

CERECETĂRI PRIVIND ARTERITA VIRALĂ ECVINĂ

Rezumat

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

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

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

Aceasta este motivația care a determinat inițierea cercetărilor asupra infecției cu virusul arteritei virale ecvine în rândul cabalinelor din România.

Partea I a tezei reprezintă o sinteză a datelor existente în literatura de specialitate referitoare la cercetările efectuate și rezultatele obținute până în prezent.

În capitolul I sunt prezentate aspecte referitoare la istoricul, etiologia și epidemiologia arteritei virale ecvine.

Arterita virală ecvină este, așa cum se poate observa din denumire, o maladie cu etiologie virală, are caracter contagios, afectează ecvideele, indiferent de rasă, vârstă, sex sau stare fiziologică. Se caracterizează clinic prin febră, jetaj și epiforă, edeme ale membrelor, în special ale celor posterioare, mamelei, scrotului, și avort. Leziunile cele mai importante sunt panvasculita la nivelul vaselor sanguine cu diametrul de maximum 5 mm, degenerări și necroze ale mediei acestor vase.

De-a lungul timpului a avut mai multe denumiri, fiind cunoscută și sub denumirea de celulita infecțioasă - boala ochilor roșii, influenza erysipelatoasă, febra tifoidă a calului, sau rotlaufseuche.

Maladia a fost depistată și studiată încă din secolul XIX. Primele semnalări aparțin lui Pottie (1888) și Clark (1892). În 1913, Bergman a observat că infecția este transmisă pe o perioadă îndelungată de timp de către armăsarii vindecați.

În 1957, Doll și colab. semnalează o enzootie de avort la iepele din statul Ohio, localitatea Bucyrus, cu manifestări asemănătoare rinopneumoniei, dar cu evoluție mai gravă. Ei au stabilit că este de fapt vorba de o maladie diferită, respectiv arterita virală ecvină.

În prezent, se cunoaște cu certitudine că arterita virală ecvină este răspândită pe tot globul. A fost semnalată pe continentele americane, Africa, Asia, Europa, Noua Zeelandă. În România, primele semnalări ale prezenței infecției au fost făcute de specialiștii de la Institutul de Diagnostic și

Sănătate Animală și Societatea Națională Cai de Rasă, la cabalinele pur sânge și trăpaș în anul 1993, de către Aurelia Ionescu și L. Blaga.

Arterita virală ecvină este produsă de un virus ARN, care reprezintă specia tip a genului Arterivirus, gen încadrat în familia Arteriviridae, ordinul Nidovirales. Din genul arteriviurs mai fac parte și virusul febrei hemoragice a simienilor, virusul potențator al lactatdehidrogenazei și virusul PRRS (Virusul Lelystad).

Din punct de vedere structural, virusul arteritei virale ecvine este un virus ARN monocatenar „pozitiv”. Are formă sferică, diametrul cuprins între 50-70 nm, simetrie icosaedrică, înveliș dublu, alcătuit din capsomere (12-15 nm.). Schematic, este compus din genom (core) isometric, înconjurat de un strat lipidic dublu. Rar, o particulă virală poate conține două genomuri (core).

Învelișul este de natură lipoproteică, format din două straturi. Studiile de microscopie electronică au relevat spiculi pe suprafața învelișului. Virionul este sferic, cu un diametru de aproximativ 28-35 nm. Proteinele virale cele mai importante sunt: 2 proteine de înveliș (GL), 2 proteine ale nucleocapsidei, respectiv (N) sau proteina VP7, proteina C, o proteină de natură necunoscută (M) și proteine nestructurale (nsp), din care o parte sunt implicate în testele imunoenzimaticice antigen-anticorp.

Virusul arteritei virale ecvine se dezvoltă și produce efect citopatic în celule de origine ecvină (pulmonare, renale), dar și în unele celule obținute de la alte specii (iepure, maimuță, respectiv liniile celulare RK13 și VERO). Prin pasaje pe celule renale de mînz se atenuază și poate fi utilizat pentru preparare de vaccinuri.

Este sensibil la variații de pH, la temperaturi de peste 56°C, la eter și cloroform. Substanțele decontaminante uzuale pe bază de eter, iod, clor, îl

distrug relativ ușor. În mediul extern rezistă destul de greu, mai ales dacă nu este înglobat în materii organice (sânge, secreții).

La infecția naturală sunt receptive ecvideele, de toate vârstele, indiferent de sex. Dependent de specie, ordinea receptivității ar putea fi următoarea: cal, asin, catâr, zebra.

În perioada viremiei, animalele infectate elimină virusul prin secreții respiratorii dar și oculare, bucale, genitale, sânge, urină, fecale, avortoni, placentă, lichide placentare.

Armăsarii purtători de virus pe termen lung elimină virusul prin materialul seminal. Sursele secundare de infecție pot fi obiectele utilizate la hrănirea, îngrijirea sau toaletarea animalelor, personalul îngrijitor sau veterinar, obiectele de prelevare a materialului seminal pentru însămânțări artificiale, etc.

În transmiterea arteritei virale ecvine sunt cunoscute două rute importante de contaminare, respectiv calea aerogenă și calea veneriană.

În capitolul II este prezentat mecanismul patogenetic, mecanism ce este dependent de calea de pătrundere a virusului în organism.

În infecția respiratorie virusul invadează inițial macrofagele pulmonare și ulterior limfonodurile regionale, în timp ce în infecția pe cale veneriană sunt invadate mai întâi limfonodurile regionale urmate de uterul gestant și fetus.

Imunitatea activă poate fi dobândită prin infecție cu vius sălbatic sau vaccinare iar mânjii născuți din mame seropozitive pot poseda imunitate maternală până în jurul vârstei de șase luni. Un aspect particular îl reprezintă armăsarii cu infecție persistentă care pot deveni seropozitivi pentru toată viața.

Capitolul III tratează aspecte referitoare la simptomele și leziunile care se constată în infecțiile cu virusul arteritei virale ecvine.

În infecția naturală, perioada de incubație variază între 4 și 7 zile, după care se instalează hipertermia (39,5-40°C), neînsoțită de vreun alt semn clinic. Această perioadă de hipertermie presimptomatică durează aproximativ 2 zile.

Cazurile tipice de boală pot prezenta următoarele simptome: febră, depresie, anorexie, leucopenie, edeme, mai ales ale membrelor posterioare iar la masculi, și ale scrotului și prepuțului, conjunctivită, lacrimare, scurgeri oculare, edeme supra- și peri orbitale, rinită cu scurgeri nazale seroase sau seromucoase, reacție urticariformă locală (în special la nivelul gâtului) sau generală, avort și rar, pneumonie sau pneumoenterită fulminantă. Finalul este de regulă vindecarea după 3-7 zile. Există și o formă clinică gravă denumită și febra tifoidă a calului, manifestată prin: hipertermie (40-42°C), abatere și depresiune până la torpoare, inapetență și chiar anorexie, sete pronunțată, astenie, hipotonie musculară, mers vacilant, catar al mucoaselor oculară și nazală, congestia mucoasei oculare care devine subicterică sau icterică. Apar infiltrații oculare, uneori foarte pronunțate, mergând până la chemozis. În alte cazuri se pot instala artralgiile, mialgiile, icter, și diaree.

În formele subclinice simptomele sunt foarte discrete și de cele mai multe ori trec neobservate. Singura manifestare clinică în aceste cazuri poate fi avortul.

Indiferent de gravitatea formelor clinice, în focarele de arterită virală ecvină, aproximativ 50% din iepele gestante avortează.

Leziunile sunt reprezentate de colecții seroase sau serofibrinoase în marile cavități, însoțite de hemoragii ale seroaselor, uneori icter și frecvent edeme ale regiunii palpebrale, membrelor, pereților abdominali ventrali, mamelei la femele și scrotului la masculi., necroze masive la nivelul nodurilor limfatice și suprarenalelor,. Mucoasa nazală este congestionată și

infiltrată. La mânji au fost remrcate enterită, hemoragii și infarcte la nivelul splinei, edem și emfizem pulmonar, pneumonie interstițială. Avortonii prezintă icter, transsudate cavitare, hemoragii pe seroase, stază în vasele mezenterului

Leziunile microscopice se produc ca o consecință a afectării arterelor, venelor și vaselor limfatice cu diametrul mai mic de 5 mm. La nivelul tunicii și fibrelor musculare netede ale acestor vase, se produce hialinoză, sau necroză fibrinoidă, infiltrație cu neutrofile. Cele mai afectate celule la acest nivel sunt pericitele.

Capitolul IV prezintă aspecte referitoare la modalitățile de inițiere și confirmare a diagnosticului arteritei virale ecvine.

Cu toate că în formele clinice, se poate institui un diagnostic prezumtiv de arterită virală ecvină, pentru un diagnostic de certitudine este necesară efectuarea unui complex de examene de laborator, ținând cont că există un mare număr de alte afecțiuni infecțioase sau neinfecțioase al ecvideelor care se pot confunda clinic, lezional și chiar epidemiologic cu arterita virală ecvină.

Indiferent de natura probelor prelevate de la animale cu semne clinice, este foarte important ca acestea să fie recoltate în momentele optime, care să asigure depistarea cu certitudine a virusului, a antigenului viral sau a anticorpilor specifici. În toate cazurile este recomandat a se avea în vedere un diagnostic diferențial față de alte maladii ale ecvinelor (morva, purpura haemorrhagica, anemia infecțioasă ecvină, influența ecvinelor, rinopneumonia, leptospiroza, pesta ecvină africană, ehrlichioza cabalinelor, avortul salmonelic al iepelor).

Profilaxia, supravegherea și combaterea arteritei virale ecvine sunt prezentate în capitolul V.

Profilaxia nespecifică are la bază principiile evitării contactului animalelor sănătoase cu cele purtătoare și eliminatoare de virus, precum și înlăturarea oricăror potențiale posibilități de vehiculare a virusului prin vectori animați ori neanimați, de la animalele infectate către cele sănătoase. O importanță deosebită o are depistarea armăsarilor cu infecție persistentă care prin montă sau însămânțări artificiale pot contamina un număr mare de iepe ce devin la rândul lor surse de infecție pentru toate cabalinele din efectivele de origine.

Profilaxia specifică se realizează cu ajutorul a două vaccinuri. Unul din acestea este preparat în SUA cu virus viu atenuat (tulpina atenuată Bucyrus). Există și un vaccin inactivat, produs în Japonia dar a cărui utilizare nu este permisă în afara statului japonez.

Supravegherea arteritei virale ecvine vizează controlul efectiv al circulației virusului și a bolii, prin identificarea armăsarilor purtători și eliminatori permanenți de virus sau a altor cabaline care au venit în contact cu virusul.

În cazul apariției unui focar de arterită virală ecvină, pentru a realiza combaterea bolii, în primul rând trebuie aplicate măsuri care să limiteze la minimum diseminarea virusului în interiorul focarului și în afara acestuia. În acest sens, fiecare administrație veterinară națională elaborează protocoale de eradicare și combatere proprii, respectând unele reguli generale de bază.

În partea a II-a a tezei sunt prezentate rezultatele cercetărilor proprii.

În capitolul VI cercetările au vizat efectuarea de investigații serologice pentru a stabili prevalența arteritei virale ecvine în unele efective de cabaline din România.

Au fost luate în studiu cabaline din rase pursânge (pur sânge arab, pur sânge englez, lipițan), ori încrucișări între diferite rase sau, cum mai sunt

denumite, „amestec de sânge” (cal de sport românesc, trăpaș românesc, semigreu românesc, ghidran), precum și animale din rasa Huțul, rasă autohtonă foarte veche.

