

REZUMATUL

Tezei de doctorat

CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE, ANATOMOCLINICE, DE LABORATOR ȘI IMUNOPROFILACTICE ÎN BURSITA INFECȚIOASĂ AVIARĂ

Avicultura reprezintă o ramură importantă a agriculturii și implicit a economiei pentru că asigură atât produse alimentare cât și produse și subproduse utilizate în industrie. Dezideratele amintite au contribuit la intensivizare și o rentabilizare a fermelor avicole, indiferent de categoria de producție și de vârstă. În permanență a fost acordată o atenție privind obținerea hibridilor cu potențial productiv performant, fiind urmărită rentabilizarea fermelor de păsări.

Ca urmare a comerțului cu material avicol, cu carne de pasăre congelată și cu ouă, la nivel mondial s-au răspândit mai multe boli infecțioase, virale sau bacteriene, care pot evolua în prezent ca boli endemice de fermă. În mare parte, aceste boli sunt condiționate de prezența unor factori favorizanți intrinseci și extrinseci. Acești factori diminuează rezistența organismului păsărilor, