

Rezumatul tezei de doctorat

CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE, ANATOMOCLINICE, IMUNOPROFILACTICE ȘI DE LABORATOR ÎN SINDROMUL PRRS

Sindromul tulburărilor respiratorii și de reproducție al porcinelor reprezintă dominantă patologică a deceniului '90, pentru suin e, fiind semnalat, simultan, în anul 1987, în Statele Unite și în Canada. La mai multe manifestări științifice, ulterioare acestui an, a fost discutat și faptul că această boală ar fi apărut chiar mai devreme.

Sindromul se caracterizează printr-o evoluție endemică, în cea mai mare parte, a țărilor care se ocupă cu creșterea porcilor, fiind o boală virotică de actualitate, constituind o permanentă amenințare economică atât pentru fermele indemne cât și pentru cele infectate.

În iarna anului 1990 boala s-a răspândit în fermele din apropierea graniței dintre Germania și Olanda, fiind formulată concluzia că principala cale de transmitere este calea aerogenă. Numărul fermelor afectate, în această perioadă, în Germania, a fost de 2500, iar în Olanda de 1500, deși este posibil ca numărul acestora să fi fost mai mare datorită evoluției bolii și în fermele de îngrășare, dar care nu au fost diagnosticate oficial.

În iunie 1991 a fost semnalat și identificat un virus (tulpina Lelystad) ca agent cauzal al PRRS- ului European, de către WENSVOORT și col., de la Institutul Veterinar Central din Lelystad (Olanda), iar în 1992, virusul a fost izolat de către COLLINS și col., în USA și de către DEA și col., în Canada, fiind codificat VR 2332.

În anii următori cercetările efectuate, de către numeroase colective, au demonstrat că virusul PRRS, are două genotipuri, respectiv, tipul 1 (European virus Lelystad) și tipul 2 (American), a căror asemănare a secvențelor genice este de numai 50-60%.

În anul 2016, KUHN J. H., și col. , pe baza cercetărilor proprii coroborate cu cercetările efectuate de către alte colective au propus o nouă clasificare a arterivirusurilor care a fost acceptată de către comitetul de experți al ICTV, astfel că, sistematica arterivirusurilor începând cu ediția 2016 este complet schimbată, cele două tipuri ale virusului PRRS fiind considerate ca specii virale distincte, respectiv tipul 1 (European) recunoscut ca PRRSV 1 și tipul 2 (american) recunoscut ca PRRSV 2, iar virusurile izolate de la primat non-umane au fost reclasificate.

În România boala a fost diagnosticată, pentru prima dată, în anul 1998, concomitent, de către colectivul condus de DR. OLARU E. și colectivul condus de DR. STĂNUICĂ D., iar în anii următori a fost studiată și semnalată, în mai multe ferme, de către mai multe colective de cercetare.

În prezent sindromul PRRS este răspândit în toată lumea, în fermele de creștere intensivă a suinelor, dar și în sistemul de creștere semiintensiv ca urmare a achiziției de suine de reproducție din ferme contaminate sau cu status necunoscut.

În urma unor rapoarte prezentate de specialiști, cu ocazia unor întâlniri internaționale, a reieșit că datorită caracteristicilor epidemiologice, ale bolii, evaluarea pierderilor economice, datorate exclusiv, infecției cu virus al PRRS, în multe cazuri, este dificilă. De multe ori, există situații când efectele bolii trec neobservate, însă în urma intervenției infecțiilor bacteriene secundare, pierderile economice sunt destul de semnificative.

Având în vedere importanța economică și situația epidemiologică existentă în creșterea intensivă a suinelor din țara noastră, cercetările proprii au urmărit elucidarea unor aspecte privind epidemiologia, diagnosticul și imunoprofilaxia acestei boli.

Teza de doctorat cuprinde 105 pagini, 7 tabele și 39 figuri, în care sunt incluse 24 imagini originale și 15 grafice. Suportul științific al tezei de doctorat este reprezentat de 170 titluri bibliografice care includ lucrări științifice, tratate și pagini web.

Teza de doctorat este structurată în 2 părți, respectiv „**Stadiul actual al cunoașterii**”, inclus în Partea I-a și „**Cercetările proprii**”, incluse în Partea a II-a.

PARTEA I-A STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei, reprezintă un studiu bibliografic, structurat în două capitole, fiind extinsă pe un număr de 27 pagini (25,71 %). În această parte se regăsesc 2 figuri reprezentative, alături de date actuale privind genul *Porartevirus*, și diagnosticul sindromului PRRS.

CAPITOLUL 1. FAMILIA ARTERIVIRIDAE

Acest capitol reprezintă o sinteză a datelor rigurose selectate privind caracterele generale ale acestei familii, sistematica conform ICTV 2016 și genul *Porartevirus*. În cadrul acestui gen, sunt prezentate ultimele date privind virusurile incluse și o sinteză bibliografică privind PRRSV1 și PRRSV2.

Sunt prezentate date care redau evoluția în timp a cunoștințelor privind izolarea, cultivarea, studierea genotipică și fenotipică a tulpinilor și încadrarea lor inițială în tipul 1 și tipul 2. De asemenea, este redată sistematica actuală propusă de KUHN și col. și acceptată de ICTV 2016, conform căreia în prezent sunt recunoscute ca două virusuri distincte PRRSV1 și PRRSV2.

În cadrul capitolului, pe baza bibliografiei actualizate, este redată o amplă sinteză privind: morfologia, compoziția chimică, structura antigenică, multiplicarea celulară, ecologia și rezistența acestor două virusuri.

CAPITOLUL II. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN SINDROMUL PRRS

În cadrul acestui capitol, este prezentată o amplă sinteză bibliografică privind diagnosticul sindromului PRRS, bazat pe cele două obiective, respectiv detecția PRRV1 și PRRSV2 și detecția anticorpilor.

Sunt prezentate tehnicile de recoltare și transport a probelor patologice, examenele de izolare și cultivare a virusurilor, detecția ARN-ului viral, evidențierea antigenelor în celule, evidențierea leziunilor anatomopatologice microscopice și examenele serologice pe baza cărora sunt detectați anticorpii specifici.

PARTEA A II-A – CERCETĂRI PROPRII

Partea a II- a include cercetările proprii, fiind structurată în 6 capitole (3-8), extinse pe un număr de 78 pagini (74,28%), această parte a tezei este ilustrată de 7 tabele și 37 figuri, în care sunt incluse 22 imagini originale și 15 grafice.

CAPITOLUL III. SCOPUL, MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Sindromul tulburărilor respiratorii și de reproducție al porcinelor reprezintă dominantă patologică a deceniului '90, pentru suine, fiind semnalat, simultan, în anul 1987, în Statele Unite și în Canada. La mai multe manifestări științifice, ulterioare acestui an, a fost discutat și faptul că această boală ar fi apărut chiar mai devreme.

Sindromul se caracterizează printr-o evoluție endemică, în cea mai mare parte, a țărilor care se ocupă cu creșterea porcilor, fiind o boală virotică de actualitate, constituind o permanentă amenințare economică atât pentru fermele indemne cât și pentru cele infectate.

În iarna anului 1990 boala s-a răspândit în fermele din apropierea graniței dintre Germania și Olanda, fiind formulată concluzia că principala cale de transmitere este calea aerogenă. Numărul fermelor afectate, în această perioadă, în Germania, a fost de 2500, iar în Olanda de 1500, deși este posibil ca numărul acestora să fi fost mai mare datorită evoluției bolii și în fermele de îngrășare, dar care nu au fost diagnosticate oficial.

În iunie 1991 a fost semnalat și identificat un virus (tulpina Lelystad) ca agent cauzal al PRRS- ului European, de către WENSVOORT și col., de la Institutul Veterinar Central din Lelystad (Olanda), iar în 1992, virusul a fost izolat de către COLLINS și col., în USA și de către DEA și col., în Canada, fiind codificat VR 2332.

În anii următori cercetările efectuate, de către numeroase colective, au demonstrat că virusul PRRS, are două genotipuri, respectiv, tipul 1 (European virus Lelystad) și tipul 2 (American), a căror asemănare a secvențelor genice este de numai 50-60%.

În anul 2016, KUHN J. H., și col. , pe baza cercetărilor proprii corroborează cu cercetările efectuate de către alte colective au propus o nouă clasificare a arterivirusurilor care a fost acceptată de către comitetul de experți al ICTV, astfel că, sistematica arterivirusurilor începând cu ediția 2016 este complet schimbată, cele două tipuri ale

virusului PRRS fiind considerate ca specii virale distincte, respectiv tipul 1 (European) recunoscut ca PRRSV 1 și tipul 2 (american) recunoscut ca PRRSV 2, iar virusurile izolate de la primare non-umane au fost reclasificate.

În România boala a fost diagnosticată, pentru prima dată, în anul 1998, concomitent, de către colectivul condus de DR. OLARU E. și colectivul condus de DR. STĂNUICĂ D., iar în anii următori a fost studiată și semnalată, în mai multe ferme, de către mai multe colective de cercetare.

În prezent sindromul PRRS este răspândit în toată lumea, în fermele de creștere intensivă a suinelor, dar și în sistemul de creștere semiintensiv ca urmare a achiziției de suine de reproducție din ferme contaminate sau cu status necunoscut.

În urma unor rapoarte prezentate de specialiști, cu ocazia unor întâlniri internaționale, a reieșit că datorită caracteristicilor epidemiologice, ale bolii, evaluarea pierderilor economice, datorate exclusiv, infecției cu virus al PRRS, în multe cazuri, este dificilă. De multe ori, există situații când efectele bolii trec neobservate, însă în urma intervenției infecțiilor bacteriene secundare, pierderile economice sunt destul de semnificative.

Importanța economică a sindromului PRRS este consecința următoarelor situații:

- pierderile economice datorită mortalității;
- pierderile economice datorită avorturilor și infertilității;
- pierderi economice datorită infecțiilor bacteriene secundare;
- cheltuielile cu diagnosticul și epidemiosupravegherea;
- cheltuielile cu aplicarea măsurilor de profilaxie generală și specifică;
- cheltuielile cu măsurile terapeutice și de combatere (ecarisarea cadavrelor, dezinfecții etc.);
- reducerea indicelui de conversie a furajelor;
- neînregistrarea sporului în greutate;
- diminuarea calității carcaselor;
- degradarea animalelor destinate reproducției;
- inducerea stării de imunosupresie.

La aceste pierderi se mai adaugă și costurile legate de îmbunătățirea managementului fermelor, efectele negative asupra pieții cărnii, comerțul cu material seminal și comerțul cu animale de reproducție.

Având în vedere importanța economică și situația epidemiologică existentă în creșterea intensivă a suinelor din țara noastră, cercetările proprii au urmărit elucidarea unor aspecte privind epidemiologia, diagnosticul și imunoprofilaxia acestei boli.

În cadrul cercetărilor proprii au fost efectuate investigații epidemiologice în ferme de suine în care sindromul PRRS a evoluat sub forma unor focare primare și sub formă endemică, au fost urmărite unele aspecte clinice și mai ales anatomopatologice precum și prezența unor boli infecțioase bacteriene asociate. De asemenea, au fost efectuate investigații privind diagnosticul și imunoprofilaxia acestei boli.

Obiectivele principale urmărite în cadrul cercetărilor proprii au fost:

- ❖ evoluția unor parametri epidemiologici în funcție de statusul epidemiologic al fermelor și de categoria de vârstă;
- ❖ evoluția clinică și anatomopatologică a bolii, mai ales la tineretul suin, precum și prezența unor boli infecțioase bacteriene asociate;
- ❖ adaptarea reacției de imunofluorescență directă și preluarea ei ca metodă de diagnostic de rutină al sindromului PRRS;
- ❖ utilizarea tehnicii imunohistochimice în diagnosticul curent al sindromului PRRS;
- ❖ utilizarea unui vaccin inactivat în imunoprofilaxia sindromului PRRS, la scroafele de reproducție, în perioada de gestație care să asigure imunoprotecția purceilor în perioada post natală.

Cercetările efectuate alături de aceste obiective au avut ca scop și completarea datelor privind caracterele epidemiologice, evoluția anatomoclinică, diagnosticul și imunoprofilaxia sindromului PRRS în țara noastră.

CAPITOLUL IV. OBSERVAȚII EPIDEMIOLOGICE, ANATOMOCLINICE ȘI SEROLOGICE ÎN FOCARE DE PRRS

4.1. Observații epidemiologice în focare de PRRS

Cercetările epidemiologice au fost efectuate în 5 ferme de suine, din vestul țării, cu scopul de a elucida unele particularități privind evoluția unor parametrii epidemiologici, în funcție de categoria de vârstă, pe baza cărora boala poate fi suspicionată.

4.1.1. Materiale și metode

Examenul epidemiologic a fost efectuat în ferme sub forma anchetei epidemiologice, care a urmărit existența unor surse de infecție și evoluția a doi indicatori epidemiologici, respectiv mortalitatea cumulativă la tineretul suin după înțărcare și procentul de monte repetate la scroafe și scrofițe.

4.1.2. Rezultatele obținute

Anchetele epidemiologice, efectuate în fermele luate în studiu au furnizat date privind sursele de infecție prin intermediul cărora sindromul PRRS a pătruns în ferme, precum și evoluția în dinamică a celor doi indicatori epidemiologici urmăriți. În 4 din cele 5 ferme, luate în studiu, apariția acestui sindrom a fost consecința introducerii unor animale infectate, respectiv, scrofițe și vieri de reproducție achiziționate ca animale destinate efectivului matcă.

Ferma A. În această fermă de reproducție și îngrijire a suinelor, ancheta epidemiologică nu a evidențiat existența unor surse de infecție și nici date care să sugereze prezența sindromului PRRS.

Ferma B. La tineretul suin existent, în perioada efectuării anchetei epidemiologice, sindromul PRRS a fost confirmat prin examene de laborator.

Mortalitatea cumulativă, în medie, a fost de 8,42% (Fig.3), această valoare fiind încadrată în limitele mortalității generate de sindromul PRRS.

Ferma C. *Mortalitatea cumulativă* la tineretul suin după înțărcare a fost de 9,42% (fig. 3), valoare care corespunde mortalității generate de acest sindrom.

Montele repetate, exprimate procentual, au avut valoarea medie de 16,25% (fig. 4), în perioada investigată, valorile acestui indicator monitorizat încadrându-se în limitele constatate în cazul formei genitale a sindromului PRRS.

Ferma D. *Mortalitatea cumulativă*, la tineret a fost de 22,3% (fig. 3), iar *procentul montelor repetate*, a fost de 21,61% (fig. 4), pe durata efectuării cercetărilor, valorile acestor indicatori epidemiologici încadrându-se în limitele pierderilor produse de acest sindrom.

Ferma E. *Mortalitatea cumulativă*, la tineret a fost de 20,8% (fig. 3), iar *procentul montelor repetate* a avut valoarea de 22,11% (fig. 4), ambele valori fiind caracteristice evoluției endemice a acestei boli.