Animalele investigate au fost localizate în aproape toate zonele geografice, în condiții de relief, climă, factori de sol și vegetație diferite. Metodele de investigare serologică au constat din teste de detecție a anticorpilor (ELISA, microseroneutralizare pe culturi celulare).

Rezultatele cercetărilor au demonstrat că din 1589 seruri de cabaline testate (n=1589), 946 (59,53%) au fost pozitive (au conținut anticorpi specifici virusului arteritei virale ecvine) și 618 (40,47%) au fost negative. Concluzia principală a fost aceea că anticorpii specifici au apărut consecutiv infecției naturale a animalelor cu acest virus, deoarece în România nu se vaccinează cabalinele contra arteritei virale ecvine. Ipoteza este susținută și de faptul că în mai multe ferme cu animale seropozitive a fost izolat virusul de la avortoni, tineret cabalin și chiar cabaline adulte.

Experimentul prezentat în capitolul VII conține rezultatele investigațiilor efectuate în unele focare de arterită virală ecvină. Testele virusologice au fost aplicate pe probe prelevate de la 72 cabaline adulte (67 iepe și 5 armăsari pepinieri), 89 tineret cabalin de diferite vârste, 1 cadavru iapă moartă în urma avortului, vârsta 5 ani, 4 cadavre mânji varstă 0,5-3 luni și 9 avortoni, vârsta 5-9,5 luni.

De la animalele în viață au fost colectate probe de secreții respiratorii și oculare, material seminal, lavaje prepuțiale și vaginale, sânge pe anticoagulant și ser.

De la cadavre au fost prelevate probe de țesuturi care s-au conservat prin congelare sau imersare în formol, dependent de investigațiile de laborator ce urmau a fi efectuate.

Metodele aplicate au fost reprezentate de: examen clinic, examen anatomopatologic, examen histopatologic, examen virusologic care a constat din izolarea virusului pe culturi celulare, identificarea antigenului viral prin imunofluorescență, detecția anticorpilor prin ELISA și microseroneutralizare.

Rezultatele obținute au relevat faptul că atât simptomele cât și leziunile macro și microscopice observate puteau fi atribuite infecției cu virusul arteritei virale ecvine. Diagnosticul prezumtiv a fost confirmat de examenele virusologice prin care a fost izolat și identificat virusul arteritei virale ecvine de la animale în viață sau de la cadavre ori a fost evidențiată prezența antigenului viral în celule infectate. În plus, au fost depistați și anticorpi specifici la aproximativ 90% din animalele investigate. În unele cazuri au fost identificate și infecții asociate cu herpesvirusurile ecvine EHV1 și EHV4.

În capitolul VIII sunt prezentate rezultatele obținute ca urmare a cercetărilor întreprinse pentru elaborarea și optimizarea unui test de detecție a anticorpilor serici specifici virusului arteritei virale ecvine, bazat pe imunofluorescența indirectă. Probele au fost concomitent testate prin alte două metode consacrate de detecție a anticorplor, respectiv ELISA (o trusa comercială) și microseroneutralizare pe culuri celulare.

Rezultatele obținute au arătat că în comparație cu metodele de referință, metoda serologică propusă în teza de față are o sensibilitate de 88,33% și o specificitate de 98%.

În concluzie, testul de imunofluorescență pentru detecția anticorpilor serici specifici virusului arteritei virale ecvine poate fi aplicat ca o alternativă la ELISA sau microseroneutralizare pe culturi celulare în situațiile în care ultimele două nu sunt accesibile din diverse motive, deoarece nu necesită

dotare specială de laborator. Lamele suport pentru celulele infectate pot fi obținute într-un laborator ce posedă facilități pentru prepararea de culturi celulare în cantitate mai mare și distribuite laboratoarelor teritoriale.

În capitolul IX sunt de asemenea prezentate rezultatele unor cercetări întreprinse pentru elaborarea unui test rapid de diagnostic, bazat pe imunofluorescență, care să poată fi aplicat pentru confirmarea rapidă a suspiciunii de arterită virală ecvină, având în vedere că testul de confirmare a diagnosticului, respectiv izolarea virusului pe culturi de celule este laborios, poate dura mai multe zile sau chiar săptămâni și nu este întotdeauna încununat de succes.

Caracterul inedit al acestui test este reprezentat de tipul probelor patologice, modul de prelevare și prelucrare a acestora pentru examinare. Cercetările au fost efectuate pe un număr de 161 probe de secreții nazale, 161 probe secreții oculare, 161 probe raclat de mucoasă oculară, 186 probe de țesuturi prelevate din organe interne.

Rezultatele obținute au arătat că în cazul probelor de secreții nazale, oculare și raclat de mucoasă oculară, antigenul viral a fost evidențiat în celule prin imunofluorescență indirectă în proporție de 98,75%, iar procentul de confirmare a probelor pozitive la imunofluorescență prin izolare de virus pe culturi celulare a fost de 87,79%.

În cazul probelor de țesuturi, antigenul viral a fost evidențiat prin imunofluorescență indirectă în 96,23% din probe iar procentul de confirmare a acestora prin izolarea virusului pe culturi celulare a fost de 89,38%. Concluzia rezultată este aceea că metoda propusă este simplă, ușor de efectuat și nu necesită echipamente în plus față de cele care se află în mod normal într-un laborator de virusologie.

Probele se prelevează relativ simplu și nu implică manopere dureroase sau stresante pentru animale ori periculoase pentru operator.

Concluziile generale sunt prezentate în capitolul X. În esență, acestea relevă faptul că:

În lucrarea de față sunt prezentate primele cercetări efectuate în România referitor la existența virusului arteritei virale ecvine.

Investigațiile au fost efectuate pe parcursul mai multor ani, în care s-a prelevat un număr mare de probe. Dintre acestea a fost selectat doar un anumit număr de probe pe care au fost efectuate cercetările detaliate.

Mai mult de jumătate (946, respectiv 59,53%) din cabalinele investigate (n=1589) au fost depistate seropozitive pentru virusul arteritei virale ecvine. În focarele în care a fost suspicionată arterita virală ecvină diagnosticul a fost confirmat prin izolarea virusului de la animale în viață și de la cadavre.

Virusurile izolate au fost caracterizate și identificate cu reagenți de referință ca fiind tulpini de virusul arteritei virale ecvine (EAV).

În unele cazuri au fost depistate infecții asociate, respectiv virusul arteritei virale ecvine și herpesvirusurile ecvine EHV1 și EHV4.

RESEARCHES ON EQUINE VIRAL ARTERITIS

Abstract

During the last two decades, Equine Viral Arteritis became a really very important disease. Its gravity and the important economic losses determined the officials to include it in the official norms and standards of the OIE and EU directives, mainly those concerning the international movement and trade of equides.

The economic importance of the disease is due firstly by the material losses produced consequently imposing severe restrictions on the international movement of equides, the ban of import and export of very valuable horses, semen, ova or embryos. On the other hand, in case of an outbreak of equine viral arteritis, many mares will abort and some of the foals will die shortly after birth.

As it happened in any countries around the world, equine viral arteritis become an important veterinary issue in Romania too. The most affected animals are those belonging to pure breeds (Romanian trotters, thoroughbreds, Arabians, etc.).

These are the reasons that initiated the researches described in these thesis.

The thesis is structured in two parts.

Part I represents a brief collage of knowledge referred to this topic in literature.

In chapter I, aspects regarding the history, etiology and epidemiology of equine viral arteritis (EVA) are presented.

It is now well known that EVA is a contagious, viral disease that affects equides. The bred, age, sex or physiologic status of the animals have no influence. It is characterized clinically by hyperthermia, nasal and ocular

discharges, limbs edema, especially of the hind limbs, edema of the scrotum in stallions and the mammary gland in mares and abortion. The most important pathological finding is the panvasculitis that affects the small blood vessels (maximum 5 mm in diameter).

Over the time, EVA had many other names, such as: infectious cellulitis – pink eyes, influenza erysipelatosă, horse typhoid fever or rotlaufseuche.

erysipelatosă, febra tifoidă a calului, sau rotlaufseuche.

Since the XIX century, the disease had been observed and studied but the first scientific reports were done by Pottie (1888) and Clark (1892). In 1913, Bergman noticed that the disease is carried and transmit over a long period of time by the surviving stallions from the disease.

In 1957, Doll and all. describe an enzootic episode of abortion in Bucyrus, Ohio. Although the clinical signs were similar to the equine rhinopneumonitis, the evolution of the disease was more dramatic.

In present it is well known that EVA occurs all around the world. It was reported in Americas, Africa, Asia, Europe, New Zealand. In Romania, the disease was firstly diagnosed by the specialist from the Institute for Diagnosis and Animal Health and The National Society of Thoroughbreds. The most affected equines were the Romanian trotters and the thoroughbreds. The investigation were made by Aurelia Ionescu and Lucian Blaga.

The etiology of EVA consists by a RNA virus belonging to the genus Arterivirus, Family Arteriviridae, Order Nidovirales.

Other members of the genus Arterivirus are the haemorrhagic fever of simians virus, the lactate dehydrogenase virus and the PRRS virus (the Lelystad virus).

Regarding its structure, the EVA virus (EVAV) has single stranded RNA, sense positive. Its shape is spherical with a diameter of 50-70 and icosahedral symmetry. The outer layer is double sheeted and formed by capsomers (12-15 nm). In fact, the virion represents a genomic core surrounded by a double lipidic layer. Seldom, a viral particle can contain two cores. The most important proteins are the following: 2 glycoproteins, two proteins of the nucleocapsid (N or VP7 and C), 1 protein M with unknown origin and non-structural proteins, some of them used in laboratory antigen-antibody tests.

The EVAV grows and induces cytopathic effect in cell cultures of equine origin (lung, kidney) and in other cells monolayers such as RK 13 and VERO. By multiple passages in foal kidney cells it can be attenuated and can be used for vaccine production.

The EVA virus is destroyed by extreme pH values, heating over 56 ° C , ether, chloroform, usual disinfectants that contain iodine or chlorine, ether. It is also not very resistant outside the animal body if it is not protected by organic materials (blood, secretions).

Equines are naturally susceptible to the infection. The most susceptible are horses, followed by donkeys, mules, zebras. The age and sex has no influence on the susceptibility to the disease.

During the viremic period, infected animals shed virus through respiratory, ocular, nasal, genital secretions, by faeces, aborted foetuses, placenta, foetal fluids.

Persistently infected stallions eliminate intermittently the virus by semen for a very long time, sometime during the lifetime.

The secondary sources of infection can be all objects and tools used to take care of the animals, the animal keepers or veterinary personnel, instrument used to collect semen or to perform artificial inseminations.

Two major contamination routes are known in EVA, respectively the aerogenic route and the venereal one.

In chapter II the pathogenetic mechanism of the disease is described. This mechanism is dependent by the route of infection.

Following the respiratory infection, the virus invades firstly the pulmonary macrophages and subsequently the regional lymph nodes. The venereal infection is initially led to the viral invasion of the regional lymph nodes and lately the virus spreads to the uterus and the foetus.

The active immunity can be acquired following the natural infection with the field virus or after vaccination. Foals obtained from seropositive mares can possess passive immunity till six months of age.

A particular aspect of this disease is represented by the persistently infected stallions that can shed intermittently the virus by semen, in some cases during the lifetime.

In chapter III are presented the symptoms and the lesions.

In naturally acquired infections, the incubation period is from 4 to 7 days. The only symptom is hyperthermia (39,5-40°C). This presymptomatic stage lasts approximately two days.

In typical disease, the symptoms consist in: fever, depression, anorexia, leucopenia, oedema, especially of the hind limbs, oedema of scrotum and prepuce in males and mammary gland in mares, conjunctivitis, lacrimation, ocular discharges, supraorbital and periorbital oedema, serous or seromucous nasal discharges, localized skin rash, (especially on the neck)

or generalized urticariform reaction, abortion and, very rare, fulminant pneumoenteritis. Generally, the recovery is shown in 3-7 days.

There is a more severe clinical form, named the horse typhoid fever, characterized by high fever(40-42°C), deep depression, lose of the gain status, anorexia, asthenia, muscle hypotonic, difficult movement, ocular and nasal discharges, icterus of the ocular mucous membrane. There also appear eye infiltration, that can evolve to chemosis and blindness. In other cases, pain of the joints or muscles or diarea can occur.

In sub clinic evolutions, the symptoms are very discrete and usually they are unnoticeable. The only clinical sign is the abortion.

In EVA outbreaks, approximately 50% of pregnant mares abort.

The pathological findings are: serous or serofibrinous collections in cavities, hemorrhagies of the serous membranes, icterus, end oedema of eyelashes, limbs, low abdominal walls, mammary gland and scrotum, massive necrosis of the lymph nodes and suprarenal glands.

The nasal mucosa in congested and infiltrated. In dead foals the following lesions were noticed: enteritis, spleen haemorrhages and infarcts, lung oedema and emphysema, interstitial pneumonia. The aborted foetuses show icterus, cavitary effusions of fluids, haemorrhages on the mucous membranes, stasis in the mesenteric blood vessels.

The microscopic changes appears as an effect of damages occurred in small blood and lymph vessels (maximum 5 mm in diameter). Hyalinosis and fibrinoid necrosis of the media of these vessels is present, as well as neutrophilic infiltrations.

Chapter IV presents he modalities of initiating and confirmation of the diagnosis of equine viral arteritis.

Although the symptoms of the disease are rather typical, in order to confirm the infection with EVA virus it is necessary apply some laboratory tests. It must also to consider a differential diagnostic from any other infectious or non-infectious equine conditions such as glanders, purpura haemorrhagica, equine infectious anemia, equine influenza, equine rhinopneumonitis, leptospirosis, African horse sickness, equine ehrlichiosis, salmonelic abortion of mares.

A special importance should give to the samples collected for the laboratory investigations. These have to be taken from suitable animals, in the right time, in order to allow the isolation and identification of the virus or detection of viral antigen or specific antibodies.

Prophylactic, surveillance and control measures of EVA are described in chapter V.

General prophylactic measures should assure no direct contact between sick and virus shedder and healthy animals. Also, any indirect possibilities for virus introduction in free farms or stables should be avoided.

A very important prophylactic measure is the persistent infected stallions detection. These stallions should not be used anymore for reproduction since they can transmit the virus to a large number of mares by mating or artificial insemination.

The immunoprophylaxy is acquired with vaccines. One of the two vaccines is based on the live attenuated Bucyrus viral strain, s manufactured in the USA and is worldwide used. The other one is a killed vaccine. It is prepared in Japan and usually is used only in his country. The surveillance of EVA is aimed on the control of the international crelation of the disease and the virus, identification of persistently infected stallions or any other equide that might contracted the virus.

In case of an EVA outbreak, in order to control and eradicate the disease, measures for limiting the spreading of the virus from the infected areas or the penetration of the virus from infected to free areas should be enforced. For this, any national veterinary administration will elaborate their own control and eradication protocols, based on some general basic criteria. In the second part of these thesis are presented the researches and the results that were obtained.

In chapter VI, the aim of the research was a serologic study in order to assess the presence or absence of EVA infection evidences in some horse herds in Romania.

The study was performed in different horse farms where the animals belonged to various breeds (thoroughbreds, crossbreeds and a very old indigenous breed named Hutul).

The investigated animals were located in different geoclimatic areas, with very diverse climate, soil structure, and vegetation.

The serologic methods were ELISA and microserumneutralisation on cell culture.

The results showed that from 1589 tested animals, 946 (59,53%) were positive for EVA antibodies and 618 (40,47) were negative.

