferenţa procentuală dintre glucoza din bursa puilor martor şi bursa puilor trataţi beneficiază de semnificaţie statistică la puii trataţi cu extract de *Echinacea* (+105,88; $p<0,001$) şi la puii trataţi cu alcool (+52,82; $p<0,01$).

Tabel 2. Parametri ai metabolismului bursal dozaţi pentru loturile experimentale de 47 zile ($x^- \pm s$)

LOT	*Calendula*	*Echinacea*	Alcool	Martor
QO_2	5,56 ± 0,82	3,72 ± 0,97	3,71 ± 1,72	3,61 ± 1,51
PT	172,35 ± 16,39	158,18 ± 2,77	115,84 ± 4,73	152,29 ± 6,59
G_z	0,22 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,17 ± 0,05
G	1,82 ± 0,20	2,00 ± 0,03	0,64 ± 0,11	0,95 ± 0,19
ARN	2,80 ± 0,51	3,90 ± 0,62	3,88 ± 0,53	2,21 ± 0,79
ADN	1,45 ± 0,20	1,97 ± 0,15	1,57 ± 0,13	1,82 ± 0,42

Legenda: QO_2 – respiraţia celulară PT – proteine totale, G_z - glucoză, G – glicogen, ARN – acid ribonucleic, ADN – acid dezoxiribonucleic

Diferenţa procentuală dintre valorile glicogenului este semnificativă la puii trataţi cu cele două extracte (Calendula $p<0,01$), (Echinacea $p<0,01$).

Tabel 3. Valori procentuale faţă de martor ale parametrilor biochimici ai bursei, la loturile de 47 zile ($x^- \pm s$)

LOT	*Calendula*	*Echinacea*	Alcool
QO_2	+54,01 NS	-24,66 NS	+2,77 NS
PT	+13,17 NS	-3,86 NS	-23,94 p<0,001
G_z	+29,41 NS	+105,88 p<0,001	+52,82 p<0,01
G	+ 91,57 p<0,01	+46 ,31 p<0,01	-32,64 NS
ARN	+26,69 NS	+76,47 NS	+75,56 NS
ADN	-30,33 NS	+8,24 NS	-13,74 NS

Legenda: QO_2 – respiraţia celulară PT – proteine totale, G_z - glucoză, G – glicogen, ARN – acid ribonucleic, ADN – acid dezoxiribonucleic

Tabelul 4 cuprinde valorile obţinute pentru indicatorii metabolici bursali la puii de 19 zile trataţi peroral. Din analiza tabelului se poate observa că ambele extracte acţionează stimulator asupra respiraţiei bursocitelor, comparativ cu martorul alcool dar nu şi cu martorul de mediu.

Tabel 4. Parametri ai metabolismului bursei la loturile puilor de 19 zile

LOT	*Calendula*	*Echinacea*	Alcool	Martor
QO_2	3,27 ± 1,04	3,43 ± 0,08	2,05 ± 0,19	5,42 ± 1,13
PT	146,87 ± 8,87	115,42 ± 4,14	160,48 ± 7,06	208,76 ± 20,69
G_z	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,078 ± 0,01	0,20 ± 0,09
G	1,11 ± 0,22	1,37 ± 0,29	0,92 ± 0,27	1,97 ± 0,21
ARN	1,32 ± 0,12	1,20 ± 0,10	1,99 ± 0,26	2,84 ± 0,67
ADN	0,50 ± 0,08	0,89 ± 0,02	1,22 ± 0,34	0,77 ± 0,10

Legenda: QO_2 – respiraţia celulară PT – proteine totale, G_z - glucoză, G – glicogen, ARN – acid ribonucleic, ADN – acid dezoxiribonucleic

Nivelele glucozei sunt scăzute de asemenea pentru ambele extracte. Glicogenul bursal creşte în urma tratamentului cu extractele studiate, mai mult pentru extractul de Echinacea, decât pentru cel de Calendula, comparativ cu martorul alcool.

Urmărind variaţiile procentuale în sens pozitiv sau negativ la puii imaturi imunologic (tabel 5), în comparaţie cu martorul, se poate observa o scădere a tuturor parametrilor investigaţi în cazul lotului tratat cu extract de Calendula, valoarea cea mai scăzută înregistrând-se pentru glucoză ($p<0,05$). Extractul de Echinacea are acelaşi efect, dar alcoolul scade semnificativ respiraţia celulară ($p<0,02$).

În cazul lotului tratat cu extract de Calendula**,** cu excepţia respiraţiei celulare, toate devierile de la nivelul martorului beneficiază de asigurare statistică, la praguri cuprinse între 0,01 şi 0,05, în timp ce pentru celelate două loturi, doar cate trei dintre parametri investigati beneficiază de asigurare statistică.

Tabel 5. Valori procentuale faţă de martor ale parametrilor biochimici ai bursei, la pui de 19 zile

LOT	*Calendula*	*Echinacea*	Alcool
QO_2	-36,67 NS	-36,72 NS	-62,16 p<0,02
PT	-26,64 p<0,02	-44,78 p<0,05	-23,12 p<0,05
G_z	-80,00 p<0,05	-80,00 p<0,05	-60,00 NS
G	-43,66 p<0,01	-30,46 NS	-53,30 p<0,01
ARN	-53,53 p<0,01	-57,75 p<0,01	-29,93 NS
ADN	-35,07p<0,05	+15,58 NS	+58,44 NS

Legenda: QO_2 – respiraţia celulară PT – proteine totale, G_z - glucoză, G – glicogen, ARN – acid ribonucleic, ADN – acid dezoxiribonucleic NS=nesemnificativ

Ţesutul bursal pare să fie mai sever afectat sub influenţa extractelor vegetale la puii de 19 zile, nici unul dintre extracte nereuşind să stimuleze indicatorii de metabolism la acest organ.

Încercările de obţinere a unor noi vaccinuri s-au focalizat în direcţia descoperirii unor adjuvanţi cât mai apropiaţi de natural, dar capabili să stimuleze răspunsul imun protector. Date fiind condiţiile de viaţă intensive în care sunt menţinuţi puii de găină şi care pot duce cu uşurinţă la instalarea unor germeni condiţionat patogeni, mecanismul primar pentru controlul bolilor este vaccinarea timpurie şi eficace. Cu toate acestea, numeroase vaccinuri care sunt introduse în tehnologia creşterii păsărilor asigură doar o imunitate de scurtă durată sau induc răspunsuri în anticorpi neuniforme. Utilizarea citokinelor ca imunomodulatori la animalele de fermă, în particular la pui, devine un deziderat posibil în urma aplicării tehnicilor de inginerie biologică. Astfel, stimularea o singură dată cu interferon gamma de pui şi administrarea de hematii de oaie facilitează răspunsul imun primar cât şi secundar (IgG), care a persistat un timp mai îndelungat decât în cazul administrării de hematii de oaie (HO) fără adjuvant, reducându-se concomitent doza de antigen de zece ori, dar menţinându-i-se acestuia eficacitatea (Lowenthal şi col., 1998). Nu doar IFN gamma ci şi IL-18 de pui are efecte de adjuvantare sporite pentru antigenele vaccinale, cum ar fi virusul bolii de Newcastle (Degen şi col., 2005), comparativ cu adjuvanţii clasici, ca de exemplu emulsiile apă- în –ulei (Jansen şi col., 2005). Vârsta la care se administrează antigenele este de asemenea importantă, astfel administrarea de HO după administrarea topică intrabursală induce răspunsuri diferite în anticorpi la pui de 2 zile şi la cei de patru săptămâni (Naukkarinen şi Hippelainen, 1989) .

În acest context, evaluarea funcţionalităţii bursale în elaborarea unui răspuns imun prin evaluarea creşterii în ggreutate a bursei şi determinarea parametrilor de metabolism ale acesteia în condiţiile aplicării unui tratament cu potenţiali imunomodulatori vegetali oferă informaţii legate de posibilitatea de a utiliza aceste substanţe pentru augumentarea protecţiei specifice.

Rezultatele acestui experiment sugerează efectele negative ale extractelor testate asupra greutăţii bursei la puii maturi imunologic, efectele fiind atenuate de imaturitatea imunologică, unde greutăţile bursale rămân în limitele întâlnite la martorul de mediu. Cu toate că modificările în greutate sunt negative la puii de 47 zile, metabolismul este influenţat pozitiv în comparaţie cu lotul martor, în special funcţia de depozit (glucoză, glicogen, proteine) în cazul extractului de Calendula şi depozit şi sinteză (glucoză, glicogen, proteine şi acizi nucleici) în cazul extractului de Echinacea. Reversul acestei situaţii este întâlnit în cazul puilor imaturi imunologic, unde greutatea aflată în limite normale este asociată cu o activitate metabolică mult mai slabă decât în cazul lotului martor de mediu.

CONCLUZII

Datele obţinute indică un potenţial de adjuvant imunometabolic al celor două extracte testate, dependent în sens pozitiv de starea de maturitate imunologică, mai pronunţat pentru extractul de *Calendula* decât pentru cel de *Echinacea*.

BIBLIOGRAFIE

1. Attele A.S., Wu J.A., Yuan C.S. – 1999 - Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. Biochem. Pharmacol 58: 1685–1693
2. Bauer R. – 2002 - New knowledge regarding the effect and effectiveness of Echinacea purpurea extracts]Wien Med Wochenschr.;152(15-16):407-11.
3. Berczi I., Bertok L., Chow D.A. – 2000 - Natural immunity and neuroimmune host defense., Ann NY Acad Sci.;917:248-57.
4. Briskin D. P.– 2000 - Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health, Plant Physiology, , Vol. 124, pp. 507–514
5. Dattner A.M. -2003 - From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future Dermatologic Therapy, Vol. 16, 106–113
6. Degen W.G., van Zuilekom H.I., Scholtes N.C., van Daal N., Schijns V.E. - 2005 - Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). Vaccine;23(33):4212-8.
7. Dewick P.M. - 1997- Medicinal Natural Products. John Wiley & Sons, West Sussex
8. Jansen T., Hofmans M.P., Theelen M.J., Schijns V.E. – 2005 - Structure-activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses. Vaccine.;23(8):1053-60.
9. Jeurissen S.H. – 1993 - The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response, Immunology, 80(1):29-33.
10. Jeurissen S.H., Vervelde L., Janse, E. M. - 1993-1994 - Structure and function of lymphoid tissues of the chicken, Poultry Sci. Rev., 5(3): 183-207
11. Kaufman P.B., Cseke L.J., Warber S., Duke J.A., Brielmann H.L. –1999- Natural Products from Plants. CRC Press, Boca Raton, FL
12. Lowenthal J.W., O'Neil T.E., Broadway M., Strom A.D., Digby M.R., Andrew M. York J.J. – 1998 - Coadministration of IFN-gamma enhances antibody responses in chickens. J Interferon Cytokine Res.;18(8):617-22.
13. Nahrstedt A., Butterwick V. – 1997 - Biologically active and other chemical constituents of the herb of Hypericum perforatum L. Pharmacopsychiatry 30: 129–134
14. Naukkarinen A., Hippelainen M. – 1989 - Effects of antigen and antigen concentration on serum antibody titres in chickens primed per bursam. APMIS.;97(9):793-7.
15. Percival, S.S. - 2000 - Use of Echinacea in medicine, Biochem Pharmacol., 60:2 155-8 Clark A.M. - 1996 - Natural products as a resource for new drugs, Pharm.res., 13:1133-44.
16. Răpuntean, Gh. – 1996 – Imunologie şi imunopatologie, Ed. Genesis, Cluj-Napoca
17. Schulz V., Ha¨nsel R., Tyler V. -1998- Rational Phytotherapy: A Physician's Guide to Herbal Medicine. Springer- Verlag, Berlin
18. *** World Health Organization Monographs on Selected Medicinal Plants, Vol 1. – 1999 - World Health Organization, Geneva

CORELAŢII MORFO-FUNCŢIONALE LA NIVELUL TIMUSULUI PUILOR DE GĂINĂ TRATAŢI CU EXTRACTE VEGETALE

MORFOFUNCTIONAL CORRELATIONS ON CHICKENS THYMUS AFTER TREATMENT WITH VEGETAL EXTRACTS

SPINU MARINA, GIURGEA RODICA, SANDRU CARMEN DANA, BRUDASCA F., NICULAE MIHAELA, CADAR D., KOBOLKUTI L., SZAKACS BIANCA
Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară
Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca
marinaspinu@yahoo.com

The purpose of this paper was to determine the influence of several vegetal extracts on the thymus growth, its metabolic parameters in connection with the in vitro cell-mediated immunity of immunologically mature chickens.

The chickens (n=28), divided into four groups, were treated orraly with: Calendula officinalis(I) , Echinacea angustifolia (II), 70^{o} alcohol (III) and saline (IV), 0.5 ml/bird for 7 days. Blood samples were taken on day = and day 14 and were subjected to blast transformation test in RPMI 1640 culture medium, incubated for 48 hours at 37 degrees and glcose consumption was calculated. At the end of the experiment, thymus was collected weighed and metabolic parameters (nucleic acids, glucose, respiratory burst, glycogen, total proteins) were quantified.

The treatment with the Calendula extract decreased the thymus weight compared to the Echinacea extract. Both have in fact an inhibitory action, when compared to the control represented by alcohol. Glycogen reserves were increased in thymus by both The results of the first blastic transformation test revealed inhomogenous spontaneous blastization indexes, even though the chickens were not treated. Among the extracts used in vitro, the most efficient was the Echinacea purpurea extract, followed by the Echinacea angustifolia and the Symphytum officinale extracts.

At second blood sampling, the untreated batches exhibited a larger increase of the spontaneous blastization indexes compared to the treated ones. Augmented results are observed in all treated batches, even though the maximal values are encountered in the negative control group, where the cells were treated in vitro with the Echinacea purpurea extract. By comparing these results to those obtained by stimulation with alcohol, the differences plead for inhibition.

Active principles extracted by alcohol from Calendula officinalis and Echinacea angustifolia had moderate effects on thymus growth, based on energetic accumulations; nevertheless, these did not positively influnce the in vitro cell mediated responses under the experimental circumstances.

Key words: chickens, thymus, vegetal extracts, biochemical parameters, blast transformation

INTRODUCERE

O categorie particulară de compuşi utilizaţi în medicina preventivă clasică, având importanţă extremă, sunt adjuvanţii, incluzând în această grupă lărgită şi compuşii cu activitate imunomodulatoare, nu numai strict pe aceia aplicaţi în combinaţie cu vaccinurile microbiene. Prin utilizarea lor, există şansa de a restaura răspunsul imun chiar în cazul indivizilor care au reactivitate scăzută sau dimpotrivă, crescută. Astfel de situaţii sunt relativ frecvente în medicina veterinară, unde numeroase afecţiuni microbiene se soldează prin prejudicierea funcţionalităţii sistemului imun într-o direcţie sau alta. O mai buna înţelegere a receptorilor "Toll-like", a subpopulaţiilor de limfocite T neconvenţionale, a memoriei limfocitelor T şi B, a celulelor T reglatoare şi a imunităţii la nivelul mucoaselor are implicaţii profunde în abordarea modernă a obţinerii adjuvanţilor. Tot mai mult teren

câştigă adjuvanţii sintetici, care au drept ţintă molecule biologice (Burdin şi col., 2004), dar cu toate acestea caracterul de biodisponibilitate crescută rămâne unul dintre dezideratele importante urmărite (Percival, 2002).

Testările *in vitro*, efectuate îndeosebi pe componente izolate, în culturi de celule canceroase sau linii celulare, au demonstrat influenţa benefică pentru unele extracte vegetale, acestea diminuând stresul oxidativ, creşterea tumorală, efectele nocive ale unor compuşi activi de oxigen sau augmentând sinteza de citokine (Briskin, 2000) sau acţionând chiar antiviral (Kalvatchev şi col., 1997). Cultivarea leucocitelor din sângele circulant *in vitro*, în sisteme închise este extrem de convenabilă în scopul investigării efectelor unor compuşi asupra sistemului apărării celulare. Asociată cu determinările gravimetrice şi cele de metabolism, cultivarea leucocitelor poate furniza măsura efectului unor extracte vegetale nu numai asupra morfologiei ci şi asupra funcţionalităţii unor organe imune, în condiţii diferite de mediu. Transformarea blastică *in vitro* în prezenţa unor extracte vegetale, facilitează stabilirea dozei optime respectiv a compusului sau combinaţiei optime stimulatoare. Scopul acestui experiment a fost de a evalua modul în care sunt receptaţi principii activi din extractele alcoolice de *Calendula officinalis* şi *Echinacea angustifolia* la nivelul timusului şi posibilitatea utilizării acestora ca imunostimulatori ai răspunsului mediat celular.

MATERIALE ŞI METODE

Investigaţiile au fost efectuate pe pui de găină de 47 zile, maturi imunologic. Puii au fost repartizaţi în patru loturi a câte 7 păsări fiecare. Extractele vegetale respectiv alcoolul (solvent pentru extractele vegetale) şi serul fiziologic (efectul placebo) s-au administrat per os. Loturile din au fost numerotate de la I la IV şi au fost tratate astfel: lotul I - extract alcoolic din flori de *Calendula officinalis*, în cantitate de 0,5 ml/pui/zi; lotul II - extract alcoolic din flori *de Echinaceea angustifolia*, în cantitate de 0,5 ml/pui/zi; lotul III - alcool 70^{o} (martor solvent); lotul IV – ser fiziologic 0,5 ml/zi/pasăre (martor mediu).

La finele experimentului, păsările au fost sacrificate, recoltându-se probe din timus pentru estimări gravimetrice şi de metabolism. Astfel s-au determinat: respiraţia celulară (metoda Warburg), glucoza (colorimetrie), glicogenul (metoda Montgomery), acizii nucleici (metoda Spirin), proteinele totale (metoda Lowry). Datele au fost prelucrate statistic. În zilele 0 şi 14 au fost recoltate probe de sânge care au fost prelucrate prin testul de transformare blastică *in vitro*, diluând probele de sânge în proporţie de 1:4 cu mediu RPMI 1640 cu ser fetal de viţel 5% şi repartizând aceste probe în duplicat, în plăci cu 96 godeuri (200 microlitri/godeu). După o incubare de 48 ore la 37ºC, s-a determinat glucoza reziduală prin testul colorimetric cu orto-toluidină, citirea efectuându-se la 610 nm, d=1.

Valorile individuale obţinute pentru loturile experimentale au fost prelucrate statistic, testul t Student fiind utilizat pentru evaluarea semnificaţiei statistice.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Ţesutul limfoid reprezintă sediul pentru producerea, stocarea şi educarea limfocitelor, celule efectoare esenţiale ale răspunsului imun (Zarnea, 1990). Fiind concentrat din punct de vedere funcţional în organe limfoide a) primare sau centrale, care apar primele în evoluţia filogenetică (timusul şi bursa lui Fabricius) şi b) secundare sau periferice, reprezentate de splină, plăcile Peyer, amigdale, ţesuturi limfoide asociate diferitelor mucoase (GALT, BALT, DALT), foliculi difuzi (Yamamoto şi col., 1997).

În tabelul 1 sunt prezentate valorile obţinute prin gravimetria timusului la cele patru loturi experimentale. Se poate observa că ambele extracte administrate au efecte inhibitoare prin comparaţia cu tratamentul cu alcool, chiar dacă extractul de *Echinacea* induce o creştere în greutate faţă de matorul de mediu.

Tabel 1. Greutatea absolută a timusului (grame) la puii de găină trataţi cu extracte vegetale ($x^- \pm s$)

Lot	Timus
I	6,731±1,736
II	10,940±4,919
III	13,258±5,436
IV	7,442±1,831

Lot I - tratat cu extract alcoolic de Calendula, Lot II - tratat cu extract alcoolic de Echinacea, Lot III - tratat cu alcool (soluţie), Lot IV – lot martor, Stdev=deviaţia standard Var=varianţa

Urmărindu-se modul în care aceste greutăţi sunt relaţionate cu indicatorii metabolici determinaţi (tabel 2-3), se poate observa că tratamentul cu solvent alcool influenţează pozitiv majoritatea parametrilor, iar prin comparaţie extractele asigură creşteri în concentraţia proteinelor totale (extractul de Calendula) şi glicogenului (extractul de Echinacea mai mult decât cel de Calendula). Inhibiţia sintezei acizilor nucleici este mai redusă în prezenţa extractelor testate decât a alcoolui ingerat. Aceste variaţii sunt asigurate statistic la diferite praguri.

Tabel 2. Indicatori ai metabolismului timic la puii de găină de 47 zile trataţi per os cu extracte vegetale ($x^- \pm s$)

LOT	*Calendula*	*Echinacea*	Alcool	Martor
QO_2	3,39 ± 1,21	3,91 ± 0,72	8,17 ± 2,07	2,85 ± 0,39
PT	183,40 ± 14,60	153, 39 ± 7,56	157,37 ± 4,55	148,28 ± 9,98
G_z	0,17 ± 0,03	0,06 ± 0,004	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,01
G	2,65 ± 0,33	3,54 ± 0,65	1,62 ± 0,42	0,94 ± 0,21
ARN	5,27 ± 0,43	5,35 ± 0,53	4,94 ± 0,95	6,06 ± 0,73
ADN	1,57 ± 0,23	2,28 ± 0,11	2,12 ± 0,28	2,84 ± 0,26

Legenda: QO_2 – respiraţia celulară PT – proteine totale, G_z - glucoză, G – glicogen, ARN – acid ribonucleic, ADN – acid dezoxiribonucleic

Tabel 3. Variaţii procentuale faţă de martor ale indicilor de metabolism timic la puii de găină de 47 zile

LOT	*Calendula*	*Echinacea*	Alcool
QO_2	-36,64 NS	+37,19 NS	+186,66 p<0,01
PT	+23,68 p<0,05	+3,44 NS	+6,13 NS
G_z	+30,76 NS	-49,24 p<0,001	+46,15 p<0,01
G	+181,91 p<0,001	+276,59 p<0,001	+72,34 NS
ARN	-13,04 NS	-11,72 NS	-18,49 NS
ADN	-44,72 p<0,01	-19,75 p<0,05	-25,36 p=limită

Activitatea de blastizare a limfocitelor este influenţată de factorii de mediu dintre care fac parte şi compuşii înglobaţi în mediul de cultură. Testul de transformare blastică in vitro permite evaluarea eficienţei şi compararea eficacităţii unor astfel de compuşi. Rezultatele obţinute prin testarea capacităţii de blastizare *in vitro* (tabel 4-5) a celulelor provenite de la puii din loturile experimentale demonstrează un răspuns relativ similar al tuturor loturilor înainte de începerea tratamentului cu extracte. Reactivitatea la compuşii aplicaţi *in vitro* este redusă.

La ultima recoltare, indicii de blastizare spontană cresc mai mult la loturile netratate cu extracte decât la cele tratate. Reacţia la fitohemaglutinină este similară. Sporesc răspunsurile la extractele vegetale la toate loturile, totuşi cele maxime se întâlnesc la lotul martor, ale cărui celule au fost tratate *in vitro* cu extractul de *Echinacea purpurea*. Comparând aceste rezultate cu cele ale stimulării cu alcool, diferenţele pledează pentru inhibiţie. Testarea efectuată la finele experimentului indică o reducere a indicilor de blastizare spontană la loturile tratate cu extracte, la cel tratat cu

Echinacea mai mult decât la lotul tratat cu *Calendula*, cu toate că diferenţele nu sunt semnificative statistic.

Tabelul 4. Indici de stimulare în testul de transformare blastică la loturile experimentale recoltarea I ($x^- \pm s$)

	M	PHA	Al.	Cal.	Ar.	Sy.	E.ang.	E.pur.
Lot I	62,823± 10,584	58,12± 9,19	59,939± 11,294	56,168± 12,565*	45,476± 10,349	60,915± 11,453*	56,833± 10,415	52,441± 14,07
Lot II	62,823± 10,584	58,12± 9,19	59,939± 11,294	56,168± 12,565*	45,476± 10,349	60,915± 11,453	56,833± 10,415	52,441± 14,07
Lot III	65,662± 19,053	66,194± 14,802	65,174± 18,075	58,83± 15,393*	47,029± 20,409	65,085± 17,459*	67,481± 13,642	65,041± 15,359
Lot IV	63,562± 14,538	69,566± 7,461	63,873± 17,462	57,506± 14,602*	46,326± 10,828	61,647± 14,76*	62,32± 15,876	58,386± 20,342

M - martor, PHA - fitohemaglutinină, Al - alcool, Cal - extract alcoolic de Calendula, Ar - extract alcoolic de Arnica, Sy - extract alcoolic de Symphytum, Eang - extract alcoolic de Echinaceea angustifolia, Epur - extract alcoolic de E. purpureea

Tabelul 5. Indici de stimulare în testul de transformare blastică la loturile experimentale recoltarea II ($x^- \pm s$)

	M	PHA	Al.	Cal.	Ar.	Sy.	E.ang.	E.pur.
Lot I	52,483± 13,191	57,408± 8,21	53,237± 7,762	56,653± 6,825	22,136± 8,369	50,886± 4,484	51,995± 7,58	51,684± 8,81
Lot II	50,131± 13,767	53,148± 11,162	54,302± 9,841	49,377± 6,847	29,501± 5,274	50,516± 12,286	54,864± 7,765	49,015± 9,883
Lot III	58,117± 12,137	63,663± 10,809	59,271± 9,617	55,189± 11,242	24,043± 3,883	52,305± 8,66	55,278± 8,059	51,595± 7,874
Lot IV	60,868± 9,286	63,264± 6,449	62,732± 10,67	56,831± 15,934	28,081± 8,254	52,217± 10,952	51,595± 15,699	58,517± 7,645

Reactivitatea celulară este mai slabă la finele experimentului la toate loturile, cu toate acestea tre'atamentul cu extract alcoolic de *Calendula* pare să exercite efecte pozitive mai numeroase asupra tratamentelor efectuate *in vitro* decât cel de *Echinacea.* Aceste rezultate sunt oarecum dependente de acumulările de proteine totale şi glicogen determinate de tratamentul cu extract de *Calendula* la nivelul timusului.

Sistemul imun al puilor de găină a oferit un model de lucru ideal pentru investigaţii în domeniul imunităţii mamiferelor. În particular, controlul migraţiei şi supravieţuirii limfocitelor reprezintă cheia dezvoltării imune. Cu toate că problemele sunt diferite în funcţie de clasă, soluţiile sunt nu rareori similare (Funk şi col., 1997). Limfocitele T CD4+ alfa beta au un rol central în sistemul imun aviar, activarea lor fiind premergătoare pentru răspunsurile altor celule, incluzând limfocitele T gamma delta (Arstila, 1996). Extractul de *Echinacea* conţinând fracţiuni polizaharidice pare să stimuleze preferenţial leucocitele mononucleare (limfocite, monocite) (Bauer, 2002). Stabilirea unei relaţii între creşterea în volum a timusului, în relaţie cu parametrii ai metabolismului timic şi funcţionalitatea celulelor timo-dependente din circulaţie este utilă în evaluarea calităţii de adjuvant a unor extracte vegetale.

CONCLUZII

Principii activi izolaţi din *Calendula officinalis* şi *Echinacea angustifolia*, plante cunoscute pentru efectele lor terapeutice şi imunostimulatoare, au efecte moderate asupra creşterii în volum a timusului, pe baza acumulării de depozite cu rol energetic, care însă nu infuenţează net pozitiv răspunsul celular *in vitro* în condiţiile experimentale aplicate.