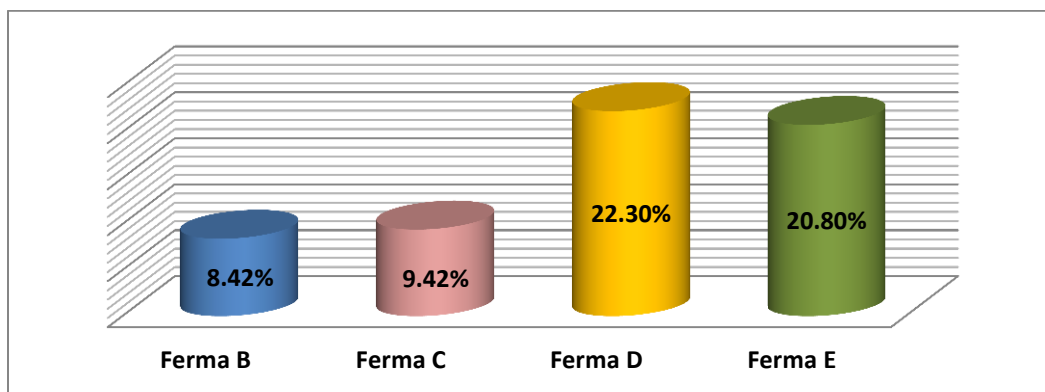


Figura 3. Mortalitatea cumulativă la tineret

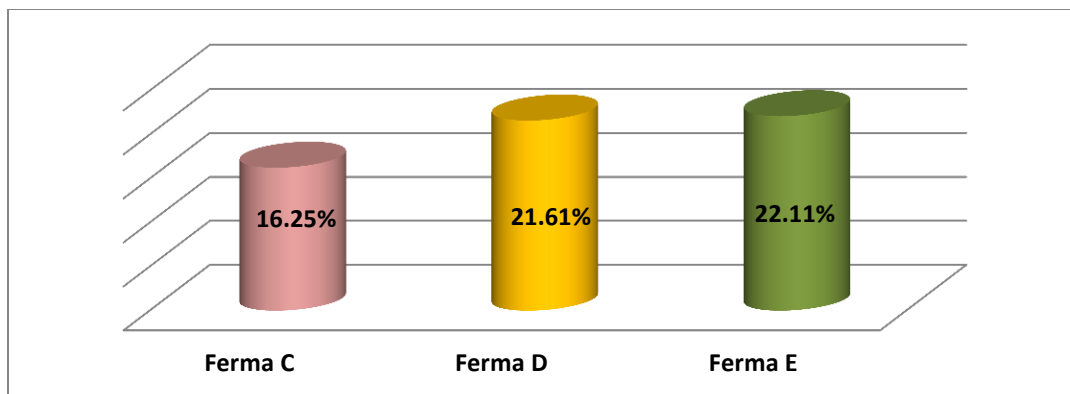


Figura 4. Media anuală a montelor repetate la scroafe și scrofițe

4.2. Observații anatomoclinice în focare de PRRS

4.2.1. Materiale și metode

4.2.1.1. Examenul clinic

Examenul clinic a fost efectuat la tineretul suin peste vârsta de 8 săptămâni și la scroafele și scrofițele gestante, fiind înregistrate simptomele caracteristice, acestui sindrom, atât în ceea ce privește localizarea respiratorie cât și localizarea genitală.

4.2.1.2. Examenul anatomopatologic

Au fost necropsiate și examinate anatomopatologic, un număr de 67 de cadavre, provenite de la tineret suin peste vârsta de 8 săptămâni.

Examenul histologic a fost efectuat din probe de limfonoduri și de pulmoni după metodologia clasică.

4.2.2. Rezultatele obținute

4.2.2.1. Rezultatele examenului clinic

La tineretul suin, după vârsta de 8 săptămâni, au fost prezente simptome generale și simptome respiratorii.

Simptomele generale depistate au fost: febra, inapetența, slăbirea progresivă și cianoza extremităților, la aproximativ 50% din animalele bolnave.

Simptomele respiratorii, au fost prezente la tineretul suin, din această categorie, precum și la suinele destinate îngrășării. Animalele bolnave au prezentat: jetaj, dispnee, tuse seacă, apoi grasă. Aceste simptome au evoluat cu intensități diferite încadrându-se în sindromul de bronhopneumonie.

La scroafe și scrofițe, evoluția clinică a fost diferită în funcție de fermă. Pe parcursul cercetărilor au fost semnalate avorturi, fături timpurii cu porci neviabili, hipogalaxie, călduri neregulate și monte repetate.

4.2.2.2. Rezultatele examenului anatomopatologic

Examenul necropsic, efectuat la cadavrele de tineret suin peste vârsta de 8 săptămâni, a furnizat date concludente privind prezența leziunilor specifice **sindromului PRRS** și a unor boli infecțioase bacteriene asociate. Rezultatele examenului anatomopatologic au fost prelucrate și redactate în tabel și pe grafice.

Examenul histologic a evidențiat leziuni microscopice caracteristice *limfonoditei*, care au fost reprezentate de depleție limfocitară, focare de necroză, limfocite de tip blastice și chiști de mici dimensiuni, situați în zona corticală.

Leziunile microscopice, caracteristice *pneumoniei interstițiale*, au fost reprezentate de îngroșarea pereților alveolari datorită infiltrației cu macrofage, limfocite, plasmocite și de hiperplazia pneumocitelor de tip II și de prezența unor celule necrotice în alveolele pulmonare.

Tabelul 1

Rezultatul examenului anatomopatologic la tineretul suin peste 8 săptămâni

Nr. Crt.	Leziunea	Nr. Cadavre	%
1	Congestie pulmonară	28/67	41,79
2	Edem pulmonar interstițial	19/67	28,35
3	Bronhopneumonie catarală	16/67	23,88
4	Bronhopneumonie fibrinoasă	31/67	46,26
5	Bronhopneumonie hemoragică	21/67	31,34
6	Pleurita fibrinoasă	33/67	49,25
7	Pericardită	14/67	20,89
8	Limfonodită	38/67	56,71
9	Poliserozită fibrinoasă	22/67	32,83
10	Miocardoză	24/67	35,82
11	Distrofie renală	44/67	65,67
12	Enterocolită hemoragică	18/67	26,86
13	Gastrită hemoragică	20/67	29,85

4.3. Examenul serologic

Acest examen a fost efectuat cu scopul de a confirma prezența sindromului PRRS, în fermele luate în studiu, pe baza prezenței anticorpilor specifici, având ca obiective atât precizarea diagnosticului cât și stabilirea seroprevalenței acestei boli.

4.3.1. Materiale și metode

Pentru efectuarea acestui examen au fost prelevate probe de sânge de la tineret suin și de la scroafe gestante și negestante din fiecare fermă. De la tineretul suin probele au fost prelevate la vârsta de 2 luni (R1) și la 5 luni (R2), iar de la scroafe probele au fost prelevate de două ori tot la interval de 3 luni.

Testul imunoenzimatic, a fost efectuat în cadrul laboratorului de serologie al S.N. Institutul Pasteur S.A. București, anticorpilor specifici fiind detectați prin varianta indirectă, a acestui test, utilizând trusa **INGEZIM PRRS 2.0 1.1.PR2. K. 1**.

4.3.2. Rezultatele obținute

Examenul serologic a confirmat sindromul PRRS și a stabilit seroprevalența acestuia, prin investigații seroepidemiologice, de tip transversal, efectuate în fermele luate în studiu. În acest scop, probele de sânge au fost prelevate la intervale de 3 luni, fiind utilizat testul imunoenzimatic.

Analizând aceste rezultate se observă că sindromul PRRS a fost confirmat în 4 din cele 5 ferme, luate în studiu, atât la tineret cât și la scroafe.

Tabelul 2

Rezultatele examenului serologic

Nr. crt.	Ferma	Data	Categoria de vârstă	Nr probe				
				Pozitive		Media D.O	Negative	
				Nr.	%		Nr.	%
1	Ferma B	R1	Tineret 2,5 luni	24	100	0,486	0	0
2	Ferma B	R2	Tineret 6 luni	20	100	0,950	0	0
3	Ferma C	R1	Tineret 1,5 luni	4	36,36	0,585	7	63,63
4	Ferma C	R1	Scroafe	4	33,36	0,512	7	63,63
5	Ferma C	R2	Tineret 6 luni	3	27,27	0,477	8	72,73
6	Ferma C	R2	Scroafe	5	50,00	0,861	5	5,00
7	Ferma D	R1	Tineret 1,5 luni	3	30,00	0,929	7	70,00
8	Ferma D	R1	Scroafe	6	60,00	1,279	4	40,00
9	Ferma D	R2	Tineret 6 luni	4	33,36	0,685	7	63,63
10	Ferma D	R2	Scroafe	7	63,63	1,179	4	33,36
11	Ferma E	R1	Tineret 1,5 luni	13	100	0,605	0	0
12	Ferma E	R1	Scroafe	8	72,72	0,784	3	27,27
13	Ferma E	R2	Tineret 6 luni	12	100	0,925	0	0
14	Ferma E	R2	Scroafe	8	72,72	0,870	3	27,27
15	Ferma A	R1	Tineret 1,5 luni	0	0	0	15	100
16	Ferma A	R2	Scroafe	0	0	0	15	100
Total probe tineret R1				44	60,27	-	29	39,73
Total probe tineret R2				39	72,22	-	15	27,78
Total probe scroafe R1				18	38,30	-	29	61,70
Total probe scroafe R2				20	62,5	-	12	37,5

Seroprevalența la tineret. La această categorie, de vârstă, seroprevalența sindromului PRRS (tabelul 2) a avut valori diferite, în cele 4 ferme, atât la recoltarea I-a cât și la recoltarea a II-a. În două ferme (B și E) toate probele au fost pozitive, iar în fermele C și D, seroprevalența a fost cuprinsă între 27,27% și 36,36%. În ferma A, sindromul PRRS nu a fost confirmat serologic, rezultatele fiind negative, acest aspect fiind confirmat și prin tehnica RT-PCR.

Seroprevalența la scroafe. La scroafele de reproducție, seroprevalența sindromului PRRS a avut valori diferite în fermele investigate.

În fermele C, D și E valorile seroprevalenței, exprimate procentual, au confirmat prezența sindromului PRRS, care, a evoluat sub formă endemică. Analizând rezultatele seroprevalenței, la cele două recoltări, se observă că în ferma C și în ferma D, acest indicator a evoluat, în dinamică, ceea ce denotă o infecție activă la scroafele de reproducție, dovedită de fenomenul de seroconversie. În ferma E, valorile procentuale ale seroprevalenței au fost egale la ambele recoltări, sugerând o evoluție staționară a bolii.

4.4. Discuția rezultatelor

Pe baza rezultatelor furnizate de **examenul epidemiologic** efectuat sub formă de anchete epidemiologice, în fiecare fermă, a fost suspiciat sindromul PRRS confirmat, ulterior, în 4 din cele 5 ferme prin examenele de laborator efectuate.

Examenul clinic și anatomopatologic au furnizat date certe privind prezența acestei boli în 4 ferme, simptomele și leziunile anatomopatologice, la tineretul suin, au fost caracteristice, iar simptomele la scroafele și scrofițele de reproducție au fost de asemenea specifice bolii.

Testul imunoenzimatic, este recomandat deoarece titrurile anticorpilor exprimate în D. O. sunt decelate, relativ ușor la toate categoriile de vârstă.

Evoluția seroprevalenței la scroafe și tineret, a fost diferită, de la fermă, la fermă. În ferma C, seroprevalența a avut valorile cele mai mici, iar în fermele D și E a avut valori mai mari.

Analizând rezultatele obținute în cele 3 ferme amintite, rezultă că la tineretul suin, după înțarcare valorile seroprevalenței, ca indicator epidemiologic, au relevat situații epidemiologice diferite. Astfel, în ferma C seroprevalența a avut valori mai mari la vârsta de două luni (R1), după care a scăzut progresiv, astfel că la vârsta de 5 luni (R2), valoarea seroprevalenței a fost mai mică. În ferma D, valorile seroprevalenței au crescut progresiv, fiind mai mari la vârsta de 5 luni (R2), iar în ferma E valorile seroprevalenței au fost egale atât la vârsta de 2 luni cât și la vârsta de 5 luni (fig. 15).

Aceste rezultate evidențiază că, în ferma C, infecția la tineret s-a produs sub vârsta de 2 luni, deoarece datele obținute evidențiază o regresie a seroconversiei, în ferma D, infecția s-a produs în jurul vârstei de 2 luni, deoarece datele obținute evidențiază o creștere a seroconversiei, iar în ferma E datele indică o infecție endemică permanentă la tineretul suin după înțarcare.

Cercetările proprii au fost finalizate prin 9 concluzii cu importanță practică privind supravegherea și diagnosticul sindromului PRRS.

CAPITOLUL V. CERCETĂRI PRIVIND DETECȚIA ARN-ULUI VIRAL

Cercetările care fac obiectul acestui capitol au fost efectuate cu scopul de a confirma prezența sindromului PRRS în fermele luate în studiu și de a încadra tulpinile detectate în cadrul PRRSV1 sau PRRSV2.

5.1. Materiale și metode

5.1.1. Probele de material patologic

De la cadavre de tineret suin, din fermele în care această boală a evoluat, au fost prelevate 19 limfonoduri ingvinale și 6 probe de pulmon cu leziuni anatomopatologice macroscopice caracteristice, pentru detecția PRRSV1 și PRRSV2.

Procedura standard operațională a RT-PCR, varianta Real Time, elaborată de GILBERT S.A., și col., în anul 1997, a fost efectuată cu scopul de a confirma sindromul PRRS, rezultatele obținute fiind considerate ca rezultate de referință pentru două tehnici de laborator care au urmărit detecția antigenelor virale în celulele din limfonoduri.

Pentru diferențierea PRRSV1 și PRRSV2 au fost utilizate 5 variante ale tehnicii RT-PCR recomandate de mai mulți cercetători.

5.1.2. Detecția ARN-ului viral

Genomul viral al PRRSV1, fost detectat prin Procedura standard operațională a RT-PCR, varianta Real Time, utilizată în Laboratorul de Biologie moleculară al SN Institutul Pasteur SA București. În acest scop au fost utilizate 4 kituri de extracție (Qiagen și Roche, Germania) și 2 primeri specifici zonei ORF 7:

- Primer PRRS -2 ORF 7: 5' – GCG AAT CAG GCGCAC WGT ATG - 3' ;

- Primer PRRS-4 ORF 7: 5' – AGA AAA GTA CAG CTC CGA TGG - 3' ;

Prin tehnica descrisă a RT-PCR, varianta Real Time, au fost identificate mai multe probe pozitive de limfonoduri și de pulmoni, iar pentru încadrarea tulpinilor în unul din cele două virusuri au fost utilizate următoarele variante ale tehnicii RT – PCR:

- rRT-PCR PRRS orf7-EU Truyen (1step);
- rRT-PCR PRRS orf7-NA Truyen (1step);
- RT + rPCR PRRS orf1b-EU Gilbert (2steps);
- RT + rPCR PRRS orf1b-comun Gilbert (2steps);
- Nested PCR: RT-PCR PRRS orf7 Mardassi + rPCR PRRS orf7-EU Truyen.

5.2. Rezultatele obținute

Procedura standard operațională a RT-PCR, varianta Real Time a confirmat prezența ARN-ului viral în toate probele examinate, atât de limfonoduri cât și în pulmoni. Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului viral au avut dimensiuni diferite și sunt redată în imaginile gel-electroforezei. În figura 19, sunt redată rezultatele obținute prin tehnica amintită, care a detectat ARN-ul viral în toate probele examinate.

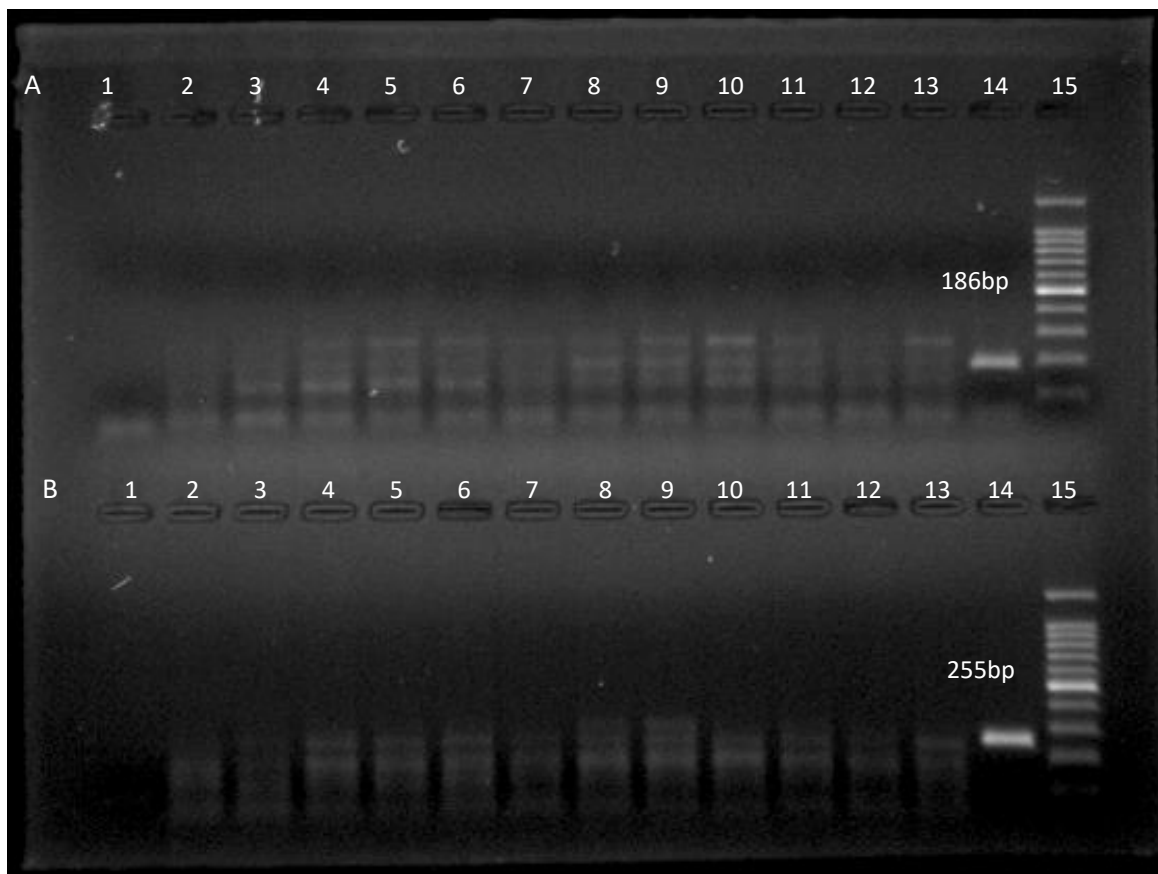


Fig. 19. Electroforeza de confirmare post rPCR PRRS *orf1b*Gilbert (A – *orf1b*-EU si B – *orf1b*-EU+NA).

Pentru identificarea PRRSV1 și PRRSV2 alături de această variantă, a tehnicii RT-PCR, au mai fost utilizate încă 3 variante, inclusiv o variantă nested PCR, cu care au fost testate 12 limfonoduri, iar ca probe martor au fost utilizate *tulpinile* VP046bis și NFW. Rezultatele acestor variante sunt redată în figurile următoare:

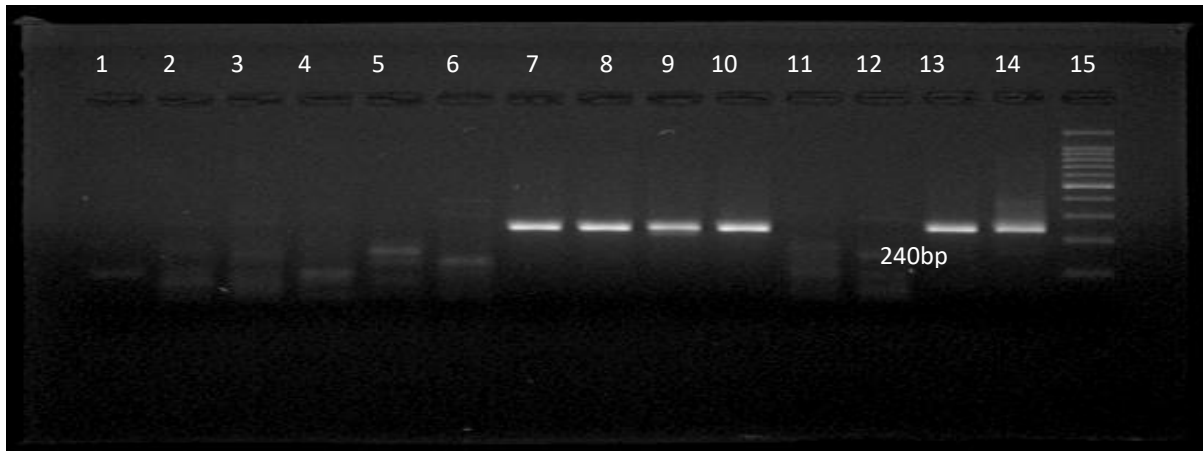


Fig. 21. Electroforeza de confirmare post r nPCR PRRS orf7-EU Truyen.

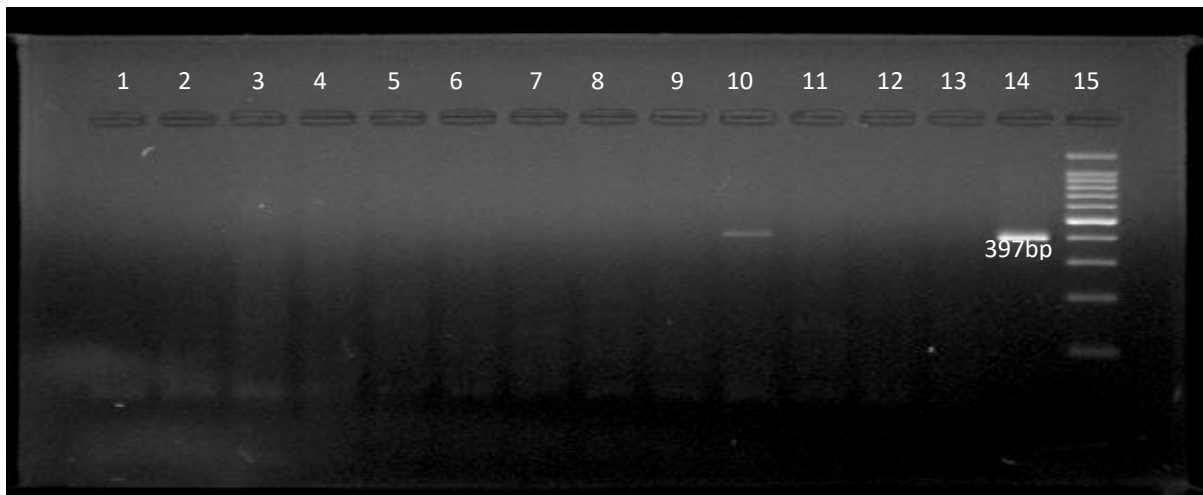


Fig. 23. Electroforeza de confirmare post rPCR PRRS orf7 Mardassi.

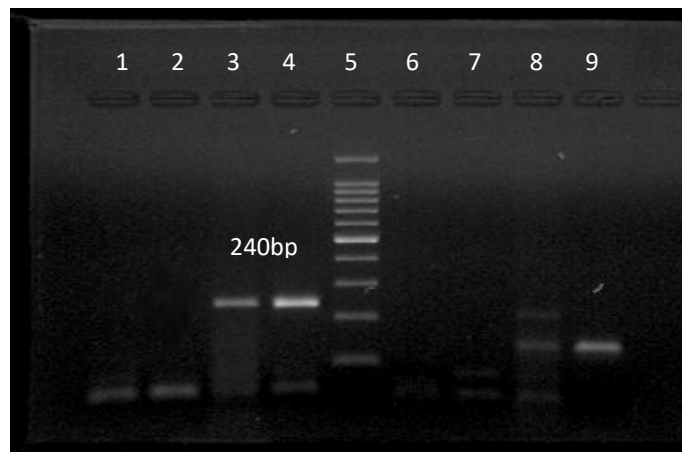


Fig. 25 Electroforeza de confirmare post rPCR PRRS orf 7 Truyen EU (liniile 1-4) și US (liniile 6-9)

Rezultatele obținute au confirmat diagnosticul sindromului PRRS în efectivele de tineret suin în care această boala a fost suspiciionată pe baza examenelor epidemiologice, clinice și anatomopatologice și au demonstrat că în aceste efective tulpinile circulante aparțin PRRSV1. De asemenea, aceste rezultate au reprezentat datele de referință pentru tehnica de imunofluorescență directă și pentru tehnica imunohistochimică care au fost utilizate cu scopul de a evidenția antigenele virale, în celulele din limfonoduri și în celulele din parenchimul pulmonar.

5.3. Discuția rezultatelor

Tehnica RT-PCR a confirmat prezența PRRSV1, în materiale patologice, reprezentate de limfonoduri ingvinale și parenchim pulmonar. Această tehnică a fost utilizată, în variantele prezentate, atât pentru confirmarea diagnosticului, cât și pentru încadrarea tulpinilor în PRRSV1 sau PRRSV2.

Având în vedere faptul că la nivel mondial tulpinile de virus, care produc focare de PRRS, pot aparține fie PRRSV1, fie PRRSV2, precum și faptul că rezultatele furnizate de unele tehnici și kit-uri pot fi fals negative, majoritatea autorilor recomandă mai multe variante ale tehnicii RT-PCR pentru încadrarea acestor tulpini într-unul din cele două virusuri. În acest scop, în cadrul cercetărilor proprii probele de limfonoduri au fost examinate și prin alte 3 variante de lucru, inclusiv varianta nested RT-PCR, prezentate anterior și recomandate de GILBERT, MARDASSI și TRUYEN.

Rezultatele obținute sunt asemănătoare cu datele existente în literatura de specialitate, din țară sau străinătate, privind originea filogenetică a tulpinilor de virus PRRS.

Rezultatele au fost finalizate prin 3 concluzii importante, referitoare la diagnosticul sindromului PRRS și la prezența tulpinilor aparținând PRRSV1.

CAPITOLUL 6. DETECȚIA ANTIGENELOR VIRALE

PRRSV1 și PRRSV2 au o structură antigenică complexă reprezentată de proteine și glicoproteine virale codificate de anumite gene existente în zone ORF ale ARN-ului viral. Structurile antigenice semnificative atât pentru inducerea răspunsului imun specific cât și pentru diagnostic sunt următoarele: proteina N, proteina M, proteinele nestructurale, glicoproteina GP4 și glicoproteina GP5 considerată ca principală inductoare a răspunsului imun protectiv.

Cercetările proprii au fost efectuate cu scopul de a adapta reacția de imunofluorescență directă în diagnosticul de rutină al sindromului PRRS și de a implementa tehnica imunohistochimică, care în țara noastră nu a fost utilizată în diagnosticul acestei boli.

6.1. Reacția de imunofluorescență directă

Deoarece tehnica de imunofluorescență indirectă (IFI), efectuată pe criosecțiuni, necesită o dotare complexă, a laboratoarelor de diagnostic, mai exact necesită existența unui criotom, cercetările efectuate au urmărit elaborarea unei metode rapide, în varianta directă a tehnicii de imunofluorescență (IFD), de evidențiere a antigenelor virale pe frotiuri efectuate prin aprență din limfonoduri.

6.1.1. Materiale și metode

Pentru detecția antigenelor virale au fost prelevate limfonoduri ingvinale, cu leziuni anatomopatologice macroscopice (fig. 18), caracteristice sindromului PRRS, de la cadavre de tineret suin, din ferme în care această boală a fost confirmată prin tehnica RT-PCR. Aceste limfonoduri în care ARN-ul viral a fost detectat au fost utilizate pentru efectuarea aprențelor pe lame de sticlă destinate tehnicii IFD.

Antigenul viral nucleocapsidal a fost detectat cu ajutorul kit – ului Anti PRRSV monoclonal antibody labelled with fluorescein isothiocyanate -BIO 268 (fig. 27), furnizat de BIO-X Diagnostics.

6.1.2. Rezultatele obținute

Frotiurile obținute după tehnica descrisă au fost examinate la microscopul cu lumină ultravioletă, iar rezultatele obținute sunt redate în tabelul 5.

Pe frotiurile efectuate din limfonoduri imaginea câmpului microscopic a fost diferită fiind vizualizate celule izolate, celule grupate, sau aglomerări mari de celule.

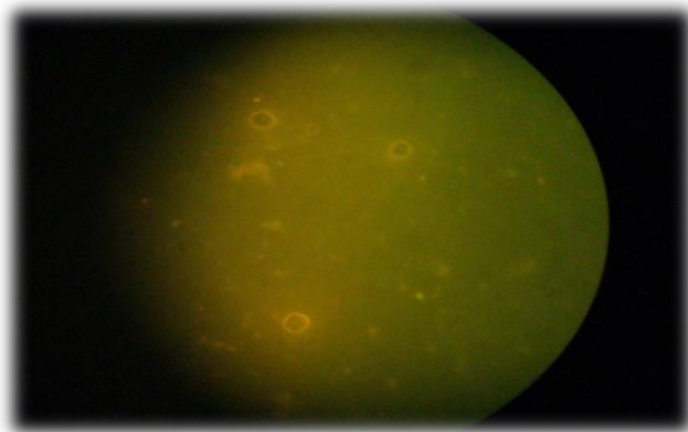


Fig. 30. Limfocite cu citoplasma fluorescentă (limfonod ingvinal)

În cazul probelor pozitive, în câmpul microscopic, au predominat limfocite cu dimensiuni diferite care pot fi interpretate ca limfocite mici, mijlocii, mari și plasmocite, a căror citoplasmă a fost intens fluorescentă datorită faptului că antigenele virale au fost cuplate cu anticorpii marcați cu fluoresceină. Mărimea limfocitelor cu citoplasmă fluorescentă poate fi apreciată după conturul celular evident, nucleii bine individualizați, iar raportul între nucleu și citoplasmă a fost aproximativ egal (limfocite mici și mijlocii). Limfocitele mari au avut un aspect asemănător, plasmocitele au avut o formă alungită cu nucleu oval, cu citoplasma dominantă în raport cu nucleul. Citoplasma celulelor infectate, cu virusul PRRS, a avut un aspect galben-verzui strălucitor.

6.2. Tehnica imunohistochimică

Testul imunohistochimic evidențiază, în citoplasma celulelor infectate, antigenele virale, respectiv, nucleocapsida, cu ajutorul anticorpilor obținuți pe șoareci sau pe iepuri cuplați cu imunoperoxidază. Complexele antigen-anticorp sunt vizualizate la microscop cu ajutorul unor conjugate formate din anticorpii secundari cuplați cu diferite substanțe chimice care reacționează cu imunoperoxidaza, rezultând, în citoplasma celulelor infectate, structuri granulare de culoare maro.

În cadrul cercetărilor proprii această tehnică a fost utilizată în diagnosticul sindromului PRRS cu ajutorul kit-ului *Indirect immunoperoxidase assay* furnizat de firma BIO-X Diagnostics, iar rezultatele obținute au fost comparate cu tehnica RT-PCR și tehnica IFD.

6.2.1. Materiale și metode

Din fiecare limfonod au fost secționare probe de formă aproximativ paralelipipedică destinate protocolului de lucru care conține 3 părți, cu mai multe etape.

6.2.2. Rezultatele obținute

Metoda de lucru utilizată a permis fixarea anticorpilor primari cuplați cu peroxidază, existenți în kit-ul utilizat, de nucleocapsida virală, ulterior, complexe antigen-anticorp-peroxidază au fost vizualizate cu ajutorul anticorpilor secundari iar, prin adăugarea 3,3'-diaminobenzidină, care reacționează cu peroxidaza rezultă o culoare brun închisă granulară care indică prezența antigenelor virale în citoplasma celulelor.

În secțiunile examinate a fost evidențiată culoarea maro, prezentă în citoplasma celulelor din centrul germinativ al zonei medulare. Acest aspect este considerat ca expresie a PRRSV1, respectiv o imagine pozitivă pentru prezența antigenelor virale în citoplasma limfocitelor din coroana limfocitară. De asemenea, prin această tehnică au fost vizualizate și zone de necroză și de depleție a acestor centruri (fig. 32, 33).

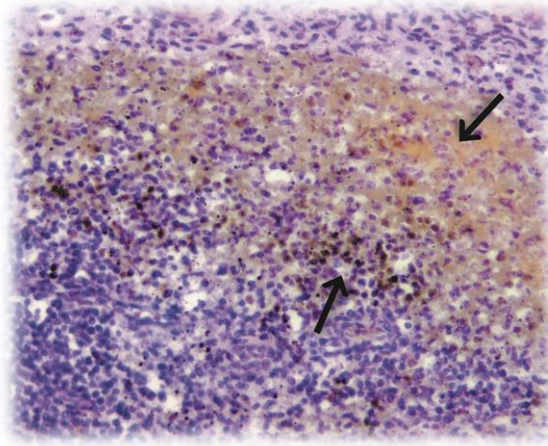


Fig. 33. Secțiune prin limfonod: celule cu citoplasma granulară maro

Aspectul caracteristic, furnizat de tehnica IHC utilizată, a fost prezent în secțiunile efectuate de la 20 de limfonoduri (tabel 5), rezultatele pozitive fiind confirmate de tehnica RT-PCR.

6.3. Discuția rezultatelor

Având în vedere dotările laboratoarelor precum și costurile generate de utilizarea unor aparate (criotom), în cadrul cercetărilor proprii am urmărit adaptarea unei metode rapide de diagnostic de rutină, respectiv adaptarea unei variante a **reacției de imunofluorescență directă** care să pună în evidență antigenele virale pe frotiuri efectuate din amprente de limfonoduri cu leziuni caracteristice bolii.

Pentru confirmarea rezultatelor furnizate de această metodă limfonodurile au fost examinate în prealabil prin tehnica RT-PCR și prin tehnica imunohistochimică. Cu alte cuvinte am urmărit compararea rezultatelor obținute cu metoda de rutină care este utilizată pentru detecția ARN-ului viral și cu metoda utilizată frecvent pentru detecția antigenelor virale.

Rezultatele obținute în cadrul cercetărilor inițiale au demonstrat, că această metodă rapidă evidențiază complexe antigen-anticorp în citoplasma limfocitelor și plasmocitelor existente în limfonoduri. Aceste cercetări au fost extinse în cadrul tezei și au fost comparate cu rezultatele furnizate de tehnica RT-PCR considerată ca metodă de referință. La probele de limfonoduri examinate prin cele două tehnici de laborator rezultatele au fost pozitive, ceea ce confirmă că evidențierea antigenelor nucleocapsidale în limfocitele și plasmocitele din limfonoduri prin tehnica IFD poate fi utilizată ca metodă de diagnostic de rutină al sindromului PRRS.

Reacția de imunofluorescență indirectă a fost utilizată, până în prezent, numai pentru detecția antigenelor nucleocapsidale ale virusurilor PRRSV1 și PRRSV2 în criosecțiuni efectuate din limfonoduri, pulmoni și alte organe limfoide, însă cercetările proprii au urmărit utilizarea tehnicii IFD în diagnosticul bolii, având în vedere faptul că pentru obținerea frotiurilor prin amprentă nu este necesar criotomul cu echipamentele aferente.

Tehnica imunohistochimică este recomandată de către mai mulți autori însă utilizarea ei este limitată datorită costurilor generate de achiziția kit-urilor și de existența personalului cu experiență care lucrează în laboratoare. În cadrul cercetărilor efectuate această tehnică a fost utilizată ca o metodă de referință privind evidențierea antigenelor virale pentru a compara rezultatele obținute în cadrul cercetărilor proprii între această tehnică și tehnica IFD.

6.4. Concluzii

Pe baza rezultatelor obținute în acest capitol au fost formulate 7 concluzii.

CAPITOLUL VII. CERCETĂRI IMUNOPROFILACTICE ÎN SINDROMUL PRRS

La cele două virusuri alături de diferențele genetice există și unele structuri chimice, cu rol antigenic, reprezentate de proteina N, considerate antigen de tip având și o secvență hidrofobă, prezentă numai la PRRSV 1, care include glicoproteinele GP2, GP3 și GP4, GP 5.

Diferențele care deosebesc aceste două virusuri pot genera și unele insuccese ale imunoprofilaxiei sindromului PRRS. De asemenea, tipurile de vaccinuri, respectiv vaccinurile vii și vaccinurile inactivate precum și situația epidemiologică existentă în populațiile de suine, crescute în sistem intensiv, contribuie la obținerea unor rezultate diferite privind imunoprofilaxia.

Cercetările efectuate, în cadrul acestui capitol, au urmărit efectul imunoprolifactic al unui vaccin inactivat administrat la scroafele gestante, respectiv a fost urmărită dinamica titrurilor anticorpilor post-vaccinali, exprimate în D.O., atât la scroafe cât și la purceii sugari.

7.1. Materiale și metode

Pentru studierea în dinamică a răspunsului imun post-vaccinal a fost utilizat vaccinul SUIPRAVAC-PRRS, produs de Laboratorios HIPRA, S.A., Spania. Acest vaccin este inactivat și este recomandat în imunoprofilaxia sindromului PRRS (fig. 34).

Vaccinul a fost administrat la un lot de 10 scroafe crescute tradițional, provenite din populații de suine rustice. A fost aleasă această variantă deoarece în fermele industriale accesul pentru diverse investigații sau pentru cercetare este limitat sau interzis, sau pentru că în majoritatea fermelor de reproducție, din această zonă geografică, evoluează sindromul PRRS. În prealabil, lotul de scroafe a fost controlat serologic pentru evidențierea statusului imunologic al fiecărui animal din punct de vedere al acestei boli.

De la fiecare animal au fost prelevate probe de sânge, din confluentul jugular după cum urmează:

- ❖ R1 – înainte de prima vaccinare;
- ❖ R2 – la 21 zile după prima vaccinare;
- ❖ R3 – la două săptămâni după data fătării.

Răspunsul imun indus de anticorpii specifici maternali a fost urmărit în dinamică, la purceii fiecărei scroafe, fiind recoltate probe de sânge de la fiecare purcel, de la nivelul confluentului jugular, sau din ureche, după cum urmează:

- ❖ R1 – la 14 zile post natal;
- ❖ R2 – la 30 de zile post natal;
- ❖ R3 – la 45 de zile post natal.

Pentru determinarea titrurilor anticorpilor specifici a fost utilizat testul imunoenzimatic, în acest scop fiind folosit kit-ul IDEXX PRRS X3, produs de IDEXX Laboratories, Inc.

7.2. Rezultate și discuții

La scroafe, la *recoltarea I-a*, respectiv înainte de vaccinare, densitățile optice au avut valori foarte mici, deoarece acestea au provenit din populații rustice de suine crescute în sistem tradițional, ceea ce evidențiază absența unui răspuns imun post infecțios, care confirmă faptul că animalele au fost indemne.

La *recoltarea a II-a*, respectiv la 21 de zile după prima vaccinare, densitățile optice ale titrurilor anticorpilor specifici au avut valori mari, rezultatele fiind considerate pozitive la fiecare scroafă vaccinată.

La *recoltarea a III-a*, respectiv la 14 zile de la dată fătării, densitățile optice au avut, de asemenea, valori mari, media geometrică fiind de 1,83 ori mai mare decât media geometrică a densităților optice obținute după vaccinarea a II-a.

Evoluția individuală a densităților optice și a mediilor geometrice reflectă existența unui răspuns imun post vaccinal, a cărui dinamică a crescut progresiv, în intensitate, seroconversia fiind mai evidentă după vaccinarea de rapel. Din motive obiective scroafele vaccinate nu au putut fi monitorizate serologic pe o durată mai lungă de timp, de cel puțin 4 luni așa cum prevăd instrucțiunile producătorului acestui vaccin.

Tabelul 6

Rezultatele examenului serologic la scoarfa

Nr. probe	Scroafa	R1/V1			R2/V2			R3			OBS.
		D.O.	S/P	Rez.	D.O.	S/P	Rez.	D.O.	S/P	Rez.	
1	S1	0.118	<0,40	N	1.801	>0,40	P	2.901	>0,40	P	
2	S2	0.098	<0,40	N	1.510	>0,40	P	2.910	>0,40	P	
3	S5	0.117	<0,40	N	1.650	>0,40	P	2.650	>0,40	P	
4	S7	0.111	<0,40	N	1.751	>0,40	P	3.151	>0,40	P	
5	S8	0.116	<0,40	N	1.915	>0,40	P	3.915	>0,40	P	
6	S3	0.103	<0,40	N	1.610	>0,40	P	3.820	>0,40	P	
7	S4	0.103	<0,40	N	1.710	>0,40	P	2.912	>0,40	P	
8	S6	0.114	<0,40	N	1.331	>0,40	P	3.610	>0,40	P	
9	S10	0.094	<0,40	N	1.625	>0,40	P	2.390	>0,40	P	
10	S12	0.106	<0,40	N	1.910	>0,40	P	2.850	>0,40	P	
	Media geometrica	0.11	<0,40	N	1.67	>0,40	P	3.07	>0,40	P	

La purcei, la recoltarea I-a, respectiv la 14 zile după fătare, valorile densităților optice au indicat răspunsuri pozitive, la fiecare lot de purcei (tabel 7).

La recoltarea a II-a, respectiv la 30 de zile post natal și la recoltarea a III-a, respectiv la 45 de zile post natal, valorile mediilor geometrice au fost aproximativ egale, fiind mult mai mari decât valorile mediilor geometrice obținute la recoltarea I-a. Acest aspect al dinamicii mediilor geometrice, ale densităților optice, indică un status imun semnificativ al purceilor proveniți din scoarfele vaccinate, însă tot din motive obiective nu a putut fi monitorizată durata acestui răspuns imun.

Menționăm că la loturile de purcei valorile densităților optice redate în tabele reprezintă, de fapt, mediile geometrice ale densităților optice obținute la fiecare lot de purcei.

Tabelul 7

Rezultatele examenului serologic la purcei

Nr. probe	Lot	R1/14 zile			R2/30 zile			R3/45 zile		
		D.O.	S/P	Rez.	D.O.	S/P	Rez.	D.O.	S/P	Rez.
1	L1/S1	1.076	>0,40	P	2.850	>0,40	P	3.111	>0,40	P
2	L2/S2	1.910	>0,40	P	2.650	>0,40	P	2.915	>0,40	P
3	L3/S5	1.091	>0,40	P	2.167	>0,40	P	3.212	>0,40	P
4	L4/S7	1.33	>0,40	P	1.931	>0,40	P	2.045	>0,40	P
5	L5/S8	2.15	>0,40	P	2.850	>0,40	P	2.575	>0,40	P
6	L6/S3	1.613	>0,40	P	3.820	>0,40	P	3.601	>0,40	P
7	L7/S4	1.421	>0,40	P	2.900	>0,40	P	2.951	>0,40	P
8	L8/S6	1.332	>0,40	P	3.611	>0,40	P	3.222	>0,40	P
9	L9/S10	1.755	>0,40	P	3.572	>0,40	P	3.600	>0,40	P
10	L10/S12	1.813	>0,40	P	2.915	>0,40	P	2.720	>0,40	P
	Media geometrica	1.51	>0,40	P	2.87	>0,40	P	2.96	>0,40	P

Având în vedere aceste aspecte, privind utilizarea vaccinurilor vii, în cadrul cercetărilor proprii am monitorizat răspunsul imun post vaccinal indus de un vaccin inactivat comercial, atât la scoarfe cât și la purceii obținuți de la acestea. Intensitatea răspunsului imun a fost stabilită prin testul imunoenzimatic de competiție, cu un

kit comercial, iar titrurile anticorpilor specifici exprimate în D.O. au indicat un fenomen de seroconversie suficient de intens la scroafe și au indicat totodată transmiterea colostrală a anticorpilor specifici la purcei.

7.3. Concluzii

Pe baza rezultatelor obținute au fost formulate 6 concluzii

8. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

- ❖ Prezența sindromului PRRS, în fermele investigate, a fost suspionată pe baza examenului epidemiologic, clinic și anatomopatologic, fiind ulterior confirmată prin următoarele examene de laborator: ELISA, IFD, IHC și RT-PCR.
- ❖ În fermele în care a evoluat acest sindrom mortalitatea cumulativă la tineret și monte repetate la scroafe au evoluat în limitele caracteristice focarelor primare;
- ❖ Sindromul PRRS a evoluat la tineretul peste 8 săptămâni cu semne generale și respiratorii, iar la scroafe cu avorturi, purcei neviabili, hipogalaxie și monte repetate;
- ❖ În forma respiratorie, a acestei boli, leziunile anatomopatologice macroscopice au fost reprezentate de: edemul pulmonar, pneumonia interstițială și limfonodita catarală sau hemoragică, iar leziunile microscopice au fost reprezentate de: depleția limfocitară, necroză sub formă de focare și limfocite de tip blastic în limfonoduri și de infiltrația cu macrofage, limfocite, plasmocite și hiperplazia pneumocitelor în parenchimul pulmonar;
- ❖ Testul ELISA, a evidențiat seroconversia caracteristică focarelor active ale acestui sindrom, iar pe baza acestui aspect testul poate fi utilizat atât în diagnostic cât și în epidemiosupravegherea acestei boli;
- ❖ Prin tehnica standard operațională a RT-PCR, varianta Real Time a fost detectat PRRSV1, iar cu ajutorul a altor 3 variante utilizate au putut fi eliminate rezultatele fals negative și a putut fi stabilită apartenența tulpinilor detectate în cadrul PRRSV1;
- ❖ Reacția de IFD, efectuată pe frotiuri din limfonoduri cu ajutorul kit-ului utilizat, a evidențiat prezența antigenelor virale în citoplasma celulelor infectate, iar rezultatele obținute o recomandă ca metodă rapidă de diagnostic a sindromului PRRS;
- ❖ Prin tehnica IHC, cu ajutorul kit-ului utilizat au fost evidențiate antigenele virale cu aspect granular, de culoare maro, în citoplasma centrilor germinativi din limfonoduri, iar rezultatele furnizate o recomandă ca metodă în diagnosticul de rutină al sindromului PRRS;
- ❖ Rezultatele furnizate de reacția de IFD și de tehnica IHC, au fost confirmate de tehnica RT-PCR, fiind evidențiată importanța detecției antigenelor virale în celulele infectate din limfonoduri, în diagnosticul acestui sindrom;
- ❖ La scroafele gestante, vaccinul inactivat utilizat a indus un răspuns imun progresiv, titrurile anticorpilor specifici exprimate în D.O. având valori crescute atât după vaccinarea I-a cât și după vaccinarea a II-a;
- ❖ La purceii sugari, titrurile anticorpilor specifici exprimate în D.O. au avut valori care au crescut progresiv de la 14 zile post natal, până la 45 de zile post natal, sugerând o protecție bună față de infecția cu PRRSV1

RECOMANDĂRI

- ❖ Testul ELISA poate fi utilizat în epidemiosupravegherea sindromului PRRS în fermele de suine, precum și în diagnosticul bolii la animalele în viață;
- ❖ Reacția de IFD poate fi preluată ca metodă de rutină, în diagnosticul acestui sindrom deoarece are costuri mult mai mici comparativ cu reacția IFI;
- ❖ Tehnica IHC poate fi utilizată tot ca metodă de rutină în diagnosticul bolii, întrucât evidențiază antigenele virale în citoplasma celulelor infectate;
- ❖ Vaccinarea scroafelor gestante cu un vaccin anti-PRRS inactivat induce un răspuns imun protectiv la purcei pe o perioadă în care sensibilitatea acestora este maximă față de acest sindrom, reprezentând o metodă eficace în prevenirea acestei boli.

CONTRIBUȚII PERSONALE

În cadrul cercetărilor proprii efectuate cu scopul finalizării tezei de doctorat au fost îndeplinite toate obiectivele propuse, în final fiind realizate următoarele contribuții personale după cum urmează:

- ❖ adaptarea tehnicii IFD, pentru diagnosticul de rutină al sindromului PRRS, metodă propusă și utilizată pentru prima dată în țara noastră;
- ❖ utilizarea tehnicii IHC bazată pe evidențierea antigenelor virale în diagnosticul de rutină al sindromului PRRS, utilizată pentru prima dată în țara noastră;
- ❖ utilizarea unui vaccin inactivat în imunoprofilaxia sindromului PRRS în fermele de suine indemne față de această boală, monitorizarea răspunsului imun prin stabilirea titrurilor anticorpilor exprimate în D.O., la scroafe și purcei fiind făcută pentru prima dată în țara noastră.