The main conclusion was that the EVA antibodies were produced consequently the infection of horses with the wild virus, since in Romania equides were never vaccinated against this disease. Furthermore, in many cases the virus was isolated from aborted foetuses, dead foals and even from adult horses.

The experiment presented in chapter VII shows the results of investigations performed in some EVA outbreaks. The samples for virology were collected from 72 adult horses (67 mares and 5 stallions), 89 young horses (foals and

colts), 1 dead mare following the abortion (five years old), 4 dead young horses (0,5 – 3 months old) and 9 aborted foetuses (5-9,5 months old).

From live animals samples of respiratory and ocular discharges, whole blood, serum, semen and prepuce washings from the stallions, vaginal washings from mares were collected.

From carcasses, samples consisting in tissue pieces that were frozen or preserved in formalin, depending on the laboratory investigations.

The laboratory methods were: virus isolation on cell cultures, viral antigen detection by immunofluorescence, antibodies detection by ELISA and microserumneutralisation.

The results demonstrate that both symptoms and lesions (pathology and histology) could be specific for EVA infection. The diagnosis was confirmed by virus isolation and identification both from live animals and carcasses. Also, the viral antigen was demonstrated in infected cells and antibodies were detected in serum samples in 90% of investigated animals. In some cases, mixed infections with equine herpes viruses (EHV1 and EHV4) were detected.

Chapter VIII consist in laboratory work dedicated to elaboration and optimisation of a test for EVA specific antibodies detection, based on immunofluorescence.

The samples were simultaneous tested by other two methods for antibodies detection, respectively a commercial ELISA already registered for use in Romania and by microserumneutralization on cell cultures.

The results showed that in comparison with the reference methods, the method proposed in this thesis is 88,33% sensitive and 98% specific.

It can be concluded that the method might be used as an alternative test for EVA antibodies detection in those cases when the other two methods

can't be used because of various reasons. It is not required a special laboratory equipment to perform the test. The microscope slides carrying the infected cells can be prepared in a suitable laboratory and distributed to local laboratories since they can be stored by freezing for one year.

In chapter IX are also presented the results of some researches performed in order to elaborate a rapid diagnostic laboratory test, based on immunofluorescence assay, that will permit to the clinicians to confirm the suspected cases and to apply the necessary measures and therapy, since the classic confirmatory test, respectively the virus isolation on cell cultures is laborious and time consuming and also in some instances it might be not successfully.

The new aspects brought by this test is represented by the characteristics of the samples, the collection and preparation of them for testing. Researches were done on 161 samples of nasal discharges, 161 ocular secretions, 161 ocular mucosa and 186 tissue samples taken from body organs.

The results were as follows: in samples consisting in nasal and ocular discharges and in ocular mucosa, the viral antigen was detected by immunofluorescence assay in 98,75% of samples and from these IFA positive samples were confirmed by isolation 87,79%.

In tissue samples, the viral antigen was detected by indirect IFA in proportion of 96,23% and 89,38% of these samples were confirmed by virus isolation in cell cultures.

The conclusion is that the method is relatively easy to perform, sensitive and specific, and it may be applied in any laboratory equipped with the minimum necessary for IFA assays.

Samples can be collected in good conditions, without any risk for the operator or to harm the animals.

The general conclusions are presented in Chapter X. Some of the main conclusions are:

- In this thesis are summarized the first researches on equine viral arteritis in Romania.
- Investigations were done during several years when a large number of samples were collected. From these samples only several hundred were selected to make detailed researches for virus isolation, viral antigen detection, specific antibodies demonstration.
- 946, respectively 59,53% of investigated animals (n = 1589) were detected as seropositive for equine viral arteritis. In outbreaks where EVA was suspected, the diagnosis was confirmed by virus isolation from both alive and dead animals.
- The isolated viruses were subsequently characterized and identified with reference reagents as equine viral arteritis virus.

In some instances associated infections were detected, respectively equine viral arteritis virus and equine herpesviruses EHV1 and EHV4 occurring together.