BIBLIOGRAFIE

1. Arstila, T. P. – 1996 - T cell subsets and the activation of gamma delta T cells, Current Topics In Microbiology and Immunology ,Volume 212 , Pages 71-77
2. Bauer R. – 2002 - New knowledge regarding the effect and effectiveness of Echinacea purpurea extracts]Wien Med Wochenschr.;152(15-16):407-11.
3. Briskin D. P.– 2000 - Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health, Plant Physiology, , Vol. 124, pp. 507–514
4. Burdin N, Guy B, Moingeon P. -2004 -Immunological foundations to the quest for new vaccine adjuvants. BioDrugs.;18 (2):79-93.
5. Funk P.E., Thompson C.B. – 1996 – Current concepts in chicken B cell development, Current Topics in Microbiol. & Immunol., 212:17-28
6. Kalvatchev, Z., Walder, R., Garzaro, D. – 1997 – Anti-HIV activity of extracts from Calendula officinalis flowers, Biomed. Pharmacother. 51(4):176-80
7. Percival, S.S. - 2000 - Use of Echinacea in medicine, Biochem Pharmacol., 60:2 155-8.
8. Yamamoto H., Watanabe M., Mikani T. – 1977 – Distribution of immunoglobulin and secretory component containing cells in chickens, Am. J. Vet. Res.;38(8):1227-30
9. Zarnea G. – 1990 – Tratat de microbiologie generală, vol.IV – Imunologie,Ed.Acad.Române, p.391-406; pag. 783-790

NIVELUL TITRELOR DE ANTICORPI ŞI INDEXUL BURSEI FABRICIUS LA PUII VACCINAŢI CONTRA BURSITEI INFECŢIOASE CU TULPINELE BG, WINTERFIELD 2512 ŞI D-78

ANTIBODIES CONCENTRATION AND FABRICIUS BURSA INDEX IN CHICKENS AFTER IMMUNIZATION WITH STRAINS WINTERFIELD 2512 AND D-78

STARCIUC N., SPATARU T., SCUTARU I., OSADCI NATALIA
Facultatea de Medicină Veterinară, UASM

The present paper approaches the methods of immunization chicken against infectious bursitis using the intermediate and hot strains vaccines. In this studies was investigate immunological efficacy and modification of bursa of Fabricius index after vaccination with Winterfiel 2512, D-78, and BG vaccine strains which was administrated with drenching water. The better immunological effect was obtained on the group of the chicken which was vaccinated with hot strains BG and intermediate D-78.

Key words: bursa of Fabricius, intermediate strains, hot strains, immunization.

Una dintre cele mai mari provocari ale ultimilor decenii pentru avicultura din republica a fost şi continua sa fie bursita infecţioasă aviară. Transformarile structurale pe care le-a suferit industria cresterii pasarilor în aciastă perioadă nu a simplificat definitiv aceasta problema.

Bursita Infectioasa contribuie în continuare la cresterea cheltuielilor sau a pierderilor avicultorilor prin procentul de mortalitate crescut, prin morbiditatea ce afecteaza indicatorii de productivitate si prin necesitatea de a investi serios in masuri de profilaxie specifica.

Bursita infecţioasă aviară este o boală infecto-contagioasă care afectează puii de găină în primele săptămâni de viaţă, caracterizată clinic cu agravarea stării generale, diaree cu mase fecale surii-cretacee, aglomerări la sursele de căldură, decubit prelungit, iar morfopatologic se caracterizează cu inflamaţia bursei Fabricius, hemoragii pe musculatura scheletică şi nefrozo-nefrită.

Pînă la momentul actual nu există o schemă stabilă de vaccinare a puilor contra bursitei infecţioase. Necătînd la prezenţa unei game mari de diferire tulpini vaccinale care se utilizează in profivaxia bolii, frecvent au loc cazuri de apariţie a bolii pe fonul imun, sau are loc intretuperea imunităţii.

Scopul acestui studiu a fost de a stabili nivelul titrelor de anticorpi postvaccinali şi indexul bursei Fabricius la puii vaccinaţi contra bursitei infecţioase cu vaccinuri din tulpini intermediare şi fierbinţi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Investigaţiile au fost efectuate pe puii de găină liberi de titre de anticorpi maternali specifici virusului bursei infecţioase.

Până la administrarea vaccinului 5 capete de pui au fost sacrificate pentru a aprecia indexul bursei Fabricius şi a confirma lipsa titrelor de anticorpi pasivi.

Au fost formate 4 grupe de pui a câte 25 capete în fiecare, care au fost întreţinuţi în condiţii analogice de întreţinere şi alimentaţie şi care au fost vaccinaţi la vîrsta de 15 zile.

Puii din I-a grupă au servit ca lot martor;

Puii din grupă a II-a au fost vaccinaţi o dată cu tulpina vaccinală „BG";

Puii din grupă a III-a au fost vaccinati o dată cu tulpina vaccinală „Winterfield 2512";

Puii din grupă a IV-a au fost vaccinaţi cu tulpina vaccinală „D-78" o dată.

La 10, 20, 35 şi 50 de zile după vaccinare, din fiecare grupă au fost sacrificaţi câte 5 capete de pui de la care s-a recoltat serul sanguin pentru examenul serologic şi bursele Fabricius pentru aprecierea indexului bursei Fabricius.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sunt prezentate rezultatele investigaţiilor serologice. Titre de anticorpi pasivi în serul sanguin la puii din grupa lot martor nu sa-u depistat.

În grupa a doua, unde puii au fost vaccinaţi cu tulpina intermediară „Winterfield 2512" , la a 10-a zi după vaccinare, titrele de anticorpi au constituit 2 şi1 simboluri „+" în diluţia serului 1:50 şi în diluţia serului 1:100.

La a 20-a zi după vaccinare nivelul titrelor de anticorpi a constituit respectiv 2 şi 2 simboluri „+" . La a 35-a zi după vaccinare nivelul titrelor de anticorpi a constituit 3 şi 2 simboluri "+" , iar la a 50-a zi acest indice a constituit 2 şi 1 simboluri „+" respectiv.

La puii care au fost vaccinaţi cu tulpina „BG" şi "D-78", la toate perioadele de examinare, nivelul titrelir de anticorpi au variat la acelaşi nivel.

La a 10-a zi după vaccinare titrele de anticorpi au constituit 2 şi 1 simboluri „+", la a 20-a şi 35-a zi după vaccinare acest indice a constituit 3 şi 2 simboluri "+" , iar la a 50-a zi după vaccinare nivelul titrelor de anticorpi a constituit 3 şi 1 simboluri „+" respectiv, în diluţia serului 1:50 şi 1:100.

Tabela 1
Nivelul titrelor de anticorpi postvaccinali

Nr. grupei	Nr de capete	Vîrsta puilor vaccinaţi (zile)	Tulpina vaccinală	Diluţia serului	Titre de anticorpi postvaccinali (zile)			
					10	20	35	50
I	25	15	Lot martor	1:50/ 1:100	-	-	-	-
II	25	15	„Winterfield 2512"	1:50/ 1:100	+ /+	++/++	+++/++	++/ +
III	25	15	„BG"	1:50/ 1:100	++ / +	+++/++	+++ / ++	+++ / +
IV	25	15	„D-78"	1:50/ 1:100	+ +/+	++ +/+ +	+++/++	+++/+

Paralel cu investigaţiile serologice la puii sacrificaţi sa apreciat greutatea corporală a puilor şi a bursei Fabricius pentru stabilirea indexului bursei Fabricius.

Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în tabela Nr 2.

Tabela 2
Investigaţii referitor indexului bursei Fabricius

Nr. grupei	Nr de capete	Vârsta puilor vaccinaţi (zile)	Tulpina vaccinală	Indexul bursei Fabricius (zile)				
				Până la vaciinare	10	20	35	50
I	25	15	Lot martor	3,1	2,9	3,1	3,5	3,7
II	25	15	„Winterfield 2512"	3,0	2,6	1,8	1,35	0,8
III	25	15	„BG"	2,8	3,1	2,0	1,6	1,2
IV	25	15	"D-78"	3,2	3,0	1,9	1,7	1,0

Indexul bursei Fabricius până la vaccinarea puilor în toate 4 grupe de pui a variat în raportul de 3,2 – 2,8. Pe parcursul perioadei de examinare în grupa puilor lot martor indexul bursei a constituit 2,9; 3,1; 3,5 şi 3,7 respectiv la vârsta de 10, 20, 35 şi 50 zile.

În grupa puilor vaccinaţi cu tulpina „Winterfield 2512" la vârsta de 15 zile, indexul bursei Fabricius a fost egal cu 2,6 la a 10 zi după vaccinare, micşorându-se pînă la 1,8; 1,35; 0,8 la a 20-a, 35-a şi 50-a zi după vaccinare.

La puii din grupa unde au fost vaccinaţi cu tulpina „BG", indexul bursei Fabricius a constituit 3,1; 2,0; 1,6 şi 1,2 respectiv la 10, 20 35 şi 50 de zile după vaccinare.

În grupa puilor vaccinaţi o dată la vîrsta de 15 zile cu vaccinul din tulpina fierbinte

„D -78" indexul bursei fabricius a fost egal cu 3,0; 1,9; 1,7 şi 1,0 respectiv la 10, 20, 35 şi 50 de zile după vaccinar.

CONCLUZII

1.Administrarea vaccinurilor din tulpinile intermediare - Winterfield 2512, D-78 şi a vaccinului din tulpina fierbinte BG cu apă de băut,o dată, la vîrsta de 15 zile asigură o creştere satisfăcătoare a titrelor de anticorpi postvaccinali.

2. Titre de anticorpi mai înalte au fost obţinute la grupele puilor vaccinaţi cu tulpina intermediară D-78 şi tulpina fierbinte BG.

3. Indexul bursei Fabticius este un criteriu important în aprecierea nivelului reacţiei ţesutului limfoid şi se modifică în funcţie de vîrstă, acţiunea virotică sau a tulpinilor vaccinale administrate.

4.La pui în primele zile de viaţă indexul bursei Fabricius este mai mare comparativ cu cel al puilor vaccinaţi contra bursitei infecţioase şi care se schimbă contrariu după vaccinarea puilor contra bursitei infecţioase.

5. Mai mare indicele bursei Fabricius a fost stabilit în grupele puilor care au fost vaccinaţi cu tulpina fierbinre„BG, ce se datorează acţiunii reactogenă a tulpinilor vaccinale fierbinţi.

BIBLIOGRAFIE

1. Aleksejuniene, I.; Aleksejunas, A.; Mockeliuniene, V.; Silkunaite, J. Serological monitoring of the efficacy of vaccination against infectuous bursal disease virus. Kaunas, Lithuania, Veterinarija i Zootechnica, 2005; (30), p. 5-8.
2. Azzam, A.H.; Youseif, H.M.; Ahmed, E.K. Prevalence of Gumboro disease in vaccinated and nonvaccinated village chickens in Egypt. Vienna, Austria, International Atomic Energy Agency Technical Documents IAEA TECDOCs, 2006; (1489), p. 67-74.
3. Banda, A.; Villegas, P.; Purvis, L.B.; Perozo, F. Protection conferred by coarse spray vaccination against challenge with infectious bursal disease virus in commercial broilers. Athens, USA: Avian-Diseases, 2008; 52(2), p. 297-301.
4. Gupta, A.; Sharma, P.C. Clinic pathological and serological characterization of two Indian field isolates of infectious bursal disease virus. International Journal of Poultry Science, Faisalabad, Pakistan: 2005; 4(6), p. 408-413.
5. Sadzadeh, A.; Peighambari, S.M.; Shojadoost, B. Immunosuppresive effects of an infectuous bursal disease – immune complex vaccine in broilers. Indian Veterinary Journal, Chennai, India: 2007; 84(1), p. 6-9.

CERCETĂRI PRIVIND VACCINAREA CU VACCIN VIU NOBILIS MG 6/85 ,CONTRA MICOPLASMOZEI RESPIRATORIE AVIARE ÎN EFECTIVE DE TINERET DE REPRODUCȚIE RASE GRELE

RESEARCH REGARDING USE OF LIVE NOBILIS 6/85 VACCINE AGAINST RESPIRATORY AVIAN MYCOPLASMOSIS IN BREEDING FLOCKS

STREJA ADRIANA[1], AVRAM EUGENIA[2], MIHAILA S.[3], CARP CARARE M.[4]
[1]DSVSA BACĂU
[2]FMV „SPIRU HARET ” BUCUREŞTI
[3]AGRICOLA BACĂU DEP.AVICOLA
[4]FMV IAŞI

Research was done in different stages : 11 series of youth reproduction Ross 308 chicks were vaccined, using different tehniques.The first vaccination was done in chicks with the ages of: 41 or 14, or 30 days old, the second vaccination was done respectively at the age of : 100 or 90 or 120 days , respectivel.The vaccine was administrated in 4 different ways :

- *both eye vaccinations ;*
- *both oculo-nasal vaccinations(one drop in the eye and one drop in the nasal cavity);*
- *first oculo-nasal vaccination , second aerosol vaccination;*
- *both aerosol vaccinations.*

The tests for immuno-response from the vaccinated batches of poultry ,were done by R.S.A.R., ELISA, P.C.R. Also clinic and anatomo-pathologic monitorisations, embrio-tests in hatchery, were made to distinguish the most efficient way for vaccine administration, as wel as the optimal vaccination age for the disease eradication.The tehnical parameters of the vaccinated youth reproduction flock as well as their offspring. Another research purpose was to determine if the vaccine strain was stable or not.

The investigations results showed that Nobilis MG 6/85 the live vaccine against avian respiratory micoplasmosys- is a secure and stable vaccine and that it is not passed down to the offspring.

This makes him useful not only for laying hens-light strains or hybrids, but also in the reproduction flocks of heavy strains, and he does not produce severe post-vaccine reactions. It was established that the most efficient administration way/route is by aerosols. In case of severe infection the possible vaccination age is begining with 14 days for the first vaccination and 90 days for the second vaccination.

Key words: mycoplasmosis, chickens, live vaccine Nobilis MG 6/85

Structurile sistemului imun sunt conectate în cadrul mecanismelor care acționează permanent şi răspund tuturor agenților potențiali patogeni prin elaborarea factorilor de apărare. Aceşti factori de apărare pot fi nespecifici, caracteristici rezistenței naturale a organismelor, sau specifici, caracteristici răspunsului imun adaptativ.

Mecanismele nespecifice de apărare sunt realizate cu participarea complementului, properdinei, lizozimului, leucocitelor polimorfonucleare, precum şi a numeroşilor mediatori moleculari secretați de celule.

Micoplasmele induc în organismul gazdei un răspuns imun mixt , celular şi umoral, componenta cea mai frecvent investigată a răspunsului imun până acum o reprezintă cea umorală. Diagnosticul indirect presupune folosirea testelor serologice pentru evidențierea anticorpilor antimicoplasma. În cercetarea efectuată s-a studiat şi efectul vaccinului asupra răspunsului imun. Astfel, imunitatea indusă prin vaccinare cu vaccinul viu Nobilis MG 6/85 este de tip celular. Vaccinul nu produce seroconversie, deci testele serologice permit efectuarea diferențierii între puii infectați cu

micoplasme sălbatice –care prezintă anticorpi antimicoplasma, faţă de cei vaccinaţi cu vaccin viu Nobilis MG 6/85 care nu au anticorpi în sânge.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate pe 11 serii de pui de găină, tineret de reproducţie rase grele Ross 308 totalizând un număr 557.000 pui.

Au fost vaccinaţi cu vaccinul Nobilis MG 6/85 utilizând mai multe căi de administrare a acestuia, la diferite vârste, menţionate în rezumat. În acest articol vom prezenta numai rezultatele obţinute în urma vaccinării prin aerosoli- ambele vaccinări.

Cu această schemă de vaccinare au fost vaccinate 4 serii de părinţi –pui de găină rase grele Ross 308.

Pentru prima dată în ţară, a fost efectuată vaccinarea contra micoplasmozei aviare la vârsta de 14 zile, în condiţiile în care producătorul de vaccin Intervet Olanda, recomandă, ca vârsta de vaccinare a păsărilor să nu fie sub 6 săptămâni.

Vaccinarea a-2-a, a puilor fost efectuată la vârsta de 90 de zile. Au fost testaţi serologic la o zi, la 14 zile, 43 de zile, 75 de zile, 105 zile, 130 de zile prin R.S.A.R, în laboratorul uzinal din SC Agricola Internaţional S.A Bacău. S-au testat câte 10 probe din fiecare hală, testându-se de fiecare dată câte 100 de probe.

De asemenea au fost testaţi serologic şi puii broiler obţinuţi din efectivele vaccinate, prin R.S.A.R şi ELISA, precum şi prin P.C.R., atât în laboratorul uzinal al S.C.Agricola Internaţional –Bacău cât şi întrun laborator neutru din Franţa: Laboratoire d´Analises de Biologie Veterinaire et de L´Enviroment –Bio Chene Vert.

Au fost efectuate testari serologice ELISA şi la Centrul de diagnostic - Institutul Pasteur Bucureşti.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analizând evoluţia răspunsului imun postvaccinal în ceea ce priveşte prezenţa anticorpilor specifici, se constată diferenţe importante de la un lot la altul.

Astfel, analizând comparativ dinamica anticorpilor antimicoplasma pe parcursul perioadelor experimentale este relevant că, la începutul periodei de vaccinare procentul anticorpilor prezenţi în sângele păsărilor testate, este mai mare la primele 2 loturi de părinţi, decât la loturile 3şi 4, ceea ce indică faptul că, păsările încă se mai infectează cu *Micoplasma gallisepticum*, tulpini sălbatice de teren, ştiut fiind că vaccinul viu folosit, nu produce anticorpi serici, acţionând împotriva infecţiei cu micoplasme prin blocajul receptorilor căilor respiratorii.

Analizând şi sub aspectul clinic, anatomopatologic şi al performanţelor tehnice, rezultatele obţinute la puii broileri obşinuţi din primele 2 loturi vaccinate sunt inferioare rezultatelor ultimelor 2 loturi, dar net superioare seriilor vaccinate anterior, la care a fost folosit acelaşi vaccin, dar la vârste de vaccinare şi căi de administrare diferite.

Prezentăm în tabelul nr.1, rezultatele testărilor serologice la puii vaccinaţi din ferma nr.2

La progenii obişnuţi din prima serie vaccinată încă mai erau prezente raluri umede, conjunctivite, mucozităţi cu caracter seros; anatomopatologic –congestii ale traheeei, uneori acoperită de exudat mucos.

Performanţele tehnice înregistrate au fost îmbunătăţite, comparativ cu seriile anterioare procentul de confiscate din abator scăzând cu 7.5 %.

Tabel nr.1

Rezultatele testărilor serologice prin R.S.A.R. , la părinţi de reproducţie

Nr. seriei	Nr. probe	La o zi	%	La 14 zile	%	La 43 zile	%	La 75 zile	%	La 103 zile	%	La 130 zile	%
Seria nr.1	100	Neg.	100	Neg.	100	Poz.	5	Poz.	7	Poz.	7	Poz.	10
Seria nr.2	100	Neg.	100	Neg.	100	Poz.	4	Poz.	7	Poz.	6	Poz.	6
Seria nr.3	100	Neg.	100	Neg.	100	Poz.	1	Poz.	2	Poz.	2	Poz.	2
Seria nr.4	100	Neg.	100	Neg.	100	Neg.	100	Neg.	100	Neg.	100	Neg.	100

La progenii obişnuţi din a doua serie vaccinată situaţia clinică a păsărilor a fost îmbunătăţită, arareori întâlnindu-se rinite sau conjunctivite ;congestiile traheale au fost prezente întrun procent de ≈ 1-2 %. Sporul mediu zilnic a crescut de la 52% la 54% ,FCR a fost de 1.9% faţă de 2% la seria anterioară.

Situaţia clinică,anatomopatologică ,performanţele tehnice şi rezultatele testărilor serologice şi imunologice au fost foarte bune după a 4 a serie vaccinată ,dispărând manifestările clinice complet, anatomopatologic nu au mai fost înregistrate leziuni specifice iar prin testele Elisa şi PCR nu au mai fost detectate păsări pozitive

Progenii au fost testaţi serologic ,în perioade diferite, la vârste diferite .Prezentăm rezultatele testelor în tabelul nr.2

Tabelul nr.2

Rezultatele testărilor serologice Mg prin ELISA , kit Biochek ,la progeni

Nr. crt.	Ferma	Nr . probe	Vârsta	Rezultatul				
				Titrul anticorpilor				Interpretare
				Media	CV	Min.	Max.	
1	F.13	10	46 de zile	111	129	8	479	negativ
2	F. 16	20	43 de zile	95	105	9	256	negativ
3	F. 17	10	0 zi	0	0	0	0	negativ
4	F. 23	10	7 zile	0	0	0	0	negativ
5	F. 9	10	14 zile	0	0	0	0	negativ
6	F. 14	10	21 de zile	0	0	0	0	negativ
7	F. 15	10	28 de zile	0	0	0	0	negativ
8	F.13	10	39 de zile	2	74	2	49	negativ
9	F.13	10	40 de zile	14	166	2	69	negativ
10	F.17	10	46 de zile	7	122	2	25	negativ
11	F.17	10	45 de zile	11	171	2	59	negativ
12	F.17	10	41 de zile	17	141	2	80	negativ

Legendă :
Media –media titrurilor
CV-coeficient de variabilitate
Min.-valoarea minimă
Max .-valoarea maximă

Interpretarea protocolului tehnic de testare

Titru > 667 rezultat pozitiv

Titru ≤ 667 rezultat negativ

După cum rezultă şi din tabel , testul Elisa pentru detectaţia anticorpilor antimicoplasma la puii broiler testaţi , la toate analizele este negativ. De asemenea nici la testele P.C.R efectuate la pui din probe de trahee , pulmon , saci aerieni , secreţii traheale nu au fost identificate micoplasme.

CONCLUZII

1. Vaccinul contra micoplasmozei respitatorie aviară Nobilis MG 6/85 a indus la păsările imunizate un răspuns imun celular , care persistă toată viaţa economică a păsărilor imunizate ,nemaifiind nevoie de vaccinări de întreţinere .
2. Vaccinul se poate efectua şi la rase grele în reproducţie sau selecţie deoarece tulpina vaccinală folosită este sigură ,stabilă şi nu se transmite pe verticală la progeni .
3. Pe baza datelor obţinute,recomandăm efectuarea vaccinarii la păsări în condiţii de risc crescut de infecţie , la vârsta de 14 zile .
4. Calea cea mai eficientă cale de imunizare este prin aerosoli .
5. Se poate obţine eradicarea bolii in efectivele de păsări ,prin vaccinare cu vaccin viu, într-o perioadă de 2-3 ani ,în funcţie de nivelul presiunii infecţioase locale existente , prin vaccinarea fiecărui lot de pui de reproducţie sau selecţie şi menţinerea măsurilor de biosecuritate în ferme ,staţii de incubaţie ,mijloace de transport .

BIBLIOGRAFIE

1. ABDELMOUMEN ,B.B.,ROY,R.S. -1995 ,Anenzyme – linked immunosorbent assay for detection of avian micoplasmas in culture . Avian Diseases 39:85-93.
2. BAUM ,S.G.,2005 – Introduction to Mycoplasma diseases .In :Mandell G.L, Bennett JE ,Dolin R,ed.Principles and Practice of infectious Diseases .Philadelphia ,Pa: Elsevier Churchill Livingstone,2269 - 71 .
3. BUONAVOGLIA, D., FASANELLA , A., SAGAZIO ,P., TEMPESTA ,M., IOVANE G., BUONAVOGLIA ,C., - 1998 , Persistence of antibodies to micoplasmas in vaccinated poultry ,Microbiologica 31: 119-121 .
4. CHU ,H.W., CAMPBELL ,J.A., RINO ,J.G.,2004 – Inhaled fluticasone propionate reduces concentration of Mycoplasma pneumoniae ,inflamation ,and bronchial hyperresponsiveness in lungs of mice . Infectious Diseases , 189 (6):1119-1123.
5. EUZEBY J.P.- Rev. Medicine veterinaire ,154 ,4, 259- 266 .
6. GRECO , G., CORRENTE , M., BUONAVOGLIA , D., ALIBERTI ,A ., FASANELLA ,A., BAUM S.G., 2005 – Introduction to Mycoplasma diseases .In : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R., eds. Principles and Practice of Infectious Diseases . Philadelphia , Pa :Elsevier Churchill Livingstone 2269-71 .

CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ŞI MORFOCLINICE, ÎNTR-UN FOCAR DE ECTIMĂ CONTAGIOASĂ LA CAPRE

MORPHOLOGIC, EPIDEMIOLOGIC AND MORPHOCLINIC ASPECTS FROM AN OUTBREAK ECTYMA CONTAGIOSUM IN GOATS

STRUGARU OANA RALUCA, VELESCU ELENA, RADU P. G.
FMV Iaşi
okytty@yahoo.comm

Orf virus (contagious ectyma), is a viral diseases of small and wild ruminants, humans and, frequently, other species. In goats, the diseases is characterized by the formation of th veziculo – proliferative lesions in the skin of lips and nostril. Here, a form of generalized orf in 23 goat kids from 3 different location, two in Iaşi and one in Botoşani . The disease affected the young goats from 2 to 4 months old, often lesions being localised in the animal`s mouth area, legs area and on the mamelon skin. Different then sheeps wich encountered the disease more frequently in the last two years, goats presents a higher sensibility for this virus.

Key words: Orf virus, contagious ectyma, goat

Ectima contagioasă este o boală infectocontagioasă a oilor şi caprelor, cu evoluţie acută produsă de un virus epiteliotrop, caracterizată clinic prin erupţie veziculo – pustuloasă, cu localizări predominant bucală, podale, genitale, mamare şi oculare.

Clinic boala evoluează supraacut la miei şi iezi, cu alterarea stării de sănătate, edemul botului, urmate de o erupţie veziculo – pustuloasă confluentă şi masivă, pe buze şi mucoasa bucală, cu adenopatie regională. Uneori din cauza extinderii leziunilor pe mucoasa respiratorie şi digestivă, apar simptome de bronhopneumonie sau enterită cu sfârşit letal în 36 – 40 de ore. Forma acută sau subacută este cel mai des întâlnită , cu localizări bucale şi peribucale şi în mai mică măsură podale, mamare, oculare, fără a afecta starea generală a animalului.

În prezenta lucrare se prezintă studiul epidemiologic şi morfoclinic efectuat la trei loturi de animale, identificate în judeţele Iaşi şi Botoşani.

MATERIALE ŞI METODE

Ancheta epidemiologică s-a realizat pe trei loturi de animale, două loturi provenind din judeţul Iaşi, comuna Leţcani, al treilea din jud.Botoşani, comuna Albeşti. În urma anchetei am constatat că proprietarii de animale din judeţul Iaşi, în perioada păşunatului ţineau animalele la comun, iar in timpul deplasărilor animalele treceau pe lângă o groapă de gunoi care poate fi considerată una din sursele principale ale infecţiei, având în vedere faptul că până acum doi ani nu s-au înregistrat îmbolnăviri cu ectimă contagioasă în zona Iaşului.

Cei mai sensibili au fost iezii, localizările cele mai frecvent întâlnite fiind cele bucale, peribucale şi intr-o mică măsură localizările mamară, podală şi oculară.

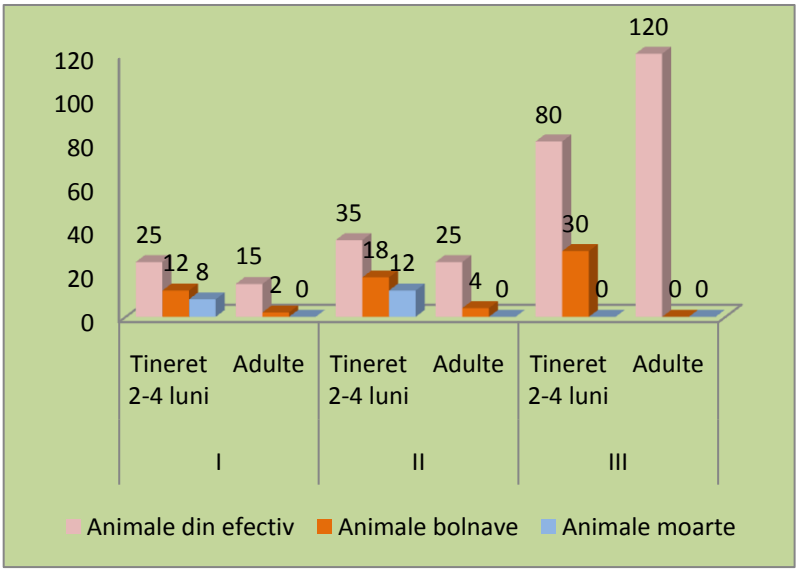
REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma anchetei epidemiologice, şi a examenului clinic dintr-un număr de 300 de capre, s-a înregistrat mortalitate la 50-60% din efectiv în special în rândul tineretului cu vârstă cuprinsă între 2 – 4 luni, (tabel 1). Adultele au prezentat o formă mai uşoară, localizarea mamară fiind cel mai adesea întâlnită la acestea, infectând iezii în timpul suptului.

Tabelul 1

Frecvența indicatorilor epidemilogici în ectima contagioasă a caprelor inregistrata la cele trei loturi

Nr. Lot	Categoria de animale	Nr. de animale din efectiv	Morbiditatea		Mortalitatea	
			Nr. de animale bolnave	%	Nr. de animale moarte	%
I	Tineret 2-4 luni	25	12	48	8	32
	Adulte	15	2	13,33	-	-
II	Tineret 2-4 luni	35	18	51,42	12	34,28
	Adulte	25	4	16	-	-
III	Tineret 2-4 luni	80	30	37,5	21	26,25
	Adulte	120	-	-	-	-
	Total	300	66	22	41	13,66



Graficul nr.2

Frecvența indicatorilor epidemilogici în ectima contagioasă a caprelor inregistrata la cele trei loturi

Din analiza epidemiologica a efectivelor studiate s-au observat urmatoarele evoluții:

- in primul lot alcătuit din 40 de animale s-au înregistrat un număr de 12 animale din categoria de vârsta 2-4 luni bolnave ceea ce reprezintă 48 %, din care au murit 8 indivizi ceea ce reprezintă 32 %, iar la categoria peste 1 an s-au îmbolnavit 2 animale (13,33 %), în această categorie neînregistrându-se animale moarte.
- în al doilea lot format din 60 de animale s-au întregistrat un număr de 18 cazuri din categoria de vârstă 2-4 luni ceea ce reprezintă 51,42% din care au murit 12 indivizi ceea ce reprezintă 34,28%; iar la categoria peste 1 an s-au îmbolnavit 4 animale (16%) cu mortalitate 0.
- în al treilea lot format din 200 de animale s-au îmbolnăvit un număr de 30 de indivizi din categoria 2-4 luni (37,5%) din care 21 dintre ei au murit ceea ce reprezintă 26,25 %.

Tabelul 2

Localizarea leziunilor la tineret (2-4 luni) în EC

Nr. lot	Nr. animale examinate	Animale bolnave		Localizarea leziunilor					
				Bucală (peribucală)		Mamară		Podală	
		Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
I	25	12	48	10	83,33	2	16,66	-	-
II	35	18	51,42	14	77,77	2	11,11	2	11,11
III	80	30	37,5	28	93,33	1	3,33	1	3.33

La iezi localizarea identificată a fost cea bucală, cu prezenţa modificărilor la nivelul buccelor, (fig. 1). La categoria de vârstă 2-4 luni a fost observată şi localizarea podală, (fig. 2).

Fig.1 Ectima contagioasă - localizarea bucală

Fig. 2 Ectima contagioasă - localizarea podală

Animalele adulte au manifestat o formă mai uşoară de infecţie, manifestând doar localizare mamară (fig. 3).

Fig. 3 Ectima contagioasă - localizarea mamară

De la animalele infectate şi cele suspecte au fost recoltate probe de sânge şi probe de ţesut (cruste). Probele de sânge au fost prelucrate în vederea obținerii serului şi în prezent sunt conservate la -20 C, urmând a se efectua screening serologic. Crustele şi probele de țesuturi sunt conservate la -80 C, în vederea izolării virusului.

CONCLUZII

În perioada 2008 – 2009, in urma anchetei epidemiologice şi examenelor clinice în ceea ce priveşte infecția cu virusul Orf se concluzionează următoarele:

1. Au fost afectate numai caprele, ele prezentând o sensibilitate mai crescută decât oile;
2. La tineret mortalitatea a fost mult mai crescută mai ales la cei cu vârstă cuprinsă între 2 – 4 luni, intr-o proporție de 28,86%;
3. La tineret cele mai frecvente localizări au fost cele bucale, peribucale, mai rar localizările mamară şi podală;
4. La adulte forma cea mai des întâlnită este cea mamară, ele fiind considerate purtătoare şi eliminatoare, iezii contaminându-se prin supt.

BIBLIOGRAFIE

1. Radu Moga Mînzat şi col.- Boli virotice şi prionice ale animalelor, Ed.Brumar, Timişoara, 2005
2. S.R.Palmer, Lord Soulsby, D.H.I. Simpson şi col. – Zoonoze , Ed.Ştiințelor Medicale, Bucureşti, 2005;
3. Tudor Perianu şi col. – Boli infecțioase ale animalelor, Viroze – Vol II, Ed.Casa de editură Venus, Iaşi, 2004;
4. The Merck Veterinary Manual – Ed.Merck &CO. INC, Eight Edition, Whitehouse Station, N.J., U.S.A, 1998

EVALUAREA COMPARATIVĂ A ACTIVITĂŢII IMUNE NESPECIFICE MEDIATE CELULAR LA BOVINE ŞI COPII BOLNAVI DE TUBERCULOZĂ

COMPARATIVE EVALUATION OF CELL MEDIATED IMMUNITY IN CATTLE AND CHILDREN WITH TUBERCULOSIS

SZAKACS BIANCA[1], SPINU MARINA [1], POP MONICA [2], SZAKACS A. R.[1], RINDT KRISZTINA [1], NICULAE MIHAELA [1]
1. USAMV, FMV Cluj – Napoca
2. Spitalul de pneumoftiziologie Leon Daniello Cluj Napoca
szakacsbianca@yahoo.com

Despite complex control and eradication strategies, tuberculosis still represents a health problem of considerable concern for both human and veterinary medicine. The present study, carried on 50 bovine and 23 children, intended to evaluate potential similarities of certain aspects regarding the possible connection between the tuberculinic immunity and the diagnosis of tuberculosis by monitoring some non specific immune parameters: total immunoglobuline levels, total leucocytes count (TLC) and circulating immune complexes (CIC). Bovine and human serum samples were colected and submitted to the following nephelometric tests: zinc sulphate turbidity assay for the total immuneglobulin concentration (Serb method) and the polyethylene glycol-PEG (modified Haskova method) precipitation technique in order to estimate the level of CIC. In tuberculin positive skin test individuals, both bovine and children, the statistical analysis of the results showed that there is no positive correlation between the total number of leucocytes and skin reactivity (p> 0,05). The results obtained for circulating immune complexes (CIC) suggested that their development depends on the skin reactivity, similarly to the variations observed for the total immunoglobulins, decreasing from positive skin test individuals towards the retesting category and negative skin tests. In children, these values were much lower when compared to bovine, probably due to the activation of the immune complexes clearance.

Key words: circulating immune complex, gammaglobuli, leukocytes, tuberculosis, immunity

Problemele teoretice şi practice pe care le ridică eradicarea, tuberculozei, atât la om cât şi la animale, sunt, fără indoială, mult mai complexe decât în cazul celorlalte boli infecţioase. În acest sens trebuie să avem în vedere o serie de particularităţi ale tuberculozei, legate pe de-o parte de complexitatea factorilor determinanţi economico-sociali, de reactivitatea modificată a organismului la diferite vârste, de cunoaşterea interrelaţiilor gazdă-bacil pe plan imunologic şi histopatologic, de modalităţile endo- şi exogene de infecţie, iar pe de altă parte, de lipsa unui vaccin care să ofere imunitate efectivă, de greutăţile de care se loveşte aplicarea unei chimioprofilaxii de masă, de caracterul cronic al bolii care nu permite izolarea pe întreaga perioadă de infecţiozitate a focarelor.

Evaluarea formulei leucocitare şi a numărului total de leucocite, stabilirea nivelului complexelor imune circulante, imunoblogulinelor totale permit conturarea profilului imunologic din punct de vedere al imunităţii nespecifice. Studiul a fost efectuat pe bovine şi copii bolnavi de tuberculoză plecând de la premiza că răspunsul imun în tuberculoză la bovine şi om este foarte asemănător (Nahid şi col, 2006).

MATERIALE ŞI METODE

Studiul s-a efectuat pe 5 eşantioane de bovine cu câte 10 bovine/eşantion provenite din gospodării particulare. Indivizii testaţi au aparţinut unor categorii diferite de vârsă, majoritatea animale adulte, vaci de lapte, cu stare de întreţinere în general bună. Testările au fost efectuate prin testului unic, apoi prin testul comparativ simultan. Prin coroborarea acestor rezultate s-a recurs la excluderea animalelor reacţionate, în diferite etape şi efectuarea de examenelor de laborator pentru confirmare.

De asemenea, investigaţiile s-au efectuat pe 23 de copii de vârste diferite cuprinse între 1,6 ani şi 17,9 ani. Copii au fost prezentaţi la consultaţie cu anamneză de sindrom respirator (tuse rebelă la tratament), scădere în greutate, slăbiciune musculară şi oboseală la efort. Examenul alergologic a fost efectuat la Spitalul de urgenţă, Clinica de Pneumologie Copii, Cluj-Napoca, pe parcursul unei perioade de 6 luni.

De la toţi indivizii luaţi în studiu s-au recoltat probe de sânge integral din care s-au determinat numărul total de leucocitele, s-au efectuat formulele leucocitare, iar apoi prin centrifugare s-a obţinut serul necesar dozării gammaglobulinelor totale (metoda cu precipitării cu sulfat de zinc - reactiv Serb) şi dozării complexelor imune circulante (precipitare cu polietilenglicol – PEG 4,2%).

Datele preliminare au fost prelucrate statistic utilizând testul t-student din cadrul programului GraphPad. Instat 3.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Numărarea leucocitelor totale şi efectuarea formulei leucocitare la bovine a scos în evidenţă faptul că nu există o corelaţie semnificativă între numărul total de leucocite şi reactivitatea cutanată (rP-R=0,413) (Flynn şi col., 2001) (tabel 1). De asemenea corelaţia între diferitele subpopulaţii şi numărul total de leucocite a fost diferită, în sensul că s-au înregistrat valori pozitive ale coeficientului r la neutrofile (N), eozinofile (E) şi bazofile (B) şi valori negative la limfocite (L) şi monocite(M) însă fără semnificaţie statistică (p>0,02). La copii rezultatele au fost cele scontate, în sensul absenţei unei corelaţii pozitive între IDR şi BK (pozitivitatea la infecţie) (rIDR+/BK+=0,324)(Pediatric Tuberculosis Collaborative Group, 2004). În ceea ce priveşte numărul total de leucocite şi subpopulaţiile leucocitare au avut valori corelative apropiate cu excepţia limfocitelor şi monocitelor însă tot nesemnificativ statistic (p>0,02) (tabel 2). Cu toate că în unele situaţii, simptomatologia, biochimia sângelui şi modelul evolutiv al pacientului sugerează tuberculoza, reacţia intradermică intensă nu a fost de fapt determinată de infecţia cu micobacterii şi reacţia organismului la acest microb, ci de situaţii particulare în care se aflau organismele testate (boală Hodgkin, bronşită trenantă – în care apare o imunosupresie consecutivă depăşirii pragului de reactivitate, etc.) (Răduţă, 2003).

Tabel 1- Valori ale leucocitelor totale şi subpopulaţiilor leucocitare (valori medii) la bovine

pozitive	Categoria de leucocite %					Nr. total leucocite
	N	E	B	L	M	
medii	27,6	2,7	2,25	61,4	7,7	8170
dev.std.	3,2	2,1	1,09	3,17	2,83	0,885
recontrol						
medii	26,7	1	1	62	8	9200
Dev.std.	2,9	1,1	1,06	2,29	1,98	0,823
negativ						
medii	31	2	1	64	4	7100
Dev.std.	2,9	1,01	2,0	1,7	1	0,800
rLt- %	0,190	0,186	0,320	-0,484	-0,016	

Tabel 2- Valori ale leucocitelor totale şi subpopulaţiilor leucocitare (valori medii) la copii

rIDR+/BK+	Categoria de leucocite %					**Nr. total leucocite**
	N	E	B	L	M	
medii	24,6	2,1	2,25	62	9,7	13.170
dev.std.	2,3	2,1	0,9	1,7	1,97	1,805
IDR-/BK+						
medii	23,7	1	2	66	7	9200
Dev.std.	3,6	2,1	1,08	1,29	2,88	0,864
IDR+/BK-						
medii	41	3	2	54	2	7100
Dev.std.	1,9	2,01	2,0	1,7	1,09	0,935
rLt- %	0,590	0,586	0,521	0,384	0,016	

Rezultatele obţinute în urma dozării imunoglobulinelor totale pentru serurile provenite de la animale din diferite categorii de reactivitate TCS, exprimate în unităţi de densitate optică, sunt prezentate în figura 1.

Urmărind rezultatele obţinute se poate observa că, deşi diferenţele nu sunt semnificative din punct de vedere statistic (p>0,05), concentraţiile serice ale gamaglobulinelor la animalele pozitive sunt mai mari decât valorile înregistrate la celelalte două loturi (recontrol şi negative), însă acest lucru nu demonstrează exclusivitatea intervenţiei infecţiei cu *Mycobacterium bovis* în apariţia acestui rezultat.

Nivelele serice ale complexelor imune circulante, obţinute la bovine sunt redate în figura 2.

Se observă că valorile obţinute la dozarea complexelor imune circulante nu se departajează net în ceea ce priveşte lotul pozitiv şi recontrol în timp ce la lotul negativ valorile sunt doar ceva mai mici. Cu toate acestea, evoluţia parametrului este similară cu cea a imunoglobulinelor.

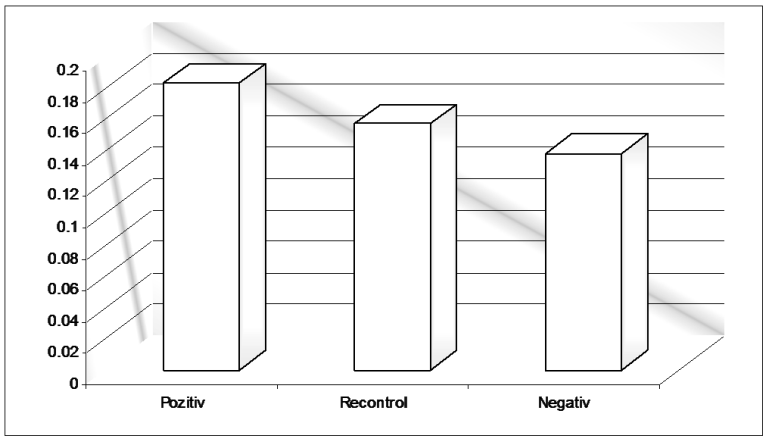


Fig.1 - Valori ale gammaglobulinelor totale (UDO) determinate pentru serurile provenite de la animale din diferite categorii de reactivitate TCS

În cazul infecţiei tuberculoase, datorită caracterului trenant al bolii şi a prezenţei antigenului în organism pentru o perioadă lungă de timp, am presupus că pot apărea complexe circulante în concentraţie mare şi că dozarea lor corelată cu testele de hipersensibilitate ar aduce un plus pentru diagnosticul pozitiv (Kenedy şi col, 2002).

Deoarece diferenţele dintre loturi sunt atât de mici este greu de conchis dacă infecţia tuberculoasă influenţează semnificativ formarea complexelor imune circulante. Totuşi, valorile mai mari, constant apărute la lotul pozitiv, sugerează această posibilitate.

Rezultatele obţinute la copii sunt prezentate în figurile 3 şi 4.

Urmărind rezultatele obţinute, la dozarea imunoglobulinelor (fig.3) se observă că, deşi diferenţele nu sunt semnificative din punct de vedere statistic (p>0,05), concentraţiile serice ale gamaglobulinelor la copii cu test intradermic negativ dar cu diagnostic confirmat de tuberculoză (IDR-,TB+) sunt mai crescute faţă de valorile concentraţiilor înregistrate la celelalte două categorii (IDR pozitiv – diagnostic confirmat de tuberculoză şi IDR pozitiv – fără diagnostic confirmat de tuberculoză).

Acest fapt sugerează că infecţia cu *M. tuberculosis* induce o creştere a nivelului imunoglobulinelor totale cu rol de opsonine, cu toate că funcţionalitatea acestora în patogeneza tuberculozei la pacienţii investigaţi nu a fost cuantificată.

Nu s-au constatat diferenţe între nivelele complexelor imune circulante la copii cu tuberculoza confirmată şi la cei infectati cu *Mycobacterium ssp.* Aceste rezultate indică probabil o sinteza activă de anticorpi în infectiile primare (Pediatric Tuberculosis Collaborative Group, 2004), unii dintre aceşti anticorpi putând fi legaţi de diferite antigene micobacteriene, ca etapă a răspunsului organismului gazdă (Starke şi col., 1997). Efectele contributive ale IgG complexat au fost mai pregnant observate la copiii cu boală tuberculoasă şi mai puţin la copiii cu infecţie tuberculoasă sau contacţi. Deoarece mediana vârstei copiilor cu TBC a fost semnificativ crescută comparativ cu celelalte două grupuri (infecţie respectiv contacţi), este important a se lua în considerare influenţa vârstei asupra nivelului de anticorpi (Simmoney şi col., 2000).

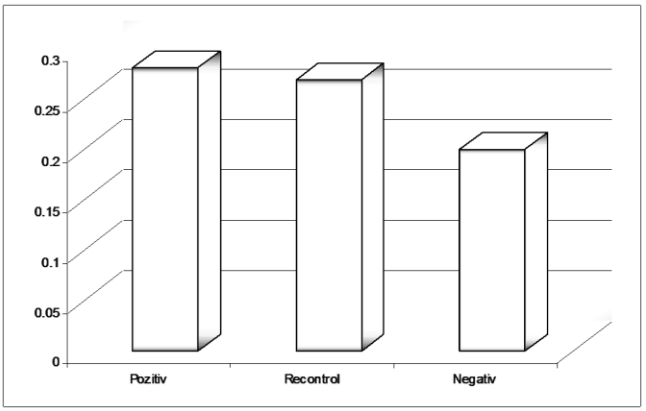


Fig.2 - Valori ale CIC (UDO) obţinute pe serurile provenite de la bovine din diferite categorii de reactivitate TCS

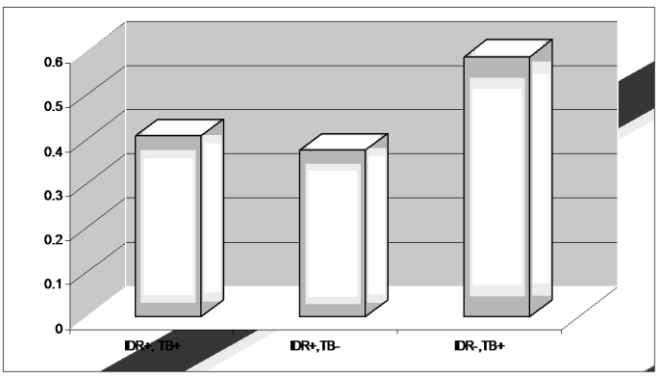


Fig.3 - Concentraţia imunoglobulinelor totale la toate cele trei categorii de copii

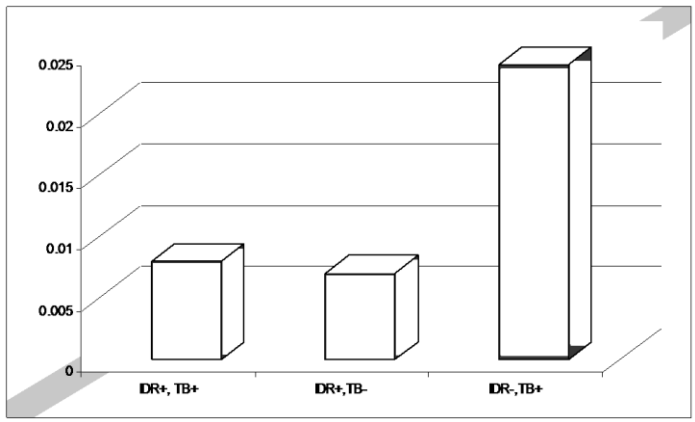


Fig. 4 - Concentraţia complexelor immune circulante la toate cele trei categorii de copii

Rezultatele obţinute sugerează că infecţia cu *M. tuberculosis* induce o creştere a nivelului imunoglobulinelor totale cu rol de opsonine, şi a complexelor imune circulante cu toate că funcţionalitatea acestora în patogeneza tuberculozei la organismele investigate nu a fost cuantificată. La copii, nivelele acestor parametri sunt mult diminuate comparativ cu bovinele, probabil datorită activării eliminării complexelor (N. Simonney, 2000).

CONCLUZII

Nu se poate estima reactivitatea celulară sistemică pe baza reacţiei intradermice chiar dacă există corelaţie pozitivă între cei 2 parametri aceasta nu este semnificativă statistic.

Valorile concentraţiilor gammaglobulinelor, a complexelor imune circulante nu demonstrează că infecţia cu *Mycobacterium ssp*. induce o creştere a acestora nici la bovine şi nici la copii.

BIBLIOGRAFIE

1. N. Simonney, A. Bourrillon, P.H Lagrange, 2000, The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Volume 4, Number 2, February, pp. 152-160(9);
2. Răduţă Mihaela, 2003, Ed. Medicală Universitară „Iuliu Haţieganu", Cluj Napoca, 1-7, 31-38, 63-67;
3. J.R. Starke, 1997, Annales Nestlé, 10-24, 55;
4. Pediatric Tuberculosis Collaborative Group, 2004, Targeted Tuberculin Skin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection in children and Adolescents., Vol 114, Nr. 4, October 1175-1198;
5. E.H.Kenedy, T.G. Byson, J.M. Pollock, 2002, Modulation of immune responses to Mmycobacterium Bovis in cattle deplated of WC1+1γand T cell. Infection and immunity, Vol. 70, no. 3, March, 1488-1500;
6. J. L. Flynn, J. Chan, 2001, Imunology of tuberculosis. Annu Rev. Immunol. 19:93-129;
7. P. Nahid, M. Pai, P. Hopewell, 2006, Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. Proc Am Thorac Soc 3 (1): 103-10. PMID 16493157.

REACTIVITATEA IMUNĂ SPECIFICĂ ANTI-MYCOBACTERIUM BOVIS MEDIATĂ CELULAR LA BOVINE REAGENTE

SPECIFIC CELL MEDIATED IMMUNE REACTIVITY AGAINST MYCOBACTERIUM BOVIS IN CATTLE

SZAKACS BIANCA, SPINU MARINA
SZAKACS A. R., RINDT KRISZTINA, NICULAE MIHAELA
USAMV, FMV Cluj – Napoca
szakacsbianca@yahoo.com

The study of the correlation between delayed type hypersensitivity and global immunity against tuberculosis (TB) is a basic problem in the immunology of TB. The objective of the investigation was to use a reaction based on lymphocytes sensitized to mycobacterial antigens, in order to study the correlations between delayed type hypersensitivity and immunity in tuberculosis. The blast transformation test was carried out by the method described by Pearmainet et all., based on the transformation of small lymphocytes into blast cells under the influence of M. bovis and M. avium. The experiment showed that there was no direct correlation between delayed type hypersensitivity and blast transformation of leukocytes.

Key words: blast transformation of leukocytes, delayed type hypersensitivity, tuberculosis

Infecţia tuberculoasă are o mare importanţă sanitară, fiind una din cele mai răspândite şi mai grave zoonoze. În prezent, în ţările industrializate, tuberculoza la bovine este eradicată sau este practic controlată, în timp ce, în cele mai multe ţări în curs de dezvoltare, boala s-a extins inclusiv în România (Vasiu, 2007). Măsurarea activării limfocitelor T şi/sau B în vitro reprezintă o metodă de apreciere a functionalităţii acestor celule în organismele animale. Cu toate că mediul de cultură creează condiţii artificiale şi procesele vitale sunt oarecum modificate faţă de cele care au loc în vivo, se consideră că rezultatele sunt extrapolabile (Liebanna şi col., 2001).

Experimentul a urmărit reactivitatea imună celulară *in vitro* la bovine reagente în prezenţa a trei tipuri de tuberculine şi modul în care aceasta s-a corelat cu intradermoreacţia, în scopul eficientizării diagnosticului pozitiv.

MATERIALE ŞI METODE

Studiul s-a efectuat pe 77 de bovine rasa Bălţată Românească, provenite din gospodării particulare. Identificarea animalelor reagente s-a efectuat prin metoda clasică de tuberculinare utilizând TU (testul unic), apoi TCS (testul comparativ simultan).

Sângele (0,7ml) a fost recoltat pe heparină (50U.I./ml) prin puncţia venei mamare, apoi diluat cu mediu RPMI 1640 (1:4) cu adaos de 5% ser fetal de viţel. Sângele astfel suspendat s-a repartizat în plăci sterile cu 96 godeuri, câte 200 μl/godeu. S-au efectuat mai multe variante experimentale: martor, netratată şi variante tratate cu PHA M, tuberculină umană, tuberculină bovină, tuberculină aviară; fiecare variantă, inclusiv martorul netratat, s-a testat în duplicat. După o incubare de 72 de ore, s-a determinat concentraţia de glucoză reziduală prin tehnica spectrofotometrică, prin fierberea supernatantelor în reactivul o-toluidină pe baie de apă la 100˚C timp de 8 minute şi citire la aparatul SUMAL PE2 la lungimea de undă de 610 nm, d=0,5 cm, în plăci cu 96 godeuri.

Toate rezultatele obţinute prin acest test au fost prelucrate statistic pentru a obţine valorile medii şi deviaţiile standard, folosind formulele uzuale ale calculului statistic. Semnificaţia diferenţelor a fost apreciată folosind testul t-Student.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele testului de transformare blastică la loturile experimentale se regăsesc în tabelele 1 şi 2.

Tabel nr. 1 - Indici de stimulare în testul de transformare blastică la loturile pozitive şi recontrol

Pozitive					
	M	**PHA**	**TU**	**TA**	**TB**
medii	76,634	98,664	71,779	92,966	70,803
dev.std	9,744	15,901	10,120	10,501	8,764
rP-IS	**0,315**	**0,812**	**0,908**	**0,399**	**0,918**
				Recontrol	
	M	PHA	TU	TA	TB
medii	76,925	84,214	79,972	88,587	81,590
dev.std	9,844	16,801	10,123	10,805	7,459
rRC-IS	**0,315**	**0,812**	**0,798**	**0,399**	**0,818**

rP-IS – indice de corelaţie animale pozitive –indice de stimulare blastică
rRC-IS- indice de corelaţie animale categoria recontrol- indice de stimulare blastică

Tabel nr.2 - Indici de stimulare în testul de transformare blastică la lotul negativ

	M	PHA	TU	TA	TB
medii	74,909	81,687	77,182	77,994	78,383
dev.std.	9,536	15,780	10,68	10,85	8,143
rN-IS	0,437	0,157	0,309	0,568	0,314

rN-IS- indice de corelaţie animale reacţionate negativ –indice de stimulare blastică

Urmărindu-se rezultatele obţinute în cadrul primei recoltari, se observă ca reactivitatea celulară spontană la animalele reacţionate pozitiv este scăzută faţă de media lotului de control, fară ca diferenţa să fie asigurată statistic (p>0,5). Datele se corelează cu cele din literatură, care susţin argumentarea răspunsului blastic limfocitar la animalele pozitive sau recontrol pentru reactivitatea cutanată (Orme, 2003). Se ştie de asemenea că, la animalele pozitive, există fluctuaţii ale imunităţii, aşa încât este posibil ca diferenţa redusă dintre lotul pozitiv şi recontrol a cărui valoare o depăşeşte pe prima, să fie dată de o astfel de situaţie (Liebana, 2001).

Reactivitatea la PHA se dovedeşte a fi cea mai intensă la animalul pozitiv, urmând in ordine media lotului recontrol şi apoi lotul negativ.

Răspunsurile la cele trei tipuri de tuberculină sunt variabile. Astfel prezenţa tuberculinei aviare stimulează limfocitele animalului pozitiv în cea mai mare măsură, în timp ce tuberculina bovină acţionează cu o intensitate maximă în probele provenite de la lotul în recontrol. Reactivitatea mai slabă faţă de tuberculina bovină, diminuată faţă de cea a lotului negativ poate fi indiciul unei obişnuinţe la animalele în organismul cărora bacteria reprezintă o „spină iritativă" pemanentă (Lyashchenko, 2004). Corelaţia rezultatelor obţinute în prezenţa TU şi TB a relevat că acestea sunt în relaţie pozitivă, cu valori foarte apropiate însă nesemnificative statistic(p>0,05).

Indicele de corelaţie este pozitiv in toate cazurile ceea ce inseamnă că din punct de vedere statistic există o corelaţie pozitivă între reactivitatea cutanată şi indicele de blastizare, testul de transformare blastică fiind unul specific. Faptul că întâlnim corealţie pozitivă la categoria N-IS poate însemna faptul ca reactivitatea negativă nu se datorează lipsei sensibilităţi ci poate fi atribuită unei stări de anergie în care se pot afla la un moment dat animalele chiar dacă prezentau infecţie cu micobacterii patogene. În aceste condiţii, animale pot constitui un real pericol pentru restul efectivului. Experimentul realizat poate constitui pe viitor un suport pentru introducerea sa în cadrul unor metode complementare de diagnostic în tuberculoza bovină.

CONCLUZII

Experimentul efectuat denotă că testul de transformare blastică pemite investigarea sensibilității la tuberculină in vitro, indicii de blastizare în prezența acesteia având valori pozitive.

Introducerea acestei metode complementare de diagnostic ar putea constitui un suport mai rațional şi mai fidel în ceea ce priveşte decizia de a îndruma la sacrificarea în abator a unui animal reagent la tuberculină, decât testele alergice privite la modul singular.

BIBLIOGRAFIE

1. K. Lyashchenko, A.O. Whelan, R. Greenwald, J.M. Pollock, P. Andersen, R.G. Hewinson, H.M.
2. Vordermeier, 2004, Infect Immun. 2004 May;72(5):2462-7.
3. E. Liebana, A. Aranaz, A. Mcnair, J.M. Pollock , 2001, Immunology, vol. 99(January), issue 1, page 23.
4. I.M. Orme, A.A. Izzo, 2004, J. Immunol. 169:6343-6352
5. C. Vasiu, 2007, Bacterioze, p.55.

CERCETĂRI PRIVIND CORELATIA DINTRE TESTUL ELISA ŞI CEL DE IMUNOFLUORESCENTĂ LA PORCII CU SINDROM REPRODUCTIV ŞI RESPIRATOR

RESEARCHES REGARDING CORRELATION OF ELISA ASSAY WITH THE IMMUNOFLUORESCENCE ONE IN PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (*PRRS*)

TANASE OANA IRINA, PAVLI C., PERIANU T.
FMV Iaşi, tanase_oana@yahoo.com

The serological determinations were done on samples gathered from farms with different epidemiologically situations. From 427 samples (samples harvested from different swine categories) 224 reacted positive (52,46%) and 203 were negative (47,54%). The results differ considering collecting moment, 100% negative before disease emergence, 66,87% after disease appearance. The results differs with age group, 100% negative in shows and youth in both farm A and B prior disease outburst, after infection were seropositive 75% of the shows in farm A and 92,5% weaned piglets from farm B. The serological exam, for epidemiological surveillance done on 1604 samples (selection farms) during years 2005-2006, shown only negative reactions, indifferent of age. Instead serological investigations using competitive enzymatic immune assay, on samples, from farms populated with import animals, same period, evidenced 678 positive reactions and 2882 negative one. From the researches can be appreciated the fact that competitive ELISA serological surveillance is more sensitive, and presents a more accurate specificity, so it is proper for serological surveillance.

*The immunofluorescence assay used to exam 245 samples evidenced 32 positive reactions (31.1%) and 213 negative one (86.9%). Presence of **PRRS** antibodies was evidenced in pregnant shows 25,5% (14 positive samples of 55), and in 70-80 days old youth in a percent of 22.5% (18 positive samples of 80).*

*Searching in parallel 81 samples using both methods reveals the fact that competitive enzymatic immune assay is more sensitive (71, 60%) than immunofluorescence assay (61,72%). These two methods can be used to diagnose **PRRS** because are sensitive and specific enough, demand a low quantity of reactive and allows a quick response.*

Key words: the competitive enzymatic immune assay (ELISA), the immunofluorescence assay, specificity, PRRS

Testul imunoenzimatic (ELISA) şi testul de imunofluorescenţă au fost şi sunt testele cel mai frecvent utilizate pentru decelarea anticorpilor virus **PRRS.**

Diagnosticul unei infecţii **PRRS** se realizează cel mai bine pe probe prelevate de la porcii din îngrăşătorii. Variabilitatea antigenică a tulpinilor de virus poate antrena erori de diagnostic. Deoarece tulpinile virale nord americane nu au fost semnalate în Europa, diagnosticul de confirmare a unei forme clinice de **PRRS** în Europa, ar trebui să includă şi un antigen de tip nord american, util mai ales dacă primele rezultate, obţinute cu un antigen de tip european, sunt negative.

Deoarece oricare ar fi testul utilizat, diagnosticul nu este viabil decât la nivel de efectiv, testele individuale putând conduce la erori de interpretare, ne-am propus a cerceta, pe aceleaşi probe de seruri, gradul de corelare a testelor imunoenzimatic – ELISA de competiţie şi de imunofluorescenţă.

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru a vedea care este gradul de corelaţie între testul imunoenzimatic - ELISA de competiţie şi testul de imunofluorescenţă s-au testat 81 de probe constituite de seruri provenite din unităţi de porcine în care sindromul respirator şi de reproducţie evolua enzootic (81 probe).

Probele de ser, privind prezenţa anticorpilor specifici, au fost testate atât prin testul imunoenzimatic ELISA, cât şi pri testul de imunofluorescenţă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute după examinarea probelor de ser prin cele două teste serologice sunt redate în ***tabelul 1*** şi ***fig. 1.***

Tabelul 1

Rezultatele obţinute prin testele imunoenzimatic ELISA şi imunofluorescenţă

Nr. probe analizate	Testele utilizate							
	ELISA				IF			
	Pozitiv		Negativ		Pozitiv		Negativ	
	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
81	58	71.6	23	28.4	50	61.72	31	38.28

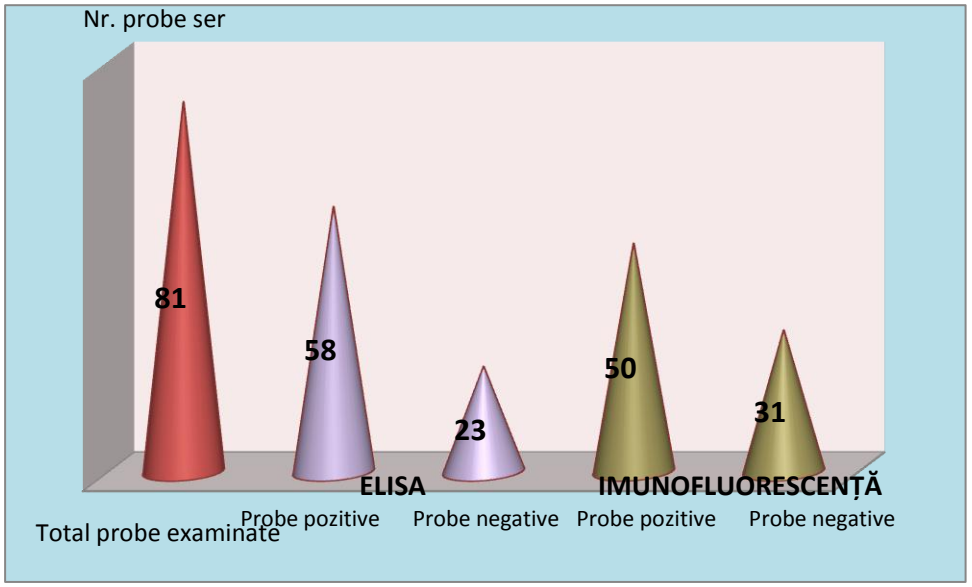


Fig. 1

Rezultatele obţinute prin testele imunoenzimatic ELISA şi imunofluorescenţă

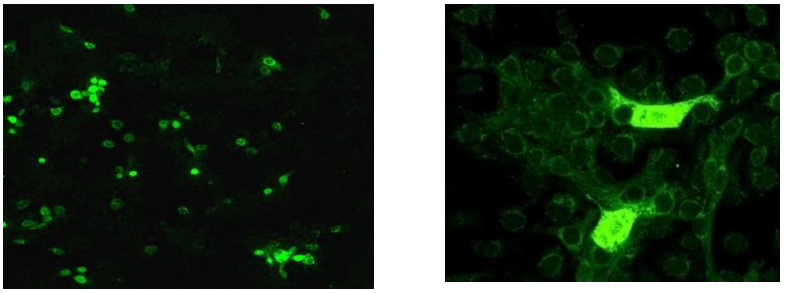


Fig. 2

Testul de imunofluorescenţă pozitiv, pe culturi celulare MARC-145

Din analiza rezultatelor obţinute se constată că acestea diferă în funcţie de testul utilizat. Astfel, cele 81 probe de ser examinate prin testul imunoenzimatic –ELISA de competiţie au reacţionat

pozitiv 58 ceea ce reprezintă 1,60%, iar 23 (28,4%) serurori au fost negative. La testul de imunofluorescenţă, din cele 81 seruri examinate, numai 50 au au reacţionat pozitiv, (fig. 2) reprezentând 61,72%, iar 31 (38,28%) au fost seronegative.

De asemenea, din analiza rezultatelor se poate observa că, testul imunoenzimatic - ELISA de competiţie este mai sensibil decât testul de imunofluorescenţă, deşi este mai rar utilizat pentru titrarea anticorpilor, deoarece titrurile nu au o corespondenţă lineară (direct proporţională) cu concentraţiile anticorpilor.

Examinând serurile seropozitive la testul imunoenzimatic - ELISA de competiţie şi prin testul de imunofluorescenţă s-au obţinut rezultatele înscrise în ***tabelul 2*** şi ***fig. 3.***

Tabelul 2
Corelarea rezultatelor prin ELISA şi imunofluorescenţă

Nr. probe testate	Rezultate							
	ELISA				IF			
	Pozitiv		Negativ		Pozitiv		Negativ	
	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
81	58	71.6			49	84.48		
							9	15.52
					1	4.35		
			23	28.4			22	95.65

Din analiza rezultatelor înscrise se observă că din cele 58 seruri seropozitive la testul imunoenzimatic ELISA de competiţie, numai 49 (84,48%) sunt pozitive la imunofluorescenţă, iar 9 (15,52%) sunt seronegative. Din cele 23 probe seronegative la testul ELISA de competiţie, 1 (4,35%) probă a reacţionat pozitiv şi 22 (95,65%) probe au reacţionat negativ la testul de imunofluorescenţă.

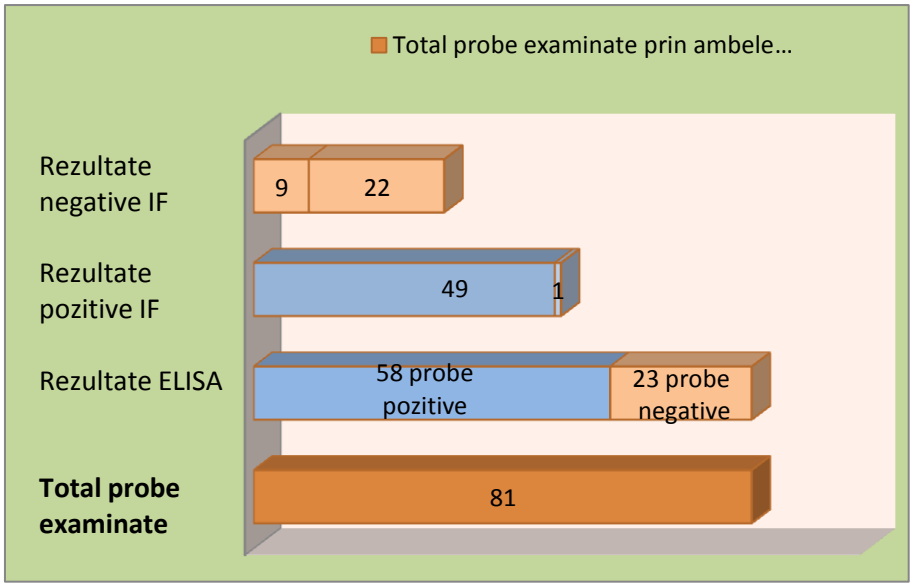


Fig. 3
Corelarea rezultatelor prin ELISA şi imunofluorescenţă

Lipsa corelării rezultatelor celor două teste se poate explica pe de o parte prin dinamica anticorpilor în organismul infectat, iar pe de altă parte prin statusul imunitar, vârsta animalelor şi

prevalența zonală. Astfel, în ceea ce priveşte dinamica, este cunoscut că anticorpii specifici sunt detectați la 7-14 zile după infecție, ating un maxim la 30-50 de zile şi apoi scad gradual încât la 4-6 luni nu mai sunt detectați.

Testele utilizate în diagnoscticarea sindromului respirator şi de reproducție sunt sensibile şi specifice, dar nu pot fi utilizate pentru a măsura direct nivelul imunității protectoare. Totuşi au avantajul că implică un consum redus de reactanți, sunt puțin laborioase şi rapide în obținerea rezultatelor.

CONCLUZII

1. Cele 81 probe de ser examinate prin testul imunoenzimatic –ELISA de competiție au reacționat pozitiv 58 ceea ce reprezintă 71,60%, iar 23 (28,4%) seruri au fost negative.

2. La testul de imunofluorescență, din 81 seruri examinate, 50 (61,72%), au reacționat pozitiv, iar 31 (38,28%) au fost seronegative

3. Testul imunoenzimatic - ELISA de competiție s-a dovedit mai sensibil decât testul de imunofluorescență..

4. Din cele 58 seruri seropozitive la testul imunoenzimatic ELISA de competiție, numai 49 (84,48%) sunt pozitive la imunofluorescență, iar 9 (15,52%) sunt seronegative. Din cele 23 probe seronegative la testul ELISA de competiție, 1 (4,35%) probă a reacționat pozitiv şi 22 (95,65%) negativ la testul de imunofluorescență.

5. Lipsa corelării rezultatelor celor două teste se poate explica pe de o parte prin dinamica anticorpilor în organismul infectat, iar pe de altă parte prin statusul imunitar, vârsta animalelor şi prevalența zonală .

6. Testele imunoenzimatic ELISA şi imunofluorescența pot fi utilizate pentru diagnosticarea sindromului respirator şi de reproducție, deoarece sunt sensibile şi specifice, necesită consum redus de reactanți, sunt puțin laborioase şi rapide în obținerea rezultatelor.

BIBLIOGRAFIE

1. ALBINA E., LEFORBAN Y., BARON T., PLANA DURAN J., VANNIER P., 1992 - An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome, Ann. Rech. Vet., nr. 23, 167-176.
2. CAFRUNY A. WILLIAM, DUMAN G. RICHARD, WONG HW GRACE, SULEMAN SAID, PAM WARD-DEMO, ROWLAND RR RAYMOND, NELSON ERIC A., 2006 - Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection. Virology Journal, vol. 3, nr. 90.
3. CHAVEZ E., 2004 – Tecnicas diagnosticas para el Sindrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS): Interpretacion. Departamento Tecnico – Pie Mexico.
4. HORTER D.C., POGRANICHNIY R., CHANG C.C, YOON K.J., ZIMMERMAN J.J., 2002 - Assessment of PRRS diagnostics in detecting persistently infected animals, The 17th International Pig Veterinary Society congress, Iowa, USA, pag. 210.
5. OSORIO F.A., GALEOTA J.A., NELSON E., BRODERSEN B., DOSTER A., WILLS R., 2002 - Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. Virology nr. 302, pag. 9–20.
6. SHIN J.-H., KANG Y.-B., KIM Y.-J., 1993 – Seroepidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. Detection of indirect fluorescent antibodies. J. Agric. Sci. nr. 35, pag. 572-576.
7. StĂnuica D., Panca C., Sarca Mariana, Caraivan I., Draghici D., 1999 – Investigații seroepidemiologice într-un focar de PRRS (sindromul tulburărilor de reproducție şi respiratorii la porc). Studii şi Cercetări de Medicină Veterinară. Revista S.N. „Institutul Pasteur" S.A. Bucureşti.
8. ŞTIRBU – TEOFĂNESCU BEATRICE, MILITARU D., POPOVICI A., CIUPERCESCU L., DIACONU IOANA, 2007 – Detecția virusului sindromului reproductiv şi respirator porcin prin imunofluorescență directă şi teste imunocitohistochimice. Al X-lea Congres Național de Medicină Veterinară Poiana Braşov.

RESEARCHES REGARDING MEAT PARAMETERS IN SHEEP POPULATION REARED IN STALLING AND PASTURES

TAPALOAGA DANA, NEAGU IULIANA, CULEA C., TAPALOAGA P. R., PAUNESCU ILEANA, MITRANESCU ELENA, MARMANDIU A.
USAMV Bucureşti

Among domestic animals, sheep image provides a species with high biological and economic flexibility, having the capacity to use resources and poor forage rough surfaces,which can integrate the various systems and forms of growth, helping to fund animal products (meat, milk, wool, skins and pelts) and farm development is carried out without too much investment.

In the current juncture and international economic and development growth in the sheep in the world and in Romania it is necessary to revalue the possibilities of developing these products.. It requires increased production of meat and milk, both breeds specialized for these productions, as well as local breed.

Lately increased consumer preference for sheep meat and dairy products made from sheep's milk, because the food traditions, a deficiency of protein in animal food, and the characteristics of special nutritional products.

Key words: sheep, meat quality, stalling, pastures

MATERIAL AND METHOD

Research undertaken in this paper follow the evolution of meat production in adult reconditioned sheep, raised in free stalling or pasture,but neglecting the production of wool.

The works were performed at different exploiting units. Maintenance sheep was for 150-160 days in the holding stalling to Bran and 205-215 days at pasture, the natural pastures on the platform Bran, which were arranged sheepfolds, each year. During stalling ewes were maintained in properly equipped shelters. The animals were separated by gender, by age groups and physiological condition, using the permanent bedding, which was evacuated in the spring.

To ensure the vital functions were ensured SU 3-3,5 kg, 1,5-1,8 A, 70-75 PBD, 4-5 g Ca, 2.5-3 g P, 100 kg live weight, added to these quantities by 15-20% in periods of preparation for the mating and another 25-45% during pregnancy and during the first 1-3 months of lactation.

Feeding during stalling has made with mountain hay 1.5-2 kg / head / day, with juicy fodder, fodder beet and kohlrabi 1.5 - 2 kg / head / day, with mixture of concentrated feed in the structure which have on average 25-30% barley, corn 50-60%, 8-12% of grist sunflower or soy, salt 1%, 2% natural chalk. Using the grassland was over more this having beneficial effects on health and the level of productive animals, avoiding the long and tiring road. Company to pasture and water at discretion shady resting place, held that pregnant females are sensitive to watering with cold water, especially when they are in heat.Feeding of sheep was carried out taking account of their physiological state.. During this period with an additional 0.3-0.4 kg concentrates (corn, barley, groats sunflower or soya). A particular attention was given to lactating sheep, which were given fodder to stimulate milk secretion. In addition to bulky feed, hay, straw, fodder beet or green table, they received a mixture of concentrated (corn, barley, groats of sunflower or soya).Evolution of body weight was calculated by bodyweight in reporting the above mentioned phases, the weight of sheep at the beginning of the experience.

There were used the usual statistical methods and testing for the likelihood or used Fisher, Student and Tuckey tests.

RESULTS AND DISCUSSION

Given that the annual reforming 20-25% of adult herd of sheep, aged 6-7 years or under the age of 6 years is needed reconditioning these sheep, they form, along with the young sheep that does not stop at breeding , the resources that live in the meat is delivered from a holding increasing sheep. There is also an extremely high requirement for adult sheep from the traditional consumer and Arab countries, who buy these sheep and affordable pay per kilogram live.

Rewrapping mother sheep pasture to pasture has been on the verge of housing, so as to make daily trips than 3-5 km. Control daily meal for green grazing herds introduced to was performed using control points located on the surface randomized grazing. Thus, after each cycle of vegetation daily consumption was calculated individually, resulting an average daily consumption of 9.6 kg green weight / head. Control stage of fattening was conducted twice a month, by weight of 15% of sheep subjected to reconditioning. The feeding was completed within 60 days with an additional 0.3 kg of alfalfa hay and 0.3 kg concentrate feed (0.1 kg corn grain, barley grain 0.1 kilograms and 0.1 kilograms of sunflower groats), ground and mixed in a single mixture, ensuring the individual daily consumption of 222 g PBD. The total period of reconditioning the sheep were given 63 kg of hay and 48 kg of concentrated feed (21 kg maize, barley 13.5 kilograms and 13.5 kilograms groats), feed prices that have cost more, feed the rest being provided by grazing or other resources cheap fodder (straw of wheat or barley).Rewrapping pasture sheep mother was reformed in the sheep population of milk-Palas, Palas of merino sheep, beef population, spawning population, Tigaie and Turcana (Table 1). In the sheep population of milk-Palas average initial weight was 44.33 ± 3.22 kg, average final weight was 53.66 ± 2.59 kg increase in total weight of 9.36 ± 1.47 kg carcass weight was 23.93 ± 2.50 kg, achieving the average slaughter of 44.6 ± 2.8%.Breeding Palas merino sheep initial average weight was 46.24 ± 4.11 kg, average final weight was 58.08 ± 3.18 kg increase in total weight of 11.88 ± 1.63 kg , carcass weight was 27.23 ± 2.16 kg, achieving the average slaughter of 46.9 ± 1.7%.

Table 1
Data regarding rearing on pastures

Breed or population	n	Initial average weight (kg)	Final average weight (kg)	Total gain (kg)	Carcass weight (kg)	Slaughtering %
		- - X ± sx V%	- - X ± sx V%	- - X ± sx V%	- - X ± sx V%	- - X ± sx V%
Milk population-Palas	20	44,33±3,22 32,99	53,66±2,59 21,59	9,36±1,47 70,24	23,93±2,50 46,72	44,6±2,8 28,08
Merino Palas	25	46,24±4,11 44,44	58,08±3,18 27,38	11,88±1,63 68,60	27,23±2,16 39,66	46,9±1,7 18,12
Meat population-Palas	25	47,87±3,75 39,17	60,74±2,46 20,25	12,94±1,58 61,05	28,79±1,94 33,69	47,4±2,4 25,32
Prolific population-Palas	20	44,65±2,85 28,55	54,85±1,92 15,65	10,25±1,34 58,46	24,64±1,47 26,68	44,9±2,7 26,89
Ţigaie	25	41,62±3,47 41,68	47,38±2,82 29,75	5,76±1,02 88,54	20,13±1,07 26,57	42,48±2,7 31,77
Ţurcană	25	40,35±4,12 51,05	47,16±1,98 20,99	6,81±0,98 71,95	20,28±1,03 25,39	43,01±1,4 16,27

In the Palas sheep meatpopulation initial average weight was 47.87 ± 3.75 kg, average final weight was 60.74 ± 2.46 kg increase in total weight of 12.94 ± 1.58 kg carcass weight was 28.79 ± 1.94 kg, achieving the average slaughter of 47.4 ± 2.4%.In the prolific Palas sheep population the initial

average weight was 44.65 ± 2.85 kg, average final weight was 54.85 ± 1.92 kg increase in total weight of 10.25 ± 1.34 kg carcass weight was 24.64 ± 1.47 kg, achieving the average slaughter of 44.9 ± 2.7%.Tigaie breed sheep average initial weight was 41.62 ± 3.47 kg, average final weight was 47.38 ± 2.82 kg increase in total weight of 5.76 ± 1.02 kg weight carcass was 20.13 ± 1.07 kg, achieving the average slaughter of 42.48 ± 2.7%.Turcana breed average initial weight was 40.35 ± 4.12 kg, average final weight was 47.16 ± 1.98 kg increase in total weight of 6.81 ± 0.98 kg weight carcass was 20.28 ± 1.03 kg, achieving the average slaughter of 43.01 ± 1.4%.Rewrapping of sheep under the permanent living was performed on batches of 25 heads of populations and breeds of sheep which were referred to grazing.Average daily feed during reconditioning was 1.2 kg of alfalfa hay, 0300 kg of barley straw, 2 kg mass and pale green tress, given the manger and 1 kg of concentrated feed, of which 0.5 kilograms of maize beans, 0.3 kg barley grain and 0.2 kg sunflower groats ensuring individual consumption 2.06 A and 301 g PBD. Control fattening stage was performed by weighing fortnighty sheep marked for this operation since the beginning of reconditioning.

The main results obtained in sheep mothers rewrapping reformed under the permanent stalling are presented in Table 2. The Palas sheep initial average weight was 45.73 ± 3.21 kg, average final weight was 59.56 ± 2.63 kg increase in total weight of 13.86 ± 1.48 kg , carcass weight was 28.35 ± 2.10 kg, achieving the average slaughter of 47.6 ± 1.3%.In the sheep population of meat-Palas the average initial weight was 46.33 ± 2.53 kg, average final weight was 60.95 ± 1.54 kg increase in total weight of 14.65 ± 1.39 kg , carcass weight was 29.19 ± 2.41 kg, achieving the average slaughter of 47.9 ± 2.6%.

Table 2
Data regarding permanent stalling

Breed or population	n	Initial average weight (kg)	Final average weight (kg)	Total gain (kg)	Carcass weight (kg)	Slaughtering %
		- - X ± sx V%	- - X ± sx V%	- - X ± sx V%	- - X ± sx V%	- - X ± sx V%
Milk population-Palas	25	43,41±2,91 33,53	53,61±1,98 18,67	10,21±1,22 59,75	24,92±1,45 29,09	46,5±2,7 29,03
Merino Palas	25	45,73±3,21 35,09	59,56±2,63 22,08	13,86±1,48 53,39	28,35±2,10 37,04	47,6±1,3 13,66
Meat population-Palas	25	46,33±2,53 23,30	60,95±1,54 12,63	14,65±1,39 61,05	29,19±2,41 41,28	47,9±2,6 27,14
Prolific population-Palas	25	42,94±1,85 21,54	54,37±1,29 11,86	11,47±1,30 56,67	24,90±1,67 33,53	45,8±1,8 19,65
Ţigaie	25	45,62±2,47 27,07	51,38±2,82 27,44	5,76±1,02 88,54	22,13±1,07 26,57	43,07±2,7 31,34
Ţurcană	25	39,35±3,12 39,64	47,26±1,98 20,99	7,91±0,95 60,05	20,28±0,94 22,51	42,91±1,8 20,97

In prolific sheep population average initial weight was 42.94 ± 1.85 kg, average final weight was 54.37 ± 1.29 kg increase in total weight of 11.47 ± 1.30 kg weight carcass was 24.90 ± 1.67 kg, achieving the average slaughter of 45.8 ± 1.8%. Tigaie breed sheep average initial weight was 45.62 ± 2.47 kg, average final weight was 51.38 ± 2.82 kg increase in total weight of 5.76 ± 1.02 kg weight carcass was 22.13 ± 1.07 kg, achieving the average slaughter of 43.07 ± 2.7%.

Turcana breed average initial weight was 39.35 ± 3.12 kg, average final weight was 47.26 ± 1.98 kg increase in total weight of 7.91 ± 0.95 kg weight carcass was 20.28 ± 0.94 kg achieving the average slaughter of 42.91 ± 1.8%.

CONCLUSIONS

The data confirm a greater efficiency in the practice of adult sheep in reconditioning regime permanent stalling versus reconditioning on pasture for all populations and breeds of sheep. Interracial analysis finds the following:

- The meat Palas had the greatest growth in weight, increasing both the pasture and that in the stalling, achieving increase in weight was 12.94 kg for pasture growth, and to 11.47 kilograms in the stalling.
- The lowest value of average daily increase achieved by the populations of the study Tigaie population, followed by the copies of the local race Turcana, they having a weight gain which ranged from 5.76 kg to a maximum of 7.91 kg if Turcana.
- Is therefore an urgent need to create populations of sheep meat, according to the requirements of increasingly high meat sheep in preference to other productions of this species.

REFERENCES

1. Dinescu, S. - Concepte moderne in zootehnie. Editura “Ceres“ Bucuresti 1996.
2. Kamlosi, I. – 1992 – The use of computer image analysis to determine body dimensions in sheep and to predict carcass conformation. 43 Reunion Anual de la FEZ, Madrid, 1992.
3. Nicolae, M. -1997 – Noul sistem de alimentaţie a ovinelor în producţia, ameliorarea şi reproducţia ovinelor. Coordonator V. Taftă, Ed. Ceres, Bucureşti.
4. Pivoda, I. şi colab. - 1993 - Studiul eficienţei economice în diferite sisteme tehnologice de creştere a ovinelor.Simpozion ASAS. Bucureşti.
5. Tacu, A. – 1968 – Metode statistice de interpretare a datelor în ameliorare, Bucureşti.
6. Taftă, V.- 1983 - Creşterea şi exploatarea intensivă a ovinelor. Ed.”Ceres”, Bucureşti.
7. * * * Report of the Agriculture Situation in the Community (1998).
8. * * Anuarul statistic al Romaniei. 2000, 2004
9. * * FAO, 2000 – Influence de L’agriculture biologique sur l’innocuite la qualite des Aliments.

THE IMPORTANCE OF THE FLOOR FOR THE LACTATION COWS' COMFORT

TIBRU, I., CHIRILA, D. RADUCANU ANDRADA
Faculty of Veterinary Medicine Timisoara

Our researches aimed to evaluate the lactation cows' comfort on three different types of floor.

The studies and measurements were conducted and performed in three farms with free stabling on different types of floor: a) concrete + thick hay layer, b) rubber bed, and c) sand layer.

After proper observations, the following facts were revealed: a) the cows bred on concrete + hay layer spent 14.0 hours/day in resting; b) the cows bred on rubber bed spent 14.3 hours/day in resting; and c) the cows bred on sand layer spent only 8.1 hours/day in resting. None of the cows that were bred on rubber bed used to rest on the service area. The risk of injuries dropped to 1.1%.

The incidence of laminitis was higher on cows bred on the a) and c) types of floor, compared to those bred on the b) type of floor, namely on rubber bed. The production of milk was with 0.6 liter/day higher at cows bred on rubber bed, because of the increase in the fodder consumption thanks to the cows' healthy physical activity.

These results confirm that choosing the right type of floor is a most important factor in the ensuring of lactation cows' comfort and welfare.

Key words*:* comfort, cow, floor

INTRODUCTION

Milch cows spend most of the day in resting and sleeping, and thus restoring the physiological status of their body. This is essential for the health, welfare and high production maintenance. So, the time for resting is considered to be a specific indicator in appreciating the level of comfort that the cows habitually enjoy in a certain farm.

The aim of our researches is to determine how the technology (namely the floor) influences the milk production.

MATERIAL AND METHODS

In order to estimate the milch cows' comfort, our observations first focused, in every farm, on the number of cows that lay or stand up, their position during ruminate (lying or standing), the incidence of laminitis, and the milk production – all of these aspects being correlated with the type of floor.

The studies and measurements were conducted and performed in three farms with free stabling on different types of floor: a) concrete + thick hay layer, b) rubber bed, and c) sand layer, as following:

Farm A: an effective of 83 cows housed in individual couchettes, on permanent hay layer. The hay quantity usually used in this system is between 8 and 13kg/cow/day.

Farm B: an effective of 56 cows housed on rubber bedding and rubber carpets for walking.

Farm C: an effective of 63 cows housed in individual couchettes, on sand bedding.

RESULTS

In **farm A** (with permanent hay layer), the incidence of laminitis, and the milk production reached and remained between the normal parameters. The animals walked freely, without experiencing any inconvenience or hindrance from the system. They spent 14.0 hours/day in resting, a value that is close to that indicated by House & col. [3].

In **farm B** (with rubber bedding and carpets), one could notice a better body hygiene of the cow, in comparison with the habits in the other two farms. The cows bred on rubber bedding and

carpets spent 14.3 hours/day in resting, and the number of accidents dropped to around 1%, despite of the fact that the access alleys were, sometimes, wet. The low percentage of the accidents was a direct result of a better hoof adherence to the floor. The lack of injuries was also associated with the rubber carpets' elasticity, so close to the natural grazing field. In the same time, because the cows recognised the safety of their environment, they tended to spend more time for the personal body hygiene.

The costs for installing this type of floor (rubber beds and rubber carpets), including the hand labour costs, are not higher than 150 – 200 €/cow. The material is very resistant and has the property to uniformly distribute the weight over the bed, especially in the case of the bone protuberances.

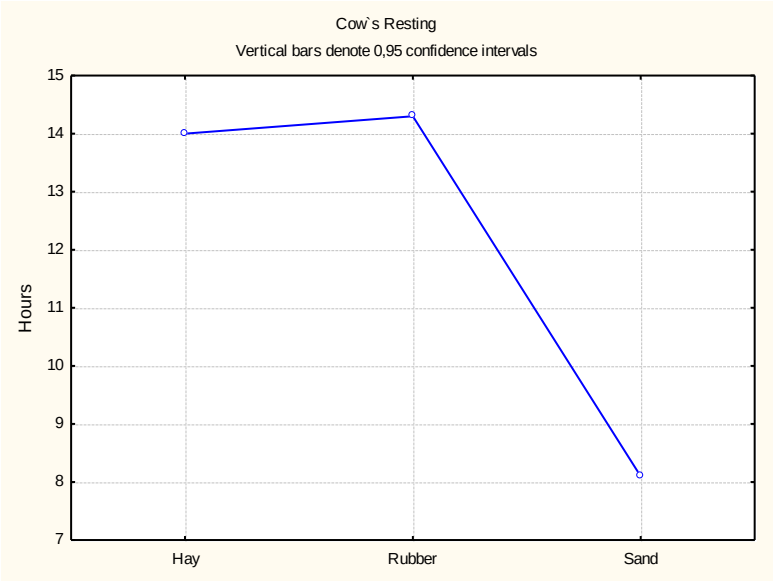


Fig. 1: Cow`s resting

In **farm C** (with sand layer), the cows spent only 8.1 hours/day in resting.

In general, if the sand layer is clean, it provides an excellent floor, because it prevents the bacteria from growing and causing mastitis. The greatest concern that a farmer should have about this type of floor is related to the protocol of the dejection's evacuation, and to the caring system. The sand is a very abrasive material that causes scratches on the equipment used in the dejection's evacuation; this problem leads to a frequent replacement of the evacuation pumps.

The send quality is important, because if it has a high content of clay, it turns into mud when filled with urine and faecal.

DISCUSSIONS

Farm A. The research results are in contradiction with the facts presented by the Danish researchers, namely: the animals housed on a hay layer showed body hygiene and a production similar to the cows housed on a bound system. Our data is in concordance with the observations of the researches in Alberta, who obtained great values in body hygiene and cow's comfort by using big quantities of hay. So management of bedding is which ultimately determines the comfort of the animals receiving this type of bedding.

The existence of surfaces with an inclination between 7° and 9° in the use of hay layer had been shown to be beneficial for the evacuation of dejection on the alley cleaning. For this system are used about 2.5 kg of straw per day and the space given to an animal is 7 m^2. Hansen [2] noted that the use of slopes permit using with 33% less straw than those with flat surface.

Farm B. The results reported are consistent with those obtained by Rodenburg and col. [4], who reported that where that mattresses were the cows did not use the alley service as a place to rest (0%) and were few accidents compared with 29% in those who did not have rubber carpets.

Usually a thin layer of dry bedding is covering the rubber material weekly to absorb moisture. The bedding may be long straw, cut straw or sawdust.

Farm C. The reporting of frequent laminitis at the caw form this farm has been put on the state of extra grain ration or were induced by the fact that he caws were standing for a long time on hard surface of concrete, and so the caws were subjected to a duration stress and they will have a reduce longevity.

Cermak [1] demonstrated that laying period was shorter (7 hours) on empty concrete, but this period is being extended on the traditional rubber carpet (10 hours) and much longer on a mattresses (14 hours) comparable with the rest period form pasture.

CONCLUSIONS

1. The using of a contact surface which favours the caws resting has an important signification on the rest time and on production.
2. The time for the resting period was 14,3 hours/day on the cows with rubber carpets and mattresses; 14,0 hours/day at the caws with the concrete surface on which were put a layer on straw and 8,1hours/day at the cows from the sand bedding farm.
3. The milk production was the best at the caws maintained on a rubber flour with 0,6 l milk/day because of the growing distance made by the caw/day and the feed consumption stimulation.

.

REFERENCES

1. Cermak, J. (1994): Some housing and management considerations relevant to dairy cow welfare and stress related lameness, Proceedings of the 8th International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit, Liverpool, UK.
2. Hansen, K. (1994) Tread cleaning for young cattle sloped bedded floors, Proceedings of the Third International Dairy Housing Conference, ASAE, St. Joseph, MI., p. 817.
3. House, H.K., Anderson, N.G. and Rodenburg, J. (1994): Recent developments of the cow mattress in Ontario, Proceedings of the Third International Dairy Housing Conference, ASAE, St. Joseph, MI., p. 177.
4. Rodenburg, J., House, H.K. and Anderson, N.G. (1994) Free stall base and bedding materials: Effect on cow comfort, Proceedings of the Third International Dairy Housing Conference, ASAE, St. Joseph, MI., p. 159.
5. Tibru, I. and Chirila, D. (2008): Building For Cow Comfort, Buletin USAVM, Veterinary Medicine, 65, 225-32.
6. Tibru, I. and Raducanu Andrada (2008): Laminitele-indicator de apreciere a bunastarii, Lucr. St. Med. Vet., Iasi, 51 961-62.
7. Tibru, I. (2007): Confortul vacilor de lapte, Rev. Rom. Med. Vet., 2, 156-59.

HOG CARCASS DECONTAMINATION WITH LACTIC ACID

ŢIBRU I.[1], CERNA D[2]., BARNA ABRAHAM [2]
[1]Faculty of Veterinary Medicine Timisoara
[2]Smithfield Processing Timisoara

Products preservation duration has a special economical significance and, technically, it means the reduction of the pathogen microbial flora. A 2% lactic acid solution was used, 0.25 – 0.5 liters per half a carcass, for 60 – 120 seconds, 5-85 ˚C temperature and 1.5 – 3 bar pressure, noticing that pH decreases by 3 units and gets back to normal within 2 days.

For the first variant, NTG and ATP were followed up by sanitation samples into UFC and URL, and the results were significant, noticing a reduction of 99%. For the second variant, when E. coli, Pseudomonas aeruginosa and Salmonella enteritidis were used as indicators, the results were similar.

Key words: pigs, decontamination, lactic acid.

INTRODUCTION

Ensuring the quality of pork is absolutely necessary because it provides advantages by: satisfying the consumers' requirements for a carcass with a high content of lean meat, ensuring in the technological flow of low fat percentage and achieving high effectiveness both for the producer and the processor.

If quality control belongs to other decision-maker, quality assurance belongs to the qualified staff in the processing industry. There have been and will be more attempts to find ways to ensure and increase the interval to guarantee the pig carcass hygiene. This paper will present the results obtained after using the lactic acid and to ensure and extend the preservation of the pig carcass.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in an approved and agreed slaughterhouse, and the study was conducted in two phases: one on the technological flow when healthy pigs were slaughtered and one when necessity pigs were slaughtered. In both stages 2% lactic acid solution was used, 0.3 l per carcass, applied for 2 minutes at a pressure of 2 bars. Spraying was done after final washing before cooling the carcass. Lactic acid had a stronger bactericidal effect by lowering the pH. The delayed effect of lactic acid was more significant during products' storage.

In the first stage the purpose of the spraying was to protect the carcass from any microorganisms existing in the slaughtering area and the second phase was aimed at testing the microbicidal effect of lactic acid in the case of deliberate contamination of the carcass using cultures of *E. coli* and *Salmonella enteritidis*

The study was conducted on 100 pig carcasses, on the technological flow, for normal situations and on 45 necessity carcasses. In the first variant, we focused on the carcass cleanness by URL of the ATP, for the second variant, when cultures of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus.*.were used as indicators, there was monitored the reduction of microorganisms exposed to the action of the lactic acid, the pH values, such as the possible organoleptic changes of the carcass.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Meat is a good substrate for the development of microorganisms, because at a nearly neutral pH, there is a strong activity of water and meat is rich in nutrients. Therefore, microorganisms should be reduced as much as possible during processing, thereby ensuring the reduction of the food poisoning cases due to meat products.

Lactic acid was used, which is a sticky liquid, non-volatile and colorless, with a slightly sour taste, ranging in the gustatory profile of meat products aimed at extending the period of validity of the carcass, by inhibiting microorganisms and improving taste, consistency, and flavor.

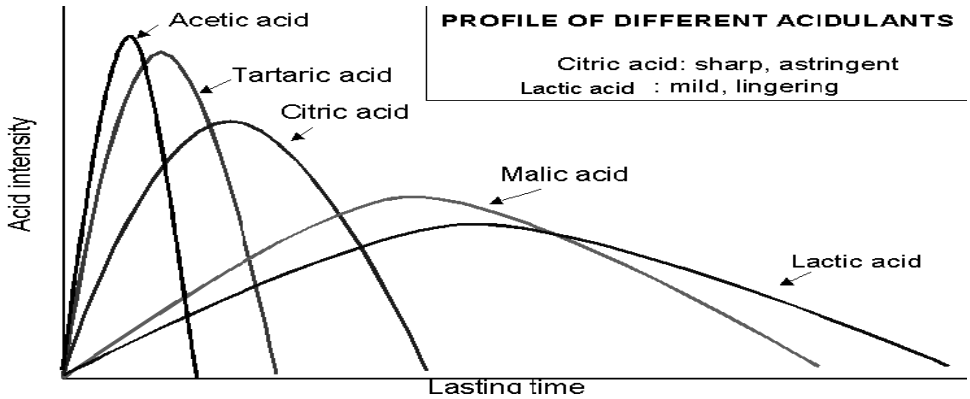


Image 1. Aromatic profile of different acids Source: PURAC

After studying the effect of several acids, lactic acid was chosen (image 1) because from the studied acids, citric acid and tartaric acid have a similar taste and cause an intense and immediate reaction, which is not very persistent; malic acid has a strong taste, with less immediate impact but with a more persistent effect; ***lactic acid can be compared with malic acid***, *it has a light taste, sometimes described as slightly salty;* phosphoric acid tends to be a compromise between fruit acid (citric acid) and lactic acid and acetic acid is one of the most popular flavors which tastes like vinegar.

The preservative role of an acid preservative for food consists in the fact that it slows the growth of harmful microorganisms, particularly bacteria. By reducing the pH one can stop the development of pathogenic microorganisms (image 2).

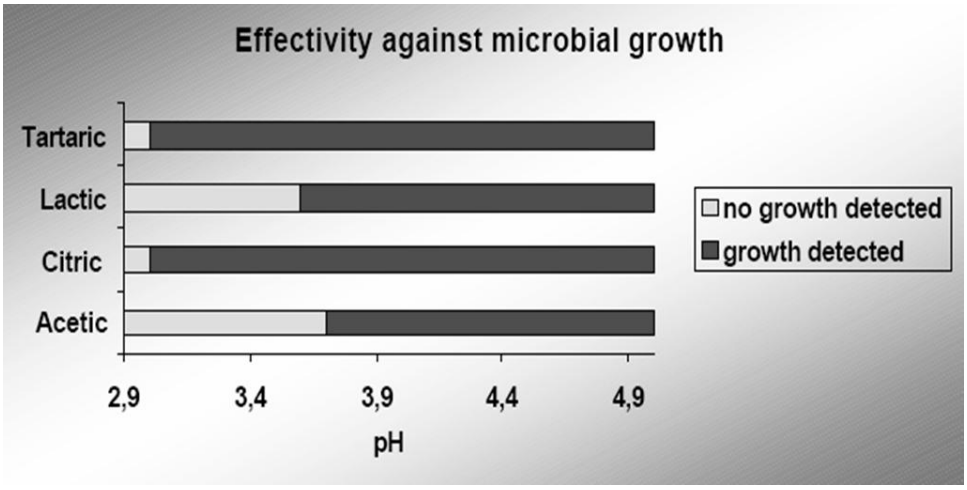


Image 2. Efficiency against microbial growth Source: PURAC

If citric acid is used, the pH is more reduced than by using lactic acid and acetic acid according to the graph in Image 2. By using acetic acid bacteria area not growing anymore because the pH value reached 3.7, and by using lactic acid, the reached value was pH 3.6, citric acid inhibits bacteria at a pH of 2.9. If lactic acid and acetic acid mix, they act synergistically.

The most used acids for meat are citric acid and acetic acid. They are used to enhance the product safety and to extend its validity period. However, these acids, affect the color and flavor of these products. Acetic acid is used due to the low pH, which extends the validity of the products, but has a negative influence on flavor. *Citric acid* helps maintaining the color of meat, diminishing water elimination and preserves the smell during slaughtering and processing. Citric acid is used in sauces

for beef, but also generally, during slaughtering. *Acetic acid* is used mainly for poultry products, such as chicken breast. *Lactic acid* as such is rarely used in meat industry, because its salts are preferred: sodium and potassium lactate. In case of application of lactic acid solutions, there was noticed an increase of the period of validity. It is also recommended to be used, because bacteria like *Salmonella* and *Campylobacter* are very sensitive to the action of lactic acid, while freshness is adjustment and the carcass initial color is preserved.

Pig carcass cuts for normal slaughtering until evisceration is still sterile, because the skin protects any contamination of meat itself. After decasing, the meat may be contaminated with microorganisms from the digestive tract of the pig, from the operator's hands or the machinery. Therefore it is important to keep a lower number of microorganisms on pork which can be achieved by carcass decontamination.

By carcasses washing visible dirt is removed and it can reduce microbiological contamination. Washing efficiency depends on the type of microorganisms and on their capacity of adhesion to meat, and on the wash technique. Decontamination cannot mask poor hygiene because it reduces only the number of bacteria.

Pig carcasses spraying with lactic acid (concentration 2%) resulted in reduced microorganisms and inhibition of their development during storage. Microorganisms on the surface of the carcass were affected by the 2% solution of lactic acid and did not allow their development. The best results were obtained by applying the solution of lactic acid on the still hot carcass as the pH decreases faster at higher temperatures.

For the first variant, NTG and ATP were followed up by sanitation samples into UFC and URL, and the results were significant, noticing a reduction of 99%. For the second variant, when *E. coli, and Salmonella enteritidis* were used as indicators, the results were similar.

Effects of cold lactic acid decontamination, for 60 s for the hog carcasses contaminated with ***Salmonella***:

- out of 15 hog carcasses treated with lactic acid 2%, 5 carcasses were positive
- out of 15 hog carcasses treated with lactic acid 5%, 3 carcasses were positive

Effects of hot lactic acid decontamination for the hog carcasses contaminated with ***Salmonella***:

- out of 15 hog carcasses treated with lactic acid 2%, for 30 s, 6 carcasses were positive
- out of 15 hog carcasses treated with lactic acid 2%, for 60 s, no positive carcass
- out of 15 hog carcasses treated with lactic acid 2%, for 90 s, no positive carcass
- out of 15 hog carcasses treated with lactic acid 2%, for 120 s, no positive carcass
- out of 15 hog carcasses treated with lactic acid 5%, for 60 s, no positive carcass
- out of 15 hog carcasses treated with lactic acid 5%, for 90 s, no positive carcass

2% concentration of lactic acid applied for 120 s to 37˚C temperature destroys 30 – 50% of ***E. coli.***

In terms of legislation, all food additives are carefully controlled by the authorities and by various international organizations, ensuring that foods are not dangerous to the consumer and are appropriately labeled.

The European Community directive on Food Additives other than colorants and sweeteners No. 95/2/EG (20th of Feb. 1995) allows the addition to food of all acids listed in this report, without standards of identity. The EU numbers of acids are E 260 acetic acid, E 330 Citric acid, E 270 *lactic acid*, E 296 malic acid, E 338 phosphoric acid and E 334 tartaric acid. In most other countries, acids can be applied without limit.

CONCLUSIONS

- Applying a 2% lactic acid solution in water as a spray or dip results in a 1-3 log reduction (90-99.9%) of Salmonella, E. coli and as well as the TPC (Total Plate Count).
- Application of 2% lactic acid for 120 s led to an unacceptable deterioration of the organoleptic qualities of the meat.
- The results obtained in these studies suggest that Salmonella contamination can be eliminated from pork carcasses by incorporating LAD in HACCP procedures.
- Decontamination with lactic acid using 2% at pH 2.3 for 30 s and a temperature that results in meat surface temperature of at least 37°C would constitute an adequate treatment.

REFERENCES

1. Algozin, KA, Miller, GY, McNamara, PE. (2001) Productivity and economic impact of feed grade antimicrobial use in pork production. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany 2-5 Sept, p. 399-402.
2. Bahnson, PB. (2001) Salmonella epidemiology and control in pork: questions asked and questions remaining. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. 114, p.321-322.
3. Blaha, T, Gabert, J, Kramer, TH and Weber, C. (1999) Testing the proficiency of the German test kit "salmotype" Elisa to identify Salmonella antibodies in porcine sera. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork. Washington DC, USA. Aug 5-7, p. 24-25.
4. Clouting, C. (2001) Final project report: Epidemiological studies of multiresistant Salmonella Typhimurium in pigs. Chief Scientists Group, MAFF.
5. Dahl, J. Sorensen, LL.(2001) Association between carcass swab positivity and seroprevalence in herd of origin and estimation of the importance of cross-contamination on the slaughter line pentru Salmonella-negative herds. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany 2-5 Sept, p. 313-315.
6. Grafanakis, E, Leontides, L and Genigeorgis, C. (2001) Seroprevalence and antibiotic sensitivity of serotypes of Salmonella enterica in Greek pig herds. Veterinary Record. 148, 407-411
7. Gray, JT, Fedorka-Cray, PJ, Hermosillo, J and Headrick, M. (2001) Expanded-spectrum cephalosporin resistance and multidrug resistance in Salmonella isolates from swine. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany 2-5 Sept, 2001. 377-379.
8. Hansen, C.F, Knudsen, K.E, Jensen, B.B. Kjaersgaard, H.D. (2001) Effect of meal feed, potato protein concentrate, barley, beet pellets and zinc gluconate on Salmonella prevalence, gastro-intestinal health and productivity in finishers. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany 2-5 Sept, p, 103-105.
9. Hansen, C.F, Knudsen, K.E, Jensen, B.B Kjaersgaard, H.D. (2001) Effect of meal feed and coarser grinding of pelleted feed on productivity, microbiology and physico-chemical properties in the gastro-intestinal tract of finishers. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany 2-5 Sept, 2001, p.106-108.
10. Hoofar, J and Mortensen, AV. (2000) Improved culture method pentru isolation of Salmonella organisms from feces. American Journal of Veterinary Research. 61, p.1426-1429.
11. Hurd, H.S, Gailey, J.K, McKean, J.D Rostagno, M.H. (2001) Experimental rapid infection in market swine following exposure to a Salmonella contaminated environment. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. 114, p.382-384.
12. Jensen, T., Christensen, H. (2001) Decontamination of pig carcasses with hot water. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany 2- 5 Sept, p. 127-129.
13. Jorgensen, L, Kjaersgaard, H.D, Wachmann, H, Jensen, B.B, Knudsen, KEB. (2001)Effect of pelleting and use of lactic acid in feed on Salmonella prevalence and productivity in weaners. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany 2-5 Sept,p.109- 111.
14. Kofer, J, Pless, P, Fuchs, K., Thiel, W. (2000) The Styrian Salmonella surveillance programme in pork. Weiner Tierarztlich Monatschrift. 87, p.14-20.
15. Mogelmose, V, Bagger, J, Nielsen, B Baggesen, DL. (2001) Reduction of multiresistant Salmonella Typhimurium DT 104 in Danish swineherds-new strategy. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany 2-5 Sept, 2001. 69-71.

INVESTIGATIONS ABOUT THE PATHOGENITYOF *BACILLUS CEREUS* STRAINS

TUDOR L.[1],TOGOE I.[1], FLOREA ALISA NICOLETA [2], MITRANESCU ELENA [1], TUDOR ANETA LAURA [3]
[1]Faculty of Veterinary Medicine Bucharest
[2]DSVSA Bucharest
[3]Faculty of Veterinary Medicine "Spiru-Haret"

It has been investigated the existence of some correlation between the CFU/ ml number, age and pathogenesis of 5 Bacillus cereus stems which producing haemolysins and C phospholipase. The bacterial culture has been obtained on heart-brain broth and has been exposed to different incubation periods (6 hours, 12 hours, 18 hours and 24 hours) on 37 ºC in aerobiosis conditions. To verify the pathogenithy the bacterial cultures have been 10X concentrated by centrifugation. The obtained suspensions have been intradermic inoculated on white mice in doses of 0.1 ml, 0.2 ml and 0.3 ml. It has been found out that all the 5 stems have been induced death if the administration was more than 1.2 x 10^5 cells and has minimum 18 hours age from incubation.

Key-words: Bacillus cereus, pathogenithy, haemolysins, C phospholipase

Bacillus cereus is a Gram positive, sporogenous, widely spread in natural environment bacterium, rarely involved in determining some infections in humans and other species of animals. The pathogenic strains of Bacillus cereus are also frequently involved in food poisoning outbreaks, due to their capacity of synthesizing, after the multiplication process in different types of food, some metabolites with toxic action, among them being included: enterotoxins, phospholypases, haemolysins and metal proteases tightly correlated with Zn^{++} and stimulated by Ca^{++}. Under the action of synthesized enzymes, in the organic material in which it multiplies takes place the process of forming the biogenic amines, substances that enhance the toxic activity.

It has been also demonstrated that through its coating structure, the spores of Bacillus cereus are able to adhere to the epithelial cells or to other inert materials (also on stainless steel surfaces), due to the hydrophobicity of their spore coating and to the presence on the surface of some filamentous structures similar to piles (scourges).The vegetative forms of some Bacillus cereus strains, especially those able to determine infections in humans and animals or food poisoning outbreaks, possess an additional structure, called S layer. This kind of cells, when reaching the tissues, cannot be destroyed under the action of neutrophils, generating localized infections. Bacillus cereus spores contaminate sometimes the drugs being able to contaminate also lesions and other tissues.

The recent research (4, 5) launches the hypothesis that the responsible genes for the synthesis of the main toxic factors elaborated by the pathogenic Bacillus cereus strains, can be found interrelated with some regulator proteins. The elaboration of these proteins starts in the initial phases of the multiplication process, but for the activation of all genes it is necessary an accumulation of a certain protein quantity of these proteins. Starting from this point, we imagined some experimental modules, on the basis of which to highlight the pathogenicity of some Bacillus cereus strains for mice, taking into account the age of the cultures and the number of inoculated cells.

MATERIAL AND METHODS

The researches have been performed in successive stages. In the first one, from a total number of 120 strains of Bacillus cereus, there have been selected the ones that determined the death of mice through nasal instillation.

Materials: bacterial strains – there have been used 5 strains of Bacillus cereus, pathogenic for the white mouse, producing phospholypase and haemolysins; culture media – heart and brain broth and agar, ram blood agar, yolk emulsion agar and nutritive broth and agar; animals – several consignments of white mice, 5 animals/lot.

Work technique: in the first phase there have been obtained Bacillus cereus subcultures; from each selected strain, maintained as spore suspension in sterile distilled water and preserved at +4°C, there has been performed the spreading in Erlenmeyer flasks of 350 ml, containing 100 ml of heart-brain broth. Each flask has been inoculated with approximate 5000 spores. The inoculation media were introduced at 37°C and stirred occasionally. After 6, 12, 18 and 24 hours of incubation, through bacterioscopic examination, using the Gram dyeing method, it has been verified the purity of the cultures, afterwards these being subjected to centrifuge action at 3500 rpm. The supernatant obtained was draught in a sterile flask, and the sediment was diluted with 10 ml each, from the culture of the same age. From each suspension obtained in this way, there have been inoculated intraperitoneally 5 mice, using 0.1 ml, 0.2 ml and 0.3 ml quantities. The inoculated mice were observed for 5 days, reporting each transformation of their general status.

There have also been used 3 witness plots, each one containing 5 mice, inoculated with 0.1, 0.2 and 0.3 ml of heart-brain broth. From each body of inoculated mice there have been performed bacterial examinations and inoculations on nutritive broth and agar, for isolating again the main strain. Immediately after inoculating the mice plots, from the suspensions were performed counting's on Petri dishes, using the serial decimal dilutions technique, in order to determine the cell concentration, for each suspension and strain.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The investigations' results considering the correlation between the numbers of cells, the age of the cultures and the pathogenicity of Bacillus cereus strains are included in the following tables.

Table no. 1
The development dynamic of cell number considering the age of cultures, for 5 strains of Bacillus cereus

No.	The indicative of the strain	Concentration of cells / ml			
		6 h	12 h	18 h	24 h
1.	312	4×10^2	$3,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$
2.	465	$3,8 \times 10^2$	$5,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$
3.	482	$4,6 \times 10^2$	$5,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	$3,8 \times 10^6$
4.	545	$4,2 \times 10^2$	$6,0 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^6$
5.	556	$4,9 \times 10^2$	$5,8 \times 10^4$	$3,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$

The analysis of data from table no. 1 demonstrates that the multiplication of the 5 Bacillus cereus strains, after inoculation as spores in heart-brain broth and incubation at 37°C in aerobiosis, has evolved in the same parameter limits ($3,8 \times 10^2 – 4,9 \times 10^2$ after incubation for 6 hours; $3,2 \times 10^4 – 6,0 \times 10^4$ after incubation for 12 hours; $1,2 \times 10^5 – 3,4 \times 10^5$ after incubation for 18 hours and $3,0 \times 10^6 – 1,4 \times 10^7$ after incubation for 24 hours).

In order to highlight the existence of some correlations between the cell concentrations, the age of the cultures and the pathogenicity of the strains, there have been constituted several white mice plots, on which the inoculations have been performed as the data included in table no. 2.

After the administration of Bacillus cereus suspensions in the established doses, considering the protocol described before, the inoculated plots were kept under observation, for 5 days. At a short time after the inoculation, the mice from the plots on which there have been administered cultures of 18-24 hours and in doses of 0.2 ml and 0.3 ml have expressed apathy and torpor,

abdominal disorder and sometimes abdominal colic, the symptom remission taking place at 2-3 hours from the inoculation.

The animals from the witness plots, inoculated with nothing but heart-brain broth, have not presented any variation of the general status, and at the end of the observation period have not registered any losses through mortality.

Table no.2
The report between the doses volume and the number of the inoculated cells

No.	The indicative of the strain	Doses / ml	The number of the inoculated cells / animal			
			6 h	12 h	18 h	24 h
1.	312	0,1	40	3.200	12.000	320.000
		0,2	80	6.400	24.000	640.000
		0,3	120	9.600	36.000	960.000
2.	465	0,1	38	5.200	24.000	300.000
		0,2	76	10.400	48.000	600.000
		0,3	114	15.600	72.000	900.000
3.	482	0,1	46	5.600	18.000	380.000
		0,2	92	11.200	36.000	760.000
		0,3	138	16.800	54.000	1.140.000
4.	545	0,1	42	6.000	22.000	420.000
		0,2	84	12.000	44.000	840.000
		0,3	126	18.000	66.000	1.260.000
5.	556	0,1	49	5.800	34.000	1.400.000
		0,2	98	11.600	68.000	2.800.000
		0,3	147	17.400	102.000	4.200.000

The results obtained after the inoculation of the 5 Bacillus cereus strains on the mice (with different doses, with different incubation periods and with different cell concentrations) are included in table no. 3.

Table no. 3
The relation between the inoculums' doses, the age of the cultures and the pathogenicity of Bacillus cereus trains on mice

No.	The indicative of the strain	Doses / ml	The number of dead mice			
			6 h	12 h	18 h	24 h
1.	312	0,1	0 / 5	0 / 5	1 / 5	5 / 5
		0,2	0 / 5	0 / 5	1 / 5	5 / 5
		0,3	0 / 5	0 / 5	2 / 5	5 / 5
2.	465	0,1	0 / 5	0 / 5	1 / 5	5 / 5
		0,2	0 / 5	0 / 5	3 / 5	5 / 5
		0,3	0 / 5	0 / 5	4 / 5	5 / 5
3.	482	0,1	0 / 5	0 / 5	1 / 5	5 / 5
		0,2	0 / 5	0 / 5	2 / 5	5 / 5
		0,3	0 / 5	0 / 5	3 / 5	5 / 5
4.	545	0,1	0 / 5	0 / 5	2 / 5	5 / 5
		0,2	0 / 5	0 / 5	3 / 5	5 / 5
		0,3	0 / 5	0 / 5	4 / 5	5 / 5
5.	556	0,1	0 / 5	0 / 5	2 / 5	5 / 5
		0,2	0 / 5	0 / 5	4 / 5	5 / 5
		0,3	0 / 5	0 / 5	5 / 5	5 / 5

The comparative analysis of these results reveals that the 6 and 12 hours cultures, no matter the cell concentration and the inoculums' doses volume have not determined the death of any animal. Meanwhile, the 18 hours cultures, considering the cell concentration and the volume of the inoculums' doses, determined a mortality rate which varied from20 to 100 %. From the 5 studied strains, 556 strains was carried forth through a high mortality percentage, this being correlated with the fact that the number of cells obtained after 18 hours incubation (3.4×10^5) was the highest, in comparison with the other strains.

CONCLUSIONS

1. The 5 stems of Bacillus cereus haemolysin and C phospholypase producing, have proven to be pathogenic for the white mouse when inoculated intra-peritoneal, with a number higher than $1,2 \times 10^5$ vegetative cells /animal, these coming from cultures with an incubation period of at least 18 hours at 37^oC, in aerobiosis environment.

2. The straight correlation which has been notified, between the pathogenic capacity of Bacillus cereus strains which have been tested, the age of the cultures and the number of cells involved in the population suggest the hypothesis that the synthesis of the metabolites involved in the pathogenic process of this bacterium is related tightly with the accumulation of an activating factor fir the genes involved in expressing the pathogenic potential of the bacterium, in the culture media.

3. For a correct evaluation of B. cereus pathogenity is important to evaluate the factors which are correlated with virulence and toxigenesis.

BIBLIOGRAPHY

1. Anderson A., Granum P.E., Rohnner U. – The adhesion of Bacillus cereus spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. Int. J. Food Microbiol., 1993, 39, pag 93 – 99.
2. Husmark U. et Rhonner U. – Forces involvedin adhesion of B. cereus spores to solid surfaces under environmental conditions. J. Appl. Bacteriol., 1990, 69, pag. 557 – 562.
3. Kotiranta A., Haapasalo M., Kari K., Kerosuo E., Olsen I., Sorsa T., Meurman J.H., Lounatmaa K. – Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis and aderence to matrix proteins of Bacillus cereus cells with and without the crystalline surface protein layer. Infect. Immun., 1998, 66, pag. 4895 – 4902.
4. Kotiranta A., Lounatmaa K. and Haapasalo M.– Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections. Microbes and Infection, 2, 189 – 198, 2000.
5. Lund T., De Buyser M.L., Granum P.E. – A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis. Mol. Microbiol., 2000, 38, pag. 254 – 261.
6. Michelet N. et Mahillon J. – Bacillus cereus, opportuniste et pathogene. Bull. Soc. Fr. Microbiol., 2003, 18, 113 – 122.
7. Nguyen-The C, carlin F., Guinebretiere M.H. – Bacillus cereus et securite des aliments. Bull. Soc. Fr. Micobiol., 2003, 18, pag. 104 – 112.
8. Ţogoe I., Tudor L., Ţogoe D. – Investigaţii privind patogenitatea tulpinilor de Bacillus cereus izolate din lapte praf. Lucr. Şt. Seria C, XLVI – XLVII, 2003 – 2004, Med. Vet., Vol 2, pag. 419 – 425.

THE DETECTION OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* STRAINS IN MILK USING RT-PCR TECHNIQUE

TUDOR L.[1], TOGOE I.[1], TUDOR ANETA LAURA [2], ILIE I. L.[1]
[1]Faculty of Veterinary Medicine Bucharest
[2]Faculty of Veterinary Medicine "Spiru-Haret"

The research has been performed in order to optimize Yersinia enterocolitica diagnosis from milk 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 final stage was conducted in such a way as to develop a methodology of Yersinia identification from naturally contaminated milk samples. As a target-gene there has been used the chromosome gene ail, this being present in the pathogenic strains of Y. enterocolitica. The sample was marked at the 5' end with a report dyeing solution and at the 3' end with an extinction one. The reading was performed at the RT-PCR, with a work protocol consisting of 2 stages, including 45 cycles. This qualitative method demonstrated some specific results with high sensitivity, positive ail gene detection rate in Y. enterocolitica in 140 whole milk samples being of 76 % using PCR and 32 % using culture methods.

Key-words: RT-PCR, milk, Yersinia enterocolitica, ail gene

The timeliness and the general interest aroused by Yersinia spp. are determined by the fact that these bacterial species generate a series of diseases that attract the attention of bacteriologists, epidemiologists and clinicians. There have been published several research articles on this theme, and the studies in this direction developed in amplitude. In the last decade of the former millennium, a great number of researchers put in the highlight the fact that the bacterial species of Yersinia genus are frequently involved in human food poisonings, manifested through acute diarrhea syndrome (3, 10, 13, 15). The available culture methods for Y. enterocolitica detection from food were time-eaters and only sometimes would have given satisfying results. Using the DNA detection methods, like PCR, this pathogenic agent can be quickly and accurately detected. Although clinically Yersinia diseases do not show any specific complications and generally are treated with efficiency, the epidemiological risk is important, consisting of outbreaks with hundreds of cases (3, 8, 11, 12). Initially, Yersinia pestis was the one considered having the most important epidemiological risk (1, 3). Later on, several research groups demonstrated that a higher number of Yersinia species were involved in food poisoning outbreaks (1, 4, 7, 8), some of them being able to determine different diseases and on other animal species also (11). Nowadays, although there have been discovered and registered a larger number of Yersinia species, the main pathogens for humans are: Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica. Taking into account the fact that the contamination sources, for human beings, are represented generally by the food products with no thermal processing or the ones that include short thermal treatments, at a maximum of 70^{o}C, we considered as important the performing of several investigations which would reveal the optimal conservation and development temperatures of Yersinia enterocolitica strains, the survival period of this bacterial species at low temperature values (in refrigerated and frozen products) or at high temperature values (in thermal processed food products).

The traditional methods used to detect Yersinia enterocolitica in food products depend on the toilsome and time-consuming culture methods, taking up to 4 weeks. The bulk of isolated samples from food products and from the samples collected from the environment are not pathogenic. The difficulties are associated with the isolation of Yersinia enterocolitica pathogenic strain, from a very low number of pathogenic strains in samples and the high number of microorganisms from the specific flora, especially in food products and the samples collected from the environment. There are a few virulence determining chromosome and plasmidic factors in Yersinia enterocolitica strains, which were used as a target for conventional PCR techniques. The expression of chromosomal and plasmid genes is necessary for a strong pathogenity, although the virulent plasmid (pYV) is difficult to

maintain during the process of obtaining the culture. One of the necessary chromosomal genes for Y. enterocolitica virulence is an annex attached to invasive locus gene (ail). This gene encodes the Ail membrane associated protein, which facilitates the invasion in eukaryotes and protects Y. enterocolitica from destruction. Moreover, the ail gene is present only in pathogenic strains.

MATERIALS AND METHODS

There has been studied the behavior of different Yersinia enterocolitica strains to various temperatures values. The tests were performed on artificially contaminated food products and also on solid and liquid culture media containing purified strains. The bacterial strains subjected to analysis were isolated from different food product samples or from faeces samples collected from human subjects suffering of acute diarrhea syndrome, identified through biochemical comparative tests and marked by a code. In the first stage there have been obtained young cultures (maximum 24 hours) from purified strains, used for artificial contamination of food products (aquatic products, milk and milk products, meat and meat products), or for spreading on liquid media (alkaline saline peptonated water, glucose saline broth, Mehlman and Aulisio sorbitole-phosphate biliar salts broth, irgasan-tircarcyline-potassium chloride broth produced by De Zuter and co.) or solid ones (Salmonella-Shigella agar, Hektoen Enteric agar, several lactose media, as MacConkey or Drigalski) (8, 11). There have been evaluated, as a sum, 32 bacterial strains. Y. enterocolitica, serotype 4/O:3 isolated from German swine was used as a reference strain in all the optimizing and sensitivity experiments. Yersinia strains were introduced in CIN (cefsulodine-irgasan-novobiocin) agar dishes, incubated at 30^{o}C and other strains in blood agar dishes, incubated at 37^{o}C for 18-20 hours. The DNA extraction procedure used the chelation properties of Chelex resin. A 100 µl quantity from the enrichment media left over the night was centrifuged at 13,000 x rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded and the rest was resuspended in a 50 µl quantity of InstaGene (BioRad), incubated afterwards at 56^{o}C for 30 minutes and at 100^{o}C for 10 minutes. After the centrifugation, the supernatant was carefully transferred in another flask and a 2 µl quantity from this supernatant was used as a pattern.

The RT-PCR test developed in order to detect the positive ail strains of Yersinia enterocolitica used primers as 5' - ACT CGA TGA TAA CTG GGG GAG-3' şi 5'-CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG-3' for ail gene elaborated by Nakajima, with an amplification target on a 170 bp fragment. The hydrolysis sample 5’ was a fluorogenic internally labeled sample with 6-carboxifluorescein at the 5’ end and interrupted with 6-carboxi-tetramethyl-rodamine at 3’ end. The fluorescence was detected using an optical detection system. The data referring to the fluorescence were obtained during the annealing/prolongation stage of each PCR cycle. The software introduces in the graph the relative fluorescence units and the number of PCR cycle in work. The initial step of each cycle, used to determine the abundance of a certain nucleic acid sample, is the number of amplification cycles necessary for the accumulated fluorescence in order to obtain a significantly higher value in comparison with the background one. A higher Ct value of 40 indicated a negative result.

In this study there has been used MasterMix 2X (diagnosis kit with premixed solutions) and the optimal primers, the sample concentrations beinb of 200 nM and 80 nM respectively. The reading was performed on a LightCycler thermo-cycler 2.0 Roche. A 2µl quantity was added over 23 µl of primary mix. The normalizing optimal temperature of 54^{o}C was determined using the degree characteristic included in the thermo-cycler software. The specificity studies were realized using 32 bacterial strains. The Yersinia spp. pure cultures were maintained in BHI broth at 30^{o}C and for other bacterial species at 37^{o}C, for 16-18 hours. The bacterial DNA was extracted from a 1µl quantity of an enrichment media left over night, which was transferred in a 100 µl sterile distilled water and successively boiled for 10 minutes in order to realize the bacteria lysis. A 2 µl quantity from this bacterial suspension was subjected to thermal treatment through boiling and used as a pattern for PCR technique.

The sensitivity studies that used pure cultures of Y. enterocolitica, serotype 4/O:3 were performed in order to identify the detection limit for 5’-nuclease test. The culture was inoculated in 10 ml BHI medium, incubated at 30^{o}C for 18 hours, afterwards being obtained the decimal serial

dilutions in 3 copies and numbered as duplicate using the CIN agar dishes and incubated at 30°C for 18-20 hours. The DNA was isolated from 100 µl from each dilution.

For the inoculation studies, 4 quantities of whole milk 10 m each, were tested in order to verify the absence of Y. enterocolitica strains, mixed with 90 ml TSB broth in sterile mix bags, then inoculated in 5 different levels. For each experiment, a non-inoculated sample was used as control, being obtained positive results in this case (the absence of Y. enterocolitica). The mixing bags were incubated over night (16-18 hours) at 25°C. The enrichment media samples left over night were studied through PCR technique and through culture methods. The DNA was extracted from a 100 µl from the enrichment medium left over night. The culture method included the direct introduction of CIN selective agar in the dishes before the enrichment stage and 2 enrichment stage, the enrichment stage on TSB broth over night and the selective enrichment media with irgasan-tircarcyline-potassium chloride, before introducing the culture in CIN agar dishes.

The naturally contaminated whole milk samples (140 whole fresh cow milk samples) were studied through PCR technique and through classical culture methods. A 10 ml quantity from each sample was homogenized with 90 ml of TSB medium in a bag homogenizer. The mixes were afterwards enriched at 25°C for 16-18 hours and, over night the enrichment was performed, being studied through PCR technique and classical culture methods, as described before.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The sample-based RT-PCR test in order to detect Y. enterocolitica ail-positive strains is a specific one for all the strains with pathogenic potential. Y. enterocolitica strains (10^4 bacteria for a PCR test) which belong to pathogenic serotype showed a positive reaction with Ct values of 25-26, meanwhile the non-pathogenic Y. enterocolitica strains. Yersinia spp., including Y. pseudotuberculosis and other bacterial species showed negative results. The specificity of used primers in this study was tested by Nakajima and co. (14). They obtained similar results for 14 pathogenic strains of Y. enterocolitica, 13 non-pathogenic strains of Y. enterocolitica, 31 for Y. pseudotuberculosis, 11 for Y. frederksenii, 17 for Y. intermedia and other 12 bacterial strains were tested through conventional PCR technique. The lowest detection limit of this PCR test performed in order to identify ail gene of Y. enterocolitica in pure cultures was 10^3-10^4 CFU/ml, because the DNA was extracted from a 100 µl pure culture quantity and a 2 µl quantity used as a pattern. Nevertheless, the detection limit of PCR reaction was 1-10 CFU for a PCR test. These data are correlated with the latest research on the same topic.

There were used naturally contaminated whole milk samples in order to realize a comparison between PCR method and classical culture methods, to demonstrate the sensitivity and specificity of molecular detection method. There has been demonstrated that the detection level of ail-positive Y. enterocolitica strains is evidently higher in PCR method in comparison with the culture introduction, even at low levels of the Ct values ($\leq$ 30). The pathogenic strains of Y. enterocolitica wer isolated from 72 samples without using the enrichment stage and 44 of these samples showed low Ct values ($\leq$ 30), a fact which indicated a high contamination level in milk samples. After incubation enrichment on 16-18 hours period at 25°C, the PCR method was able to detect 1-10 CFU/ml whole milk. The former enrichment stage is normally necessary to raise the sensitivity when studying the naturally contaminated samples. Moreover, the enrichment stage recedes the risk of obtaining some false positive results when using PCR technique, due to the presence of dead cells. The detection rates of ail-positive Y. enterocolitica strains, especially on naturally contaminated milk were very low when performing the two working techniques. A reason for the high number of negative results can be the low number of pathogenic strains existent in these samples. The 2 µl pattern used in this study revealed low values. An alternative considering the raising of the sensitivity could be using a pattern of 5 µl, this being afterwards added to a quantity of 45 µl of primary mix. Another reason for obtaining negative results could be the high number of microorganisms which form the environmental microbial flora. The non-selective enrichment stage used in this research permits the development of all bacteria, this leading to a recession of the sensitivity of this test, if the environmental microbial flora is present in a high concentration. It is demonstrated that a high

external DNA concentration could represent the cause of a negative effect on the amplification efficiency. This could be due to different interactions between the bacterial DNA and PCR reagents. In order to overcome this problem, it can be used a stage of selective enrichment, which doesn't allow the inhibition of the necessary factors for PCR technique.

An explanation for the low detection rates considering PCR technique could be the presence of the enzymes with bactericidal or bacteriostatic effect, and also of other inhibiting substances normally present in milk, fact which leads to false negative results. The DNA extraction procedure used in this study was quick and easy to perform, but not necessarily the most efficient one for removing the inhibiting agents from whole raw milk. An internal positive control has to be used as a stage of this test, in order to monitor the possible false negative results. It has been demonstrated the efficiency of a centrifuge method through density degree, in order to prepare the sample for PCR technique, for direct detection and quantification of Y. enterocolitica strains in whole raw milk samples with inhibiting agents for PCR. The enrichment stage demonstrated that it exists the possibility of inhibiting agents removal from the sample and the prevention of false positive results due to dead cells' DNA.

CONCLUSIONS

The investigation assembly, statistic analysis and biomathemathical interpretation allow the formulation of the next conclusions:

1. The prevalence of Yersinia enterocolitica species in naturally contaminated whole raw milk samples was evidently higher than when using RT-PCR technique in comparison with the culture methods (classical techniques).

2. It has been described a RT-PCR technique for rapid detection and identification of Yersinia enterocolitica pathogenic strains using RT-PCR Light Cycler 2.0 system. This technique is based on a specific fluorogenic sample for ail gene, localized in the chromosome of Yersinia enterocolitica pathogenic strains.

3. There has been imagined a work protocol for detection of Yersinia enterocolitica species presence in whole raw milk samples, a protocol which could be extended for the detection of this species and from other types of food products and from different types of biological products.

4. The molecular detection method developed during our research proved its efficiency in detecting also the milk samples in which the bacterial cells were found destroyed, their presence being impossible to detect through classical bacteriological techniques. This makes possible the optimal evaluation of commercial thermal processed milk, in order to assure the requirements in food safety domain.

BIBLIOGRAPHY

1. Aleksic S., Bockemuhl J.–Overview of phenotipical methods applied for diagnostic and epidemiological study of enteropathogenic Yersinia in Germany, 1993-1997- Nederl. Tijdsch. Med. Microbiol., 1998, supl. II(6),44 .
2. Bhaduri S., Cotrell B. –Screening and direct isolation of plasmid-bearing virulent serotypes of Yersinia enterocolitica from various foods, Nederl. Tijdsch. Med. Microbiol., 1998, supl. II(6),14.
3. Buchrieser C., Weagant S.D., Kaspar C. W. – Molecular characterization of - Yersinia enterocolitica by pulsed – field gel electrophoresis and hybridization of DNA fragments to ail and pYV probes - Appl. Env. Microbiology, 60(12): 4371 – 4379, 1994.
4. Butt H.L., Gordon D.L., Lee-Archer T., Moritz A., Merrell W.H.- Relationship between clinical and milk isolates of Yersinia enterocolitica- Pathology, 23:153-157, 1991.
5. Greenwood M.H., Hooper W.L. –Excretion of Yersinia spp. associated with consumption pasteurized milk. –Epidemiology & Infection , 104(3): 345-350, iun 1990.
6. Greenwood M.H., Hooper W.L., Rodhouse J.C. –The source of Yersinia spp. in pasteurized milk : an investigation at a dairy. –Epidemiology & Infection , 104(3): 351-360, iun 1990.
7. Ibrahim A., Liesac W., Stackebrandt E.– Polymerase Chain Reaction – gene probe detection system specific for pathogenic strains of Yersinia enterocolitica-Journal of Clinical Microbiology, 30(8): 1942 – 1947, 1992.

8. Ibrahim A., Liesac W., Griffith M.W., Robins-Browne R.M. –Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of Yersinia enterocolitica based on PCR amplification of the heat–stable enterotoxin gene (yst)- Journal of Clinical Microbiology, 35(6): 1636–1638, 1997.
9. Iriarte M, Cornelis G.R.– Identification of SycN, YscX and YscY, three new elements of the Yersinia Yop virulon - Journal of Bacteriology,181(2), 675 –680, 1999.
10. Iteman I., Guyole A., Carniel E.–Comparison of three molecular methods for typing and subtyping pathogenic Yersinia enterocolitica strains–Journal of Medical Microbiology, 45(1), 48- 56, iul. 1996.
11. Jourdan A, Johnson S.C., Wesley I.V.– Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the ail gene of pathogenic Yersinia enterocolitica -Appl. Env. Microbiology, 66(9): 3750 – 3755, 2000.
12. Knutsson R., Blixt Y., Lantz P. et al.: Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica in enrichment media by a multiplex PCR- Nederl. Tijdsch. Med. Microbiol., supl. II (6): 39, 1998.
13. Miller V.L., Farmer J.J., Hill W.E. and Falkow S.- The ail locus is found uniquely in Y. enterocolitica serotypes commonly associated with disease- Infect. Immun.: 57, (121), 1989.
14. Nakajima H., Inoue M., Mori T., Itoh K.I., Arakawa E., Watanabe H. –Detection and amplification of Yersinia pseudotuberculosis and pathogenic Yersinia enterocolitica by an improved Polimerase Chain Reaction Method–Journal of Clinical Microbiology: 30(9), 2484-2486, sep. 1992.
15. Pierson D.E., Falkow S.–The ail gene of Yersinia enterocolitica has a rol in the ability of the organism to survive serum killing- Infections & Immunity, 61: 1846, 1993.
16. Schiemann D.A.- Yersinia enterocolitica in milk and dairy products.(Review)–Journal of Dairy Science, 70(2): 383-391, feb. 1987.
17. Schiemann D.A.- Development of a two-step enrichment procedure for recovery of Yersinia enterocolitica from food, Appl. Env. Microbiology, 43(1): 14-27, ian. 1982.
18. Schiemann D.A., Toma S.–Isolation of Yersinia enterocolitica from raw milk, Appl. Env. Microbiology, 35(1): 54-58, ian. 1978.

STUDIU DE CAZ: MAMITA GANGRENOASĂ LA CAPRĂ

CASE STUDY: MASTITIS GANGRENOUS AT GOAT

VELESCU ELENA, SAVUTA GH., TANASE OANA IRINA,
PAVLI C., ANITA ADRIANA, ANITA D.,
PLESCA R., BEJENARU ANA, STRUGARU OANA RALUCA,
RADU P. G.
FMV Iaşi
elenavelescu@yahoo.com

In the last two years, breast gangrene at goats registred higher levels and the evolutional way was gravely, beeing produced by extremely virulent stalks of Staphylococcus aureus.

A goat with breast gangrene was examined, and the disease was found in developed subacute form, with general simptoms and with total gangrene on a half of mamar gland.

With all etiologic, antitoxic and backed treatmens applied during 10 days, the animal died like a response of endotoxic shock; the necropsy beeing identifyed with characteristic lesions of this case and implicitly of breast gangrene.

To reduce the economical wastage, through terapeutical expenses and animal death rate, we advise all experts, that they must interfere precocious (before the ireversible aspects to set in) and to inoculate animals with inactive vaccine.

Key words: mastitis gangrenous, Staphylococcus aureus, goat

În patologia infecţioasă la caprine, focare de mamită gangrenoasă au fost descrise destul de rar.

În ultimii doi ani, având în vedere înmulţirea fermelor private de creşterea caprelor, patologia infecţioasă a devenit din ce în ce mai prezentă la această specie, mamita gangrenoasă fiind una dintre infecţiile glandei mamare care evoluează grav cu gangrena şi pierderea ţesutului glandular mamar uni- sau bilateral.

MATERIALE ŞI METODE DE LUCRU

A fost prezentată la consultaţie în Clinica de Boli infecţioase o capră de rasă comună, în vârstă de 3 ani şi care provenea dintr-o turmă de 15 capre şi iezi.

După luarea anamnezei s-a efectuat examenul clinic, inclusiv termometrierea animalului.

Deoarece animalul mai fusese tratat cu antibiotice, nu am putut face antibiograma, insă din proba de secreţie recoltată din glanda mamară afectată s- a evidenţiat şi izolat *Staphylococcus aureus*.

S-a aplicat un tratament local pe canalul papilar antiinfecţios şi general, antiinfecţios, antitoxic şi de susţinere timp de 10 zile, însă nu s-a produs desprinderea porţiunii necrozate din glanda mamară.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pe parcursul celor 10 zile de evoluţie ale infecţiei, boala a evoluat producându-se necroza jumătăţii afectate a glandei mamare, deshidratare, cianoza extremităţilor, decubit lateral.

Curba termică a demonstrat o evoluţie cu variaţii ale stării generale, alternând perioade de stări hipotermice cu revenirea la normal a temperaturii corporale. În ultimele patru zile temperatura a scăzut până la $36,5^0$ C, (fig. 1), animalul decedând prin şoc endotoxic.

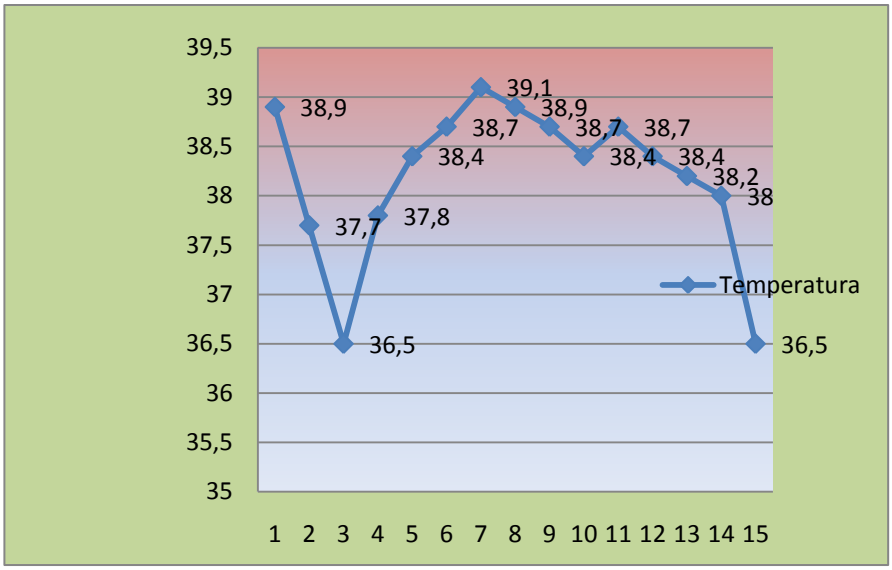


Fig. 1
Curba termică pe parcursul evoluției bolii

Clinic, animalul prezenta un apetit capricios, deshidratare, slăbire pronunțată, în ultima săptămână preferând decubitul, (fig.2).

Fig. 2
Mamita gangrenoasă la capră: aspect clinic

Glanda mamară era mărită în volum în jumătatea stângă, de culoare roşie-vişinie, negricioasă, dură şi insensibilă, iar secreția lactată încetase, din canalul papilar se elimina o secreție redusă, roşietică, (fig. 3).

Fig. 3
Gangrena jumătăţii infectate a glandei mamare

Rezultatul examenului bacteriologic şi bacterioscopic din secreţia roşietică a mamelei afectate a confirmat prezenţa becteriei *Staphylococcus aureus*, (fig. 4).

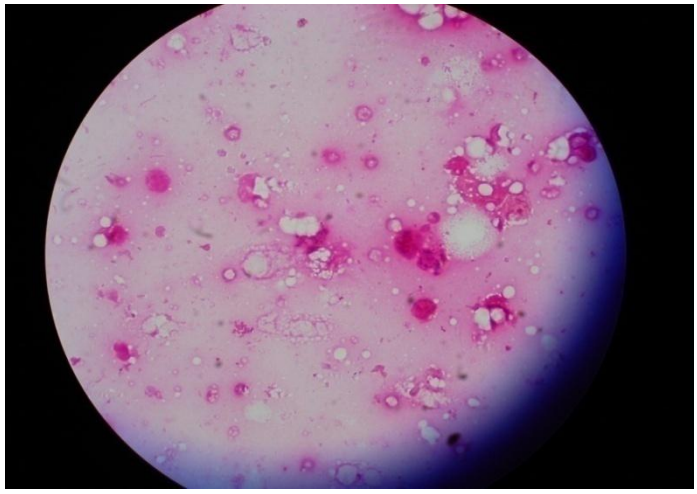


Fig. 4
Frotiu din secreţia mamelei infectate: Staphylococcus aureus, col. Gram x 200

Deşi tratamentul aplicat de noi a fost complex, dar s-a efectuat după apariţia proceselor gangrenoase, ireversibile, iar virulenţa şi toxicitatea tulpinii de *Staphylococcus aureus* erau crescute, evoluţia infecţiei a fost spre exitus.

La examenul necropsic s-au evidenţiat leziuni de necroză a glandei mamare, (fig. 5), hemoragii pe seroase, epi- şi endocardice, hemoragii renale medulare, hepatice şi splenice şi a limfonodurilor inghinale.

Fig. 5
Leziuni de necroză la nivelul glandei mamare

CONCLUZII

1. Diagnosticul de mamită stafilococică s-a putut stabili pe baza aspectelor clinice şi lezionale ale jumătăţii de glandă mamară infectată.
2. Examenul bacterioscopic a evidenţiat prin colorația Gram, prezența bacteriei *Staphylococcus aureus*.
3. Tratamentul complex instituit a fost aplicat după instalarea fenomenelor ireversibile.
4. Animalul a murit în urma şocului endotoxic provocat de toxinele lui *Staphylococcus aureus* , leziunile evidenţiate la necropsie fiind evidente.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ONEŢ E., 1992 – Mamitele infecţioase la animale, Revista Română de Medicină Veterinară, Vol. 2 (1/92), Bucureşti, 55- 65.
2. PERIANU T., MIHAI M., VELESCU ELENA, ARSENI OC., 2000 – Sensibilitatea la antibiotice a florei bacteriene aerobe izolată din mamitele infecţioase la bovine. Cercetări Agronomice în Moldova, Vol. A – 2(115) / 2000, Iaşi.
3. ŢUC I. C., PERIANU T., SAVUŢA GH., VELESCU ELENA, 2002 – Studiul unui episod de mamită gangrenoasă ovină. Lucrări ştiinţifice, Vol 45 (4), Fascicula II. Editura Ion Ionescu De La Brad, Iaşi.

APRECIEREA CALITĂŢII IGIENICE A CARCASELOR DE MIEI SACRIFICAŢI ÎN SISTEM GOSPODĂRESC

QUALITY CONTROL OF LAMB CARCASSES SLAUGHTERED IN THE TRADITIONAL SYSTEM

VLAD - SABIE ALINA, RIMBU CRISTINA, OBADA M. D., CARP CARARE M.
Facultatea de Medicină Veterinară Iaşi

The study was carried out in the 2008-2009 period, on 85 samples of lamb carcasses. We performed the calitative and cantitative bacteriologyc exam. The aim of this study was to show the superficial contamination and the bacteriological profile of the lamb carcasses slaughtered in the traditional system. The samples were collected from the carcasses (after evisceration and chilling from the neck, chest and external region of the ham), by swabbing an area of 100 cm2, with a sterile gauze swab, wich had been moistened with peptone wather. Depending on region of carcass, the total viable counts varied between 5,8- 6,6 log UFC/cm2 after evisceration, and 2,3 - 4,8 log UFC/cm2 after chilling. The bacteriological profile was variated reprezentated by G- and G+ strains. The G- detected strains was: coliforms 82%, E. coli 43%, Proteus spp. 37% and Pseudomonas spp. 29%. The G+ detected strains was: Staphyloccocus spp., Bacillus spp. and Clostridium spp.

Key words: quality control, bacteriological profile, lamb carcasses;

Carnea de miel este un aliment important în cadrul produselor alimentare necesare omului. Din producţia mondială de circa 50 milioane tone anual, carnea de ovine reprezintă 10%, ocupând locul al treilea după carnea de vacă şi viţel (55%) şi după cea de porc (35%). Dacă în unele ţări ca Australia şi Noua Zeelandă consumul de carne de ovine este de 40-42%, în ţara noastră, consumul este destul de redus, reprezentând circa 10 -12% din consumul total de carne. Calitatea cărnii este foarte mult influenţată de sistemul de sacrificare a animalelor, îndeosebi de condiţiile de igienă în care este realizată sacrificarea. Sacrificarea în sistem tradiţional presupune parcurgerea aceloraşi etape ca şi în abatoare, cu diferenţa că că aceste etape sunt realizate de un unul sau doi muncitori. Cele mai importante surse de contaminare a carcaselor sunt reprezentate de materii fecale, conţinut gastric, faringe, lâna animalelor sau din mediul înconjurător prin contactul cu diferite suprafeţe sau mâinile muncitorilor. În timpul sacrificării, carcasele se pot contamina cu microorganime direct prin insuflarea de aer (operaţiune ce facilitează jupuirea), în timpul eviscerării, depozitării prin contactul dintre ele sau indirect prin intermediul echipamentelor, mâinilor muncitorilor, sau aerului.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul s-a realizat pe 85 de probe, recoltate de pe carcase de miei, sacrificaţi în sistem gospodăresc. 43 de probe au fost recoltate după etapa de eviscerare şi 42 de probe după răcire din regiunea gâtului, pieptului şi partea externă a coapsei.

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 ser fiziologic.

Cercetările au urmărit încărcatura microbiană a carcaselor în diferite etape ale sacrificării, precum şi evidenţierea unui profil bacteriologic vizând microflora de contaminare a acestora.

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.

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 detctarea bacteriilor coliforme s-a utilizat metoda de lucru conform **STAS ISO 4831,4832/1992.** Pentru detectarea tulpinilor de *Proteus spp*. şi *Pseudomonas spp*. s-au utilizat medii specifice.

Izolarea tulpinilor de *Staphiloccocus spp.* s-a realizat pe medii speciale: Vogel-Johnoson şi Baird- Parker, 24 de ore la 37ºC iar tulpinile de *Bacillus spp*. au fost izolate pe agar cu gălbenuş de ou şi agar cu sânge.

Pentru identifiarea speciei *Clostridium perfringens* a fost utilizat Standardul European **EN 13401:1999.** Conform acestui standard s-a 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 s-au turnat 10 ml agar TSC (triptoză sulfit cicloserină), menţinut la 45^0C şi s-a amestecat bine cu inoculul rotind uşor fiecare cutie.Când mediul s-a solidificat s-a turnat încă un strat de 10 ml din acelaşi agar şi s-a lasat să se solidifice. Incubarea s-a facut la 37^0C / 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 s-au considerat pozitive.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prezenţa microorganismelor pe carcase poate fi în anumite condiţii periculoasă pentru consumator. Evaluarea microflorei carcaselor, precum şi identificarea etapelor din cadrul procesului de sacrificare, 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 procesului de sacrificare, a furnizat valori cuprinse între 5,8 - 6,6 log UFC/cm^2 după etapa de eviscerare şi 2,3-4,8 log UFC/cm^2 după etapa de răcire. Valorile cele mai mari s-au înregistrat după etapa de eviscerare din regiunea externă a coapsei, iar cele mai mici după etapa de răcire din regiunea gâtului.(tabelul nr.1).

Duffy şi col. (2001), într-un studiu realizat pe carcase de miei , obţine valori de 4,2 -4,5 cfu/cm^2 după etapa de răcire, iar **Zweifwl şi Stephan (2003)** obţin valori mai mici, de 2,5-3,8 cfu/cm^2.

Bhandare şi col. (2007) într-un studiu comparativ, obţine valori de 6, 06 şi 5,13 cfu/cm^2 după etapele de eviscerare şi răcire a carcaselor în abator şi valori mai mari, de 6,4 - 6,1 cfu/cm^2 după aceleaşi etape în cursul sacrificării în sistem tradiţional.

Tabel nr.1

Valorile NTG/cm^2 pe diferite regiuni ale carcaselor de miei pe parcursul procesului de sacrificare

Etapa de scarificare	Regiunea carcasei	Nr. probe examinate	NTG (log UFC/cm^2)		
			Valoare minimă	Valoare maximă	Media
Eviscerare	gât	11	5,6	6,1	5,8
	piept	15	5,4	6,7	6,05
	Partea externă a coapsei	17	6,4	6,8	6,6
Răcire	gât	11	2	2,6	2,3
	piept	15	3,5	5,2	4,3
	Partea externă a coapsei	16	5,2	4,5	4,8

Valorile mari ale NTG după eviscerare 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.

Profilul bacteriologic a evidenţiat o microfloră variată, fiind dominat de microflora fecaloidă. Cele mai ridicate valori le-au înregistrat coliformii fecali (82%), urmaţi de *E. coli* (43%), *Proteus spp*. (37%) şi *Pseudomonas spp*. (29%). Microflora Gram+ a înregistrat valori mai mici: *Staphyloccocus spp*. (21%), *Clostridium spp*. (13 %), iar *Bacillus spp*. (8,2%). Profilul bacteriologic este redat în tabelul nr.2.

Tabel nr. 2

Microflora de contaminare a carcaselor de miei sacrificaţi în sistem tradiţional

Microflora de contaminare	Genul	Nr. probe +	%	Nr. probe -	%
Gram -	Coliformi	69	82%	16	18%
	E. coli	36	43%	49	57%
	Proteus spp.	31	37%	54	63%
	Pseudomonas spp.	24	29%	61	71%
Gram +	*Staphyloccocus spp.*	17	21%	68	79%
	Clostridium spp.	11	13%	74	87%
	Bacillus spp.	6	8,2%	79	91,8%

Phillips şi col. (2004), într-un studiu realizat pe carcase de miei în abator, a detectat o contaminare de 79% cu *E. coli* generică şi 32% cu *Staphyloccocus spp*. iar **Nerasimha şi col.(1992)** identifică tulpini din genurile *Micrococcus, Stahylococcus,* precum şi coliformii fecali, ca microfloră predominantă de abataj.

Bhandare S. şi col. (2007), obţin date diferite în funcţie de tipul de sacrificare: *Staphyloccocus spp.* 50% , *Bacillus spp*. 9%, *Clostridium spp*. 20%, *E. coli* 20%, coliformi 46%, *Pseudomonas spp*., 20%, la carcasele obţinute în urma abatajului şi *Staphyloccocus spp*.80%, *Bacillus spp*. 22%, *Clostridium spp*. 50%, *E. coli* 80%, coliformi 53%, *Pseudomonas spp*. 13% la carcasele obţinute în sistem tradiţional.

Prezenţa *coliformilor*, a *E. coli, Clostridium spp. Staphyloccocus spp* la suprafaţa carcaselor reprezintă indicatori de sanitaţie şi demonstrează nerespectarea etapelor de sacrificare şi îndeosebi a condiţiilor de igienă.

CONCLUZII

1. Studiul a relevat că din punct de vedere microbiologic etapa care contribuie cel mai mult la contaminarea carcaselor sacrificate în sistem tradiţional este eviscerarea.
2. Regiunea cea mai contaminată este reprezentată de partea internă a coapsei (6,6 ufc/cm^2) după eviscerare, iar cea mai puţin contaminată este regiunea gâtului după răcire (2,3 ufc/cm^2).
3. NTG a variat de la 5,8- 6,6 ufc/cm^2 după etapa de eviscerare şi valori mai mici, după etapa de răcire 2,3-4,8 ufc/cm^2 după etapa de răcire.
4. Microflora de contaminare a fost reprezentată atât de specii G – (*coliformi, E. coli, Proteus spp., Pseudomonas spp.*) cât şi de specii G+ (*Staphilococcus spp., Clostridium spp., Bacillus spp.).*

BIBLIOGRAFIE

1. Bărzoi, D., Apostu, S. 2002- Microbiologia produselor alimentare Ed. risoprint, Cluj-Napoca.
2. Bhandare S., Sherikan A. T., Paturkar A. M., Waskar V. S., Zende R.J., 2007 – A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops, Food Contro, Vol.18, 854-858.
3. Carp-Cărare M., Guguianu E., Timofte D., 1997- Lucrări practice de microbiologie veterinară, Uz intern, Iaşi.
4. Duffy E., Safos J., Le Vallery S., Kain M., Tatum J., 2001 – Microbial contamination occuring on lamb carcasses proccesed in United States, Journal of Food Protection, Vol. 64, 503-508.
5. Narasimka D., Ramesch I., 1992 – The microbiology of sheep carcasses proccesed in a modern Indian abattoir, Meat Science, Vol. 32, 425-426.
6. Phillips D., Jordan D., Morris S., Jensen I., Sumner J., 2004 – Microbiological quality of Australian sheep meat in 2004, Meat Science, Vol. 74, 261-266.
7. Şindilar E., Bondoc I., 1998 – Igiena produselor alimentare, Ed. Ion Ionescu de la Brad Iaşi.
8. Zweifwl C., Stephan R., 2003 – Microbiological monitoring of sheep carcasses contamination in three Swiss abattoirs, Journal of Food Protection, Vol. 66, 946-952.

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENŢA AFECŢIUNILOR GENITALE, MAMARE ŞI ACROPODIALE ASUPRA CALITĂŢII NUTRITIVE A LAPTELUI LA BOVINE.

RESEARCHES REGARDING THE INFLUENCE OF GENITAL MAMMARY AND ACROPODIAL DISEASES ON QUALITY NUTRITIONAL OF DAIRY COWS MILK

VOLOSENIUC M.[1], CRETU CARMEN[2], RIMBU CRISTINA [2], CARP CARARE C.[2]
S.C. DORNA LACTATE.S.A.
F.M.V. IAŞI,

The importance of these affections is special, not only economic quality, nutritional, also hygienic.On the past years, the efforts of research are especially focused on obtaining higher productions from animals without paying attention to animals health.

Milk raw material must meet the physical-chemical parameters, imposed by the current legislative, referring to the degree of freshness, fat percentage, protein content, lactose, fatty dry matter, pH, acidity, degree of impurification number somatic cells.

Milk from cows with mastitis has various biochemical changes that were meant to: defatted dry matter, fat, protein, lactose, milk pH and acidity.

Fat in milk due to mastitis decreases damage ability secretion of mammary gland. The effect is more obvious when clinical mamitelor and less obvious when mamitelor subclinice

Media parameters examined compared with the group where the fat was 4.35%, 3.29% protein, 4.93% lactose, S.N.F.8.81% and pH was 6.79% in the vast majority of calculations around lower values.

Key words:pododermatitis, raw milk quality, mastitis, genital affections,

În ultimii ani eforturile de cercetare sunt în special focalizate spre realizarea unor producţii mari de la animale, fără a se acorda prea mare importantă aspectului legat de starea de bine şi sănătate a animalului. Până în prezent au fost efectuate puţine studii referitoare la pierderile economice generate de degradarea stării de sănătate a animalelor, precum şi de calitatea şi siguranţa produselor alimentare de origine animală. Alimentul de origine animală este veriga cheie care face legatura dintre animal şi om, astfel că starea de sănătate a animalului se regăseşte în calitatea alimentului, iar siguranţa alimentară este asociată cu starea de sănătate a omului.

Cercetătorii studiază anumite corelaţii care apar în diferite stări patologice de la vaci şi între parametrii biochimici sanguini şi cei din lapte.

Importanţa acestor afecţiuni este deosebită, atât din punct de vedere economic, calitativ, nutritiv cât şi igienic.

Laptele materie primă trebuie să respecte limitele parametrilor fizico-chimici, impuse de cerinţele lgislative actuale, cu referire la gradul de prospeţime, procent de grăsime, conţinutul de proteină, lactoză, substanţa uscată negrasă, pH-ul, aciditatea, gradul de impurificare, numărul de celule somatice**. (1, 3)**

MATERIAL ŞI METODĂ

Investigaţiile efectuate privind calitatea biologică a laptelui s-au desfăşurat pe parcursul anilor 2008-2009, în cadrul S.C. Dorna Lactate S.A., pe un număr de 100 probe de lapte materie primă.

Materialul de lucru a fost constituit din probe reprezentative de lapte materie primă, atât de la vaci sănătoase, cât şi de la vaci cu diferite afecţiuni (mamite, endometrite şi afecţiuni acropodiale).

Laptele materie primă analizat a provenit de la unele gospodării ale micilor fermieri, care deţin animale producătoare de lapte.

Pentru realizarea obiectivelor menționate, precizăm că s-a lucrat pe lapte recoltat de la specia bovine. S-au luat în studiu câte 5 loturi de animale crescute şi exploatate în condiţii similare, un lot de animale sănătoase, la care s-a făcut raportarea, fiind lotul de referință pentru toți parametrii studiați, şi 4 loturi de vaci cu afecțiuni ale glandei mamare (mamite subclinice şi clinice), afecțiuni ale endometrului (endometrite) şi afecțiuni acropodiale (pododermatite).

Aceste loturi au rămas identice şi neschimbate pe toată perioada de monitorizare, reprezentată de un sezon de lactație.

Pentru examenul calității biologice a laptelui examinat, s-a apelat la dotarea tehnică de care dispune laboratorul uzinal al Grupului DORNA – LACTATE S.A., şi anume:

Compoziția chimică a laptelui s-a determinat pe probe multiple cu ajutorul unui aparat de analiză de tip „ Bentley 150" determinându-se procentul de grăsime, procentul de proteină, procentul de lactoză şi procentul de substanță uscată degresată din lapte.

Celelalte analize s-au efectuat după tehnicile curente din industria laptelui respectiv determinarea acidității prin metoda Thörner şi determinarea pH-ului **. (2)**

REZULTATE ŞI DISCUȚII

Laptele conține componente din fiecare cele cinci grupe alimentare de bază: vitamine, minerale, glucide, proteine, lipide. Din punct de vedere nutrițional, laptele este un aliment complex, consumat sub o mare varietate de forme. **(1)**

Rolul major în obținerea unui lapte materie primă de calitatea impusă de Normativele Uniunii Europene este atribuit sistemului de creştere a animalelor dar totodată şi stării de sănătate a lor.

În România predomină la ora actuală modul de recoltare a laptelui materie primă din microferme, în cea mai mare parte acestea fiind de fapt gospodăriile particulare cu un număr destul de mic de animale producătoare de lapte.

În perioada studiată procentul de grăsime la lotul de vaci sănătoase a prezentat variații destul de mici, cele mai ridicate valori fiind de 5.30% , având valori medii de 4.35%.

Pe toată perioada procentul de proteină din lapte variază în limite foarte reduse, cele mai ridicate valori fiind de 3.59% , având valori medii de 3.29%, iar procentul de lactoză având o medie de 4.93%.

Substanța uscată este influențată de proporția în care se găsesc proteinele, lactoza şi sărurile minerale în lapte.

Din cele prezentate se observă că substanța uscată negrasă înregistrează o valoare medie de 8.81%

Tabelul.nr.1.
Valorile unor parametrii biochimici ai laptelui provenit de la vaci sănătoase

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot martor
% GRĂSIME	3.59	5.30	4.35
% PROTEINĂ	2.42	3.59	3.29
% LACTOZĂ	4.59	5.02	4.93
S.U.D. %	7.89	9.21	8.81
pH	6.75	6.81	6.79
^{0}T	15.0	15.5	15.0

Scăderea producţiei de lapte este una din cele mai importante consecinţe economice a mastitelor. După unii autori producţia de lapte scade, în funcţie de intensitatea procesului inflamator, de la 5 % - în cazul mastitelor subclinice până la întreruperea secreţiei lactate - în cazul mastitelor clinice cu evoluţie gravă. **(1, 6, 7)**

Cercetările privind modificările pe care starea de mamită le induce laptelui au fost efectuate pe un număr de 40 vaci de care 20 cu mamită subclinică, iar altele 20 de vaci au prezentate simptome clinice de mamită.

În cazul laptelui de mamită conţinutul de grăsimi scade datorită afectării capacităţii de secreţie a glandei mamare. Efectul este mai pregnant în cazul mamitelor clinice şi mai puţin evident în cazul mamitelor subclinice.

Tabelul.nr.2.
Valorile unor parametrii biochimici ai laptelui provenit de la vaci cu mamită subclinică

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot exper. 1.1	Media Lot martor
% GRĂSIME	3.14	4.33	4.13	4.35
% PROTEINĂ	3.12	3.90	3.60	3.29
% LACTOZĂ	4.53	5.13	4.77	4.93
S.U.D. %	8.77	9.38	9.13	8.81
pH	6.75	6.80	6.78	6.79
^{0}T	15.0	16	15.5	15.0

Tabelul.nr.3.
Valorile unor parametrii biochimici ai laptelui provenit de la vaci cu mamită clinică

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot exper. 1.2	Media Lot martor
% GRĂSIME	3.14	4.29	3.75	4.35
% PROTEINĂ	3.12	4.02	3.78	3.29
% LACTOZĂ	4.27	4.98	4.58	4.93
S.U.D. %	8.77	9.47	9.22	8.81
pH	6.75	6.80	6.77	6.79
^{0}T	15.0	16	15.5	15.0

În cazul studiului de faţă valorile conţinutului de grăsime se înscriu în limite normale, dar dacă se ia în calcul scăderea producţiei de lapte datorată procesului inflamator, are loc o concentrare a constituenţilor laptelui, inclusiv a grăsimilor, care maschează reducerea conţinutului de grăsimi a laptelui.

Variaţia conţinutul de grăsimi al laptelui privită individual nu constituie un indicator important al stării de sănătate glandei mamare deoarece variaţiile normale, în limite foarte largi, pot face să pară normale variaţiile datorate stării de mamită.

O altă categorie de afecţiuni care influenţează calitatea biologică a laptelui sunt endometritele. Endometritele sunt cele mai frecvente infecţii ale uterului apărând de cele mai multe ori în perioada puerperală.

La probele examinate conţinutul de grăsime a variat între 5,47% şi 2.67%, în medie fiind de 3.59%, în comparaţie cu lotul martor de vaci sănătoase(4,35%), se observă o scădere a conţinutului de grăsime.

În cazul proteinelor valorile de la vacile cu endometrită s-au menţinut la o medie de 3,14, mai scăzută decât media de la vacile sănătoase, acest fenomen fiind observat şi în cazul valorilor lactozei, a S.U.D., a pH-ului. Aciditatea s-a menţinut în limite normale.

Tabelul.nr.4.
Valorile unor parametrii biochimici ai laptelui provenit de la vaci cu endometrită

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot exper. 2	Media Lot martor
% GRĂSIME	2.67	5.47	3.59	4.35
% PROTEINĂ	2.47	3.82	3.14	3.29
% LACTOZĂ	3.56	5.11	4.79	4.93
S.U.D. %	7.88	9.24	8.69	8.81
pH	6.47	6.80	6.67	6.79
^{0}T	15	22.5	16	15.0

Statisticile şi experienţa specialiştilor în ultimele decenii relevă faptul că nivelul cel mai ridicat de îmbolnăviri ale membrelor se înregistrează la rasele ameliorate, şi în special la vacile de mare producţie**. (6)**

La probele examinate de lapte de la vacile cu pododermatită conţinutul de grăsime a variat între 3.20% şi 2.26%, în medie fiind de 2.74%, în comparaţie cu lotul martor de vaci sănătoase unde media se situa în jurul valorii 3.59%. Se observă o scădere majoră a conţinutului de grăsime.

Rezultatele obţinute în urma determinărilor ne arată în cazul afecţiunilor acropodiale severe modificări a calităţii biologice şi nutritive a laptelui fiind afectaţi toţi parametrii examinaţi.

Tabelul.nr.5.
Valorile unor parametrii biochimici ai laptelui provenit de la vaci cu podormatită

Parametrul	**Valoare minimă**	**Valoare maximă**	**Media Lot exper. 3**	**Media Lot martor**
% GRĂSIME	**2.26**	**3.20**	**2.74**	**4.35**
% PROTEINĂ	**2.73**	**3.25**	**2.99**	**3.29**
% LACTOZĂ	**4.78**	**5.18**	**4.99**	**4.93**
S.U.D. %	**8.35**	**9.00**	**8.70**	**8.81**
pH	**6.60**	**6.80**	**6.78**	**6.79**
^{0}T	**15.5**	**17.0**	**15.0**	**15.0**

CONCLUZII

1. Laptele provenit de la vacile cu mamită a prezentat diverse modificari biochimice care s-au referit la : substanţa uscată degresată, conţinutul de grăsime, proteine, lactoză, pH-ul laptelui, şi aciditate.

2. . Conţinutul de grăsimi în cazul laptelui de mamită scade datorită afectării capacităţii de secreţie a glandei mamare. Efectul este mai pregnant în cazul mamitelor clinice şi mai puţin evident în cazul mamitelor subclinice.

3. Variaţia conţinutului de grăsimi al laptelui privită individual nu constituie un indicator important al stării de sănătate glandei mamare deoarece variaţiile normale, în limite foarte largi, pot face să pară normale variaţiile datorate stării de mamită.

4. Variaţiile parametrilor examinaţi în cazul probelor de la vaci cu mamită, endometrite şi pododermatite apar semnificativ modificaţi faţă de lotul martor de vaci sănătoase.

5. Aciditatea dintre toţi parametrii determinaţi s-a păstrat în limite normale.

6. Media parametrilor examinaţi comparativ cu lotul martor unde: grăsimea a fost 4.35%; proteina 3.29%, lactoza 4.93%, S.U.D. 8.81% şi pH-ul 6.79% s-a situat la marea majoritate a determinărilor în jurul unor valori mai scăzute.

7. În cazul laptelui provenit de la vaci cu mamită subclinică media pentru grăsime a fost de 4.13%; proteina 3.60%, lactoza 4.77%, S.U.D. 9.13% şi pH-ul 6.78%.

8. În cazul laptelui provenit de la vaci cu mamită clinică media pentru grăsime a fost de 3.75%; proteina 3.78%, lactoza 4.58%, S.U.D. 9.22% şi pH-ul 6.77%.

9. În cazul laptelui provenit de la vaci cu mamită clinică media pentru grăsime a fost de 3.75%; proteina 3.78%, lactoza 4.58%, S.U.D. 9.22% şi pH-ul 6.77%.

10. În cazul laptelui provenit de la vaci cu endometrite media pentru grăsime a fost de 3.59%; proteina 3.14%, lactoza 4.79%, S.U.D. 8.69% şi pH-ul 6.67%.

11. În cazul laptelui provenit de la vaci cu endometrite media pentru grăsime a fost de 2.75%; proteina 2.99%, lactoza 4.99%, S.U.D. 8.70% şi pH-ul 6.78%.

BIBLIOGRAFIE

1. Bondoc Ionel (2007) - Tehnologia şi controlul calităţii laptelui şi produselor lactate ,Vol.I. Ed. “Ion Ionescu de la Brad” Iaşi
2. Bondoc I., Şindilar E.V. - Controlul sanitar veterinar al calităţii şi salubrităţii alimentelor. Vol. I., 2002, Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
3. Brouillet P. (2001) - La qualite du lait et la securite des produits laitiers en France. Conference "Lait", Rzeszow, 20- 22 septembre.
4. Ciotău C, Şindilar E., Bondoc L, Şindilar E.V. (2002) - Observaţii privind principalii componenţi ai laptelui colectat din bazinul Dornelor pentru procesare în produse lactate. Lucrări ştiinţifice, voi. 45 (4), pag. 724-727, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Iaşi.
5. Ellis K, Innocent G, Grove-White D, Cripps P, McLean W G, Howard CV and Mihm M (2006) Comparing the Fatty Acid Composition of Organic and Conventional Milk’, Journal of Dairy Science , 89: 1938:1950
6. Mihaiu M., Mihaiu Romolica (1998) - Laptele şi controlul calităţii sale. Editura Risoprint, Cluj-Napoca.
7. Runceanu L. – coordonator, Dan Drugociu, Petru Roşca, Cornel Anton, 2002 – „Reproducţie, obstetrică şi andrologie clinică”, Casa de Editură Venus, Iaşi , ISBN 973-8174-62-7, 216 pag.

INFLUENŢA AFECŢIUNILOR GENITALE, MAMARE ŞI ACROPODIALE ASUPRA CALITĂŢII IGIENICE LAPTELUI LA BOVINE.

THE INFLUENCE GENITAL, MAMMAR AND ACROPODIAL AFEECTIONS ON HYGIENIC QUALITY OF RAW MILK FROM DAIRY COWS

VOLOSENIUC M.[1], CRETU CARMEN[2], RIMBU CRISTINA [2], CARP CARARE C.[2]
S.C. DORNA LACTATE.S.A.
F.M.V. IAŞI,

It is observed, more and more, consumers preocupation for a milk that is satisfactory not only for quantitativ desideratum, but specially for hygienic quality (health state).

It is accepted to be consumed only that milk which respects the limits of determined germs number, a established cells number, a milk without additional water, with well precised acidity values, etc.

All these conditions weren't easily imposed, being need a restrictive legislation, scientifical fundamented, to convince the producers and milk processors, that quality indicators of hygienical quality must pass compulsory before quantity index, when is about milk consumption and health.

To establish milk quality in function of somatic cell number and total germs number from milk, it's necesary to be identified the factors that have influence over their content in milk and, what are the economical losses produced by cells and germs high level.

S.C.N./ ml is around the value of <300.000/ml for a healthy cow, and the interval between 300.000/ml fall 450.000/ml milk in a milk uncertain, and values over 450.000/ml lead to milk that assessment as suspect.

Key Words. raw milk, hygienical quality, of somatic cell numbe, total germs number

Calitatea igienică laptelui nu este legată de conținutul de grăsime şi proteină ci de următorii parametri :- flora microbiană şi celule somatice**.(1,2)**

Nivelul celulelor din lapte este un indicator de calitate igienică, care capătă o importanță din ce în ce mai mare. În multe țări a fost scoasă în evidență corelația între nivelul de celule şi producția de lapte.

Numărarea celulelor somatice din lapte a fost generalizată în ultimii ani în tot mai multe țări, constituind o realizare importantă în domeniul controlului calității igienice laptelui şi dobândind o largă recunoaştere**.(1, 5)**

Se impune cunoaşterea reală a calității igienice a laptelui, materie primă şi studierea lui prin parametrii de apreciere în directă concordanță cu sursele de depreciere şi cu exigentele norme ale Comunității Europene.

În laboratoarele de control igienic a laptelui, se admit la ora actuală pentru evaluarea calității igienice a laptelui şi gestionarea mamitelor, unii parametri specifici: numărul de celule somatice, NTG, punctul crioscopic, conductibilitatea electrică şi identificarea inhibitorilor**.(2)**

Cercetările ultimilor zece ani referitoare la calitatea igienică a laptelui, au proliferat mai ales în domeniul monitorizării numărului de celule din lapte, stabilindu-se grile de calitate pentru laptele de consum în funcție de numărul de celule pe mililitru. Aceste cercetări au influențat deciziile factorilor economici din domeniul prelucrării şi valorificării laptelui, astfel încât toate reglementările Comunității Europene elaborate după aprilie 1990 au ajuns să interzică colectarea laptelui de vacă la care se depăşeşte 400.000 de celule/ml.

MATERIAL ŞI METODĂ

Prelucrarea probelor de lapte s-a efectuat în laboratorul de analize al fabricii Dorna Lactate S.A.

Probele s-au recoltat în flacoane sterile de 100 ml. Pe fiecare tub s-a notat numărul matricol.

Pentru realizarea obiectivelor menţionate, precizăm că s-a lucrat pe lapte recoltat de la specia bovine. S-au luat în studiu câte 5 loturi de animale crescute şi exploatate în condiţii similare, un lot de animale sănătoase, la care s-a făcut raportarea, fiind lotul de referinţă pentru toţi parametrii studiaţi, şi 4 loturi de vaci cu afecţiuni ale glandei mamare (mamite subclinice şi clinice), afecţiuni ale endometrului (endometrite) şi afecţiuni acropodiale (pododermatite).

În cadrul laboratorului am determinat NTG-ul pentru laptele de vacă, materie primă folosind aparatul de determinare rapidă: Bactocount 50 şi Somacount care face parte din categoria aparatelor care utilizează o tehnică microscopică automată şi îmbunătăţită de numărare a celulelor

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La nivel naţional a fost conceput un program de acţiuni menite să îmbunătăţească calitatea şi salubritatea laptelui materie primă, astfel încât acesta să fie în conformitate cu standardele înscrise în Normele sanitar veterinare privind condiţiile de sănătate a laptelui crud.

Astfel sunt stabilite IV etape:

- Etapa a-I-a – martie 2004 – 31 decembrie 2004 a avut drept scop asigurarea codiţiilor igienice, asigurând capacitatea analitică a laboratoarelor, constituirea bazei de date pentru monitorizarea parametrilor de calitate ai laptelui materie primă.
- Etapa a-II-a –1 ianuarie 2005 - 31 decembrie 2006 a constat în reducerea N.T. G. /ml la o valoare mai mică de 1 milion şi a N.C.S. /ml la o valoare mai mică de 600.000.
- Etapa a-III-a –1 ianuarie 2007 - 31 decembrie 2008 a constat în reducerea N.T. G. /ml la o valoare mai mică de 500.000 şi aN.C.S. /ml la o valoare mai mică de 400.000.
- Etapa a-IV-a –1 ianuarie 2009 - 31 decembrie 2010 vizează reducerea N.T. G. /ml la o valoare mai mică de 100.000 şi aN.C.S. /ml la o valoare mai mică de 400.000**.(1,5)**

Tabelul nr. 1.
Valorile parametrilor NCS ş NTG din laptele colectat de la vaci sănătoase

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot martor
NCS /ml x 1000	2	175	56
NTG /ml x 1000	10	212	78

Celulele somatice din lapte sunt reprezentate de celule specializate ale sistemului imunitar, în principal, de neutrofile, limfocite şi macrofage care ajung în lapte traversând bariera sanguină. Ele se mobilizează în număr mare în special în cazul agresiunilor bacteriene la nivel mamar. În lapte mai apar în proporţie redusă (0-9%) celule epiteliale cu origine în epiteliul mamar, fără impact major asupra însuşirilor laptelui**.(4,5, 6)**

Când se face referire la celulele somatice din lapte se iau în calcul numai leucocitele. Acestea sunt celule inflamatorii, iar prezenţa lor în număr mare în secreţia lactată semnifică un proces inflamator acut sau cronic al glandei mamare, proces care va altera însuşirile secretorii ale epiteliului mamar.

Pentru îmbunătățirea calităților igienice ale laptelui este necesar un control eficient pentru depistarea vacilor cu infecții intramamare.

Tabelul nr. 2.
Valorile parametrilor NCS ş NTG din laptele colectat de la vaci cu mamită subclinică

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot exper.1.3	Media Lot martor
NCS /ml x 1000	439	2430	2052	56
NTG /ml x 1000	85	1742	1423	78

Numărul de celule somatice în cazul mamitelor clinice şi subclinice este semnificativ crescut, valorile medii find între 2052 şi 2315, fiind mai crescut în cazul mamitelor clinice, unde se pot observa şi modificări asupra glandei mamare.

Tabelul nr. 3.
Valorile parametrilor NCS ş NTG din laptele colectat de la vaci cu mamită clinică

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot exper.1.4	Media Lot martor
NCS /ml x 1000	549	2546	2315	56
NTG /ml x 1000	406	1735	1317	78

Afecțiunile genitale la vacă reprezintă un factor de plecare în diseminarea agenților etiologici în alte organe şi sisteme. Sfera genitală alături de glanda mamară este considerată un complex unitar din punct de vedere endocrin, dar şi al relațiilor morfofuncționale.

Tabelul nr. 4.
Valorile parametrilor NCS ş NTG din laptele colectat de la vaci cu endometrite

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot exper.2.1	Media Lot martor
NCS /ml x 1000	8	171	80	56
NTG /ml x 1000	4	510	45	78

Având în vedere că endometritele sunt afecțiuni ale uterului, din cercetările efectuate a rezultat o menținere a parametrilor în limitele standardului în vigoare.

Incidența îmbolnăvirilor acropodiale, raportată în literatura de specialitate este de 23,4%, cu limite între 2- 100%.

Afecțiunile acropodiale reprezintă un agent stresor, literatura de specialitate relevând oscilații ale concentrației de progesteron şi cortizol.

Afecţiunile la taurine implică o patologie destul de complexă, deoarece este afectată şi starea generală a animalului Vlăduţiu şi colab., 1971, remarcă importanţa integrităţii morfofuncţionale a ongloanelor pentru producţia de lapte a taurinelor**.(6,7)**

Tabelul nr. 5.
Valorile parametrilor NCS ş NTG din laptele colectat de la vaci cu pododermatite

Parametrul	Valoare minimă	Valoare maximă	Media Lot exper.3.1	Media Lot martor
NCS /ml x 1000	2	121	75	56
NTG /ml x 1000	5	45	11	78

CONCLUZII

1. Numărul de celule somatice din laptele vacilor cu uger sănătos variază în intervalul de valori maxime – minime în funcţie de vârstă, starea fiziologică a glandei mamare
2. Diagnosticul mamitelor incipiente s-a făcut prin aprecierea parametrului N.C.S./ml , care a fost determinat prin utilizarea analizatorului automat Somascop (SR-ISO-13366-3/2001)
3. N.C.S. –ul /ml se situează în jurul valorii de < 300.000/ml pentru o vacă sănătoasă, intervalul dintre 300.000/ml şi 450.000/ml încadrează laptele într-un lapte dubios, iar valorile peste 450.000/ml duce la aprecierea laptelui respectiv ca fiind suspect.
4. NCS/ml şi NTG/ml are valori ridicate în cazul mamitelor subclinice, cu o medie de 2052 pentru NCS/ml şi o medie de 1423 pentru NTG/ml, faţă de lotul martor unde aceste valori s-au situat la 56 pentru NCS/ml şi 78 pentru NTG/ml.
5. NCS/ml şi NTG/ml are valori ridicate în cazul mamitelor clinice, cu o medie de 2315 pentru NCS/ml şi o medie de 1317 pentru NTG/ml, faţă de lotul martor unde aceste valori s-au situat la 56 pentru NCS/ml şi 78 pentru NTG/ml.
6. NCS/ml şi NTG/ml are valori fără modificări majore în cazul endometritelor, cu o medie de 80 pentru NCS/ml şi o medie de 45 pentru NTG/ml, faţă de lotul martor unde aceste valori s-au situat la 56 pentru NCS/ml şi 78 pentru NTG/ml.
7. NCS/ml şi NTG/ml are valori fără modificări majore în cazul pododermatitelor, cu o medie de 75 pentru NCS/ml şi o medie de 11 pentru NTG/ml, faţă de lotul martor unde aceste valori s-au situat la 56 pentru NCS/ml şi 78 pentru NTG/ml.

BIBLIOGRAFIE

1. Bondoc Ionel (2007) - Tehnologia şi controlul calităţii laptelui şi produselor lactate ,Vol.I. Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iaşi
2. Bondoc I., Şindilar E.V. - Controlul sanitar veterinar al calităţii şi salubrităţii alimentelor. Vol. I., 2002, Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
3. Brouillet P. (2001) - La qualite du lait et la securite des produits laitiers en France. Conference "Lait", Rzeszow, 20- 22 septembre.
4. Carp-Cărare M. (2000) - Microbiologie veterinară. Voi. 1, 2. Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi
5. Mihaiu M., Mihaiu Romolica (1998) - Laptele şi controlul calităţii sale. Editura Risoprint, Cluj-Napoca.
6. Runceanu L. – coordonator, Dan Drugociu, Petru Roşca, Cornel Anton, 2002 – „Reproducţie, obstetrică şi andrologie clinică", Casa de Editură Venus, Iaşi , ISBN 973-8174-62-7, 216 pag.
7. Vlăduţiu O., Savu A.,(1971)- Infecţii para şi periosoase podale şi efectele asupra productivităţii animalelor- Lucrări Ştiinţifice , Instit. Agronomic, Bucureşti , editura Agrosilvică , vol.VII, 137

IDENTIFICAREA SEROLOGICĂ A BIOTIPURILOR DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, IZOLATE DE PE CARCASE DE BOVINE, OVINE, PORCINE ŞI PĂSĂRI

SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF BIOTYPES OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATED FROM CARCASSES OF CATTLE, SHEEP, SWINE AND POULTRY

Sibeche Gabriela, Rîmbu Cristina, Carp-Cărare C., Creţu Carmen, Carp-Cărare M.
UŞAMV *Ion Ionescu de la Brad,* FMV Iaşi

The identification of biotypes of Clostridium perfringens aims to prioritize the most common serotypes isolated from 160 carcasses from several species of animals and birds. These are distinguished by the composition of a toxin that develops and shows that the reaction by the serum neutralization with sera antitoxic of biotype by animal species that infects and morbid entity that determines.

There was examined 18 strains of Clostridium perfringens isolated from carcasses of cattle, sheep, pigs and poultry, after washing stage technology. Thus, in cattle have been identified 7 strains of Clostridium perfringens, being placed in biotype A (3 strains), biotype E (2 strains), C and D only a strain. From the pig carcasses were isolated 6 strains which were placed in biotype A (3 strains) and biotype C (3 strains). The three strains of Clostridium perfringens isolated from sheep carcasses were placed in biotype D (2 strains) and A (a strain). From the birds carcasses, the 2 strains were isolated from the skin of the neck area and there was included in biotype A and C.

The presence in a large number of biotypes A, C, D and the fact that they produce enterotoxine, it alerts us on the occurrence of the possible toxic infection caused by consumption of meat from such carcasses, untreated sufficiently.

Keywors: Clostridium perfringens, biotypes,carcasses

Microorganismele din genul *Clostridium* sunt bacterii anaerobe, ubicvitare iar prezenţa sporilor ca forme de rezistenţă, duc la o permanentă contaminare a cărnii de măcelarie şi a carcaselor de pasări. (2)

Clostridium perfringens işi manifestă patogenitatea atât la animale cât şi la om, anaerobiozele fiind întâlnite la toate speciile.(1,2) Toate acestea creează condiţii care implică cel mai des carnea, în toxiinfecţii alimentare cu *Clostridium perfringes*. (1) Capacitatea de a elabora una sau mai multe dintre toxinele majore constituie criteriul de clasificare a tulpinilor de Cl.perfringens în biotipuri. (2,4,5)

Există 5 bioptipuri *de Cl. perfringens*: A, B (B1, B2), C (C1, C2, C3, C4, C5), D si E. In literatura de specialitate mai este menţionat şi biotipul F care, a fost reincadrat in tipurile C4 şi C5. (1,2,3,6)

Clostridium perfringens produce 12 exotoxine care reprezintă factorul principal de patogenitate.Astfel, exotoxinele majore, pe baza cărora se fac încadrările în biotipuri, sunt reprezentate de *α toxina* –acţiune necrotizantă, hemolitică; *β toxina*- acţiune necrotizantă; *ε toxina* – creşte permeabilitatea membranelor celulare*; ι toxina* – dermonecrotică; şi o serie de alte exotoxine minore reprezentate de *δ toxina* – (hemolizină),*ϑ toxina* (hemolizină, citolitică); *κ toxina*-(colagenază, gelatinază, necrotizantă); *λ toxina* (protează), *μ toxina* (hialuronidază); *ν toxina* (dezoxiribonuclează, leucocidină, hemolitică, necrotizantă), *enterotoxină* (citotoxică), *neuraminidază*; (determină hemoliză, trombocitopenie, lezarea endoteliului capilar).(1,3)

Biotipurile A, C şi D elaborează enterotoxine şi sunt implicate cel mai frecvent în toxiinfecţii alimentare.(2,4,5)

Enterotoxina este un polipeptid care se găseşte în structura sporilor. Nu este degradată de tripsină sau chemotripsină, dar este termolabilă. Ea se leagă la nivelul marginii în perie şi creşte permeabilitatea membranei celulare calciu-dependentă efectul fiind pierderea metaboliţilor cu greutate moleculară mică şi a ionilor. Aceasta determină tulburarea metabolismului intracelular, scade sinteza substanţelor macromoleculare, ceea ce duce la liză celulară. Enterotoxina acţionează ca superantigen şi determină eliberare masivă de mediatori ai inflamaţiei.(2,3,4,5)

MATERIAL ŞI METODA

S-au examinat câte 60 de carcase de bovine, ovine, suine si păsări.

Au fost izolate şi identificate după etapa tehnologică de spălare a carcaselor, un numar de 18 tulpini de *Clostridium perfringens.* Etapa de izolare şi identificare biochimică a tulpinilor izolate au constituit obiectul unor studii anterioare.

Tipurile de *Cl. perfringens* au fost determinate prin testul de seroneutralizare.

Tehnica constă în punerea în contact a supernatantului obţinut din cultura în bulion nutritiv cu seruri specifice de biotip (A, B, C, D, E) şi inocularea intravenoasă la perechi de soricei albi. Rezultatele s-au interpretat pe baza observaţiei animalelor inoculate, pe parcursul a 3 zile. Dacă toxina a corespuns tipului de ser utilizat pentru neutralizare, şoriceii rezistă, în caz contrar, moartea survine în maxim 10 ore.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Diversitatea biotipurilor izolate reise din tabelul nr1.

Tabel nr. 1
Incadrarea biotipurilor izolate

Nr. Crt	Specia	Număr tulpini testate	Biotipuri identificate									
			A		**B**		**C**		**D**		**E**	
			nr	%	nr	%	nr	%	nr	%	nr.	%
1	BOVINE	7	3	42,8	-	-	1	14,3	1	14,3	2	28,6
2	OVINE	3	1	33,3	-	-	-	-	2	66,6	-	-
3	PORCINE	6	3	50	-	-	3	50	-	-	-	-
4	PASARI	2	1	50	-	-	1	50	-	-	-	-
	TOTAL	**18**	**8**	**44,5**	**-**	**-**	**5**	**27,8**	**3**	**16,6**	**2**	**11,2**

Analiza tabelului nr. 1 pe specii, relevă faptul că, de pe carcasele bovine s-au izolat 7 tulpini de Clostridium perfringens, de pe cele porcine, 6 tulpini, de la ovine 3 tulpini respectiv 2 tulpini de la păsări.

Tulpinile de Clostridium perfringens izolate de la bovine au predominant numeric (total 7 tulpini) fiind încadrate în biotipul A - 3(42,8%) tulpini, biotipul E - 2(28,6%) tulpini, biotipurile C şi D câte o tulpină.

De pe carcasele porcine, cele 6 tulpini izolate au fost identificate ca aparţinând biotipului A- 3(50%) tulpini şi biotipului C- 3(50%) tulpini.

Tulpinile de Clostridium perfringens izolate pe pe carcasele de ovine, s-au încadrat în biotipurile D-2(66,6%) tulpini şi A- o tulpină (33,4%).

De la păsări cele 2 tulpini izolate din zona pielii gâtului au fost încadrate în biotipurile A (50%) şi C (50%).

Din analiza de ansamblu a datelor obţinute reiese că din totalul tulpinilor izolate, predomină biotipul A- 8 (44,5%) tulpini şi biotipul C- 5(27,8%) tulpini, biotipurile D -3 (16,6%)tulpini şi E- 2(11,2%) tulpini, fiind izolate mai rar. De pe carcasele luate în studiu, nu s-a identificat nicio tulpină biotip B. Absenta biotipului B şi prezenţa în număr redus a biotiopurilor D şi E, denotă faptul că etapele sacrificarii animalelor s-au derulat în condiţii tehnologice şi igienice satisfăcătoare.

Se admite faptul că tipurile cu adevărat telurice, care rezistă timp îndelungat în sol, ar fi biotipurile A şi unele tipuri C, pe când biotipurile B, D, E şi majoritatea tipurilor C, sunt prezente obligatoriu în tractul intestinal al animalelor fără a persista foarte mult în alte medii.(2)

Identificarea într-un număr mare a biotipurilor A, C cât şi prezenţa biotipului D asociate cu capacitatea acestora de a elabora enterotoxine, trag un semnal de alarmă asupra posibilităţii apariţiei unor toxiinfecţii alimentare prin consumul de carne, provenite de la astfel de carcase. De asemenea datorită capacităţii sporogene a acestor bacterii, există posibilităţi nelimitate de contaminare a spaţiilor de sacrificare, a carcaselor învecinate, ceea ce aplifică factorul de risc.

De remarcat faptul că aceste biotipuri au fost izolate după etapa tehnologică de spălare, când practic, carcasele intră pe linia de transare sau spre sectorul ambalare pentru păsări, situatii în care

trebuie făcute recomandări generale consumatorilor, de a depozita corect şi a spăla insistent carnea, înainte de consum.

CONCLUZII

1. Au fost izolate şi identificate, de pe carcasele de bovine, ovine, suine şi păsări după etapa tehnologică-spălare, 18 tulpini de *Clostridium perfringens*.
2. La bovine s-au identificat 7 tulpini de *Clostridium perfringens*, fiind încadrate în biotipul A 3(42,8%) tulpini, biotipul E 2(28,6%)tulpini, biotipurile C şi D câte o tulpină.
3. De pe carcasele porcine, s-au izolat 6 tulpini ce au fost încadrate în biotipului A -3(50%) tulpini şi biotipului C -3(50%) tulpini.
4. Cele trei tulpinile de *Clostridium perfringens* izolate de pe carcasele de ovine, s-au încadrat în biotipurile D- 2(66,6%) tulpini şi A o tulpină (33,4%).
5. De la păsări cele 2 tulpini, au fost izolate din zona pielii gâtului şi s-au încadrat în biotipul A şi C.
6. Absenta biotipului B şi prezenţa în număr redus a biotiopului E, denotă faptul că etapele tehnologice ale sacrificării au fost respectate.
7. Identificarea biotipurilor A,C şi D care elaborează enterotoxine, predispun consumatorii de carne semipreparată, la risc de toxiinfecţie alimentară

BIBLIOGRAFIE

1. Adams JJ, Gregg K, Bayer EA, Boraston AB, Smith SP.(2008)- Structural basis of *Clostridium perfringens* toxin complex formation Proceeding of the Nationall Academy of Sciences of the U S A. 2008 Aug 26;105(34):12194-9. Epub 2008 Aug 20.
2. Bârzoi D., Meica S., Neguţ M.,(1999) - Toxiinfecţii alimentare, Ed. Diacon Coresi, Bucureşti,
3. Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. R., Stiles, B. G. (2004). Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common *Clostridium* and *Bacillus* Proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** *68: 373-402*
4. Brynestad S, Granum PE.(2002)- *Clostridium perfringens* and foodborne infections. International journal of food microbiology.;74(3):195-202.
5. Carp-Cărare M. şi col.(2003) – Cercetări privind incidenţa clostridiilor sulfito-reducătoare şi a speciei *Clostridium perfringens* în carne, Laborator de biosecuritate alimentară, Iaşi
6. Sayeed S, Li J, McClane BA.(2007)- Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. Infection and immunity.;75(5):2391-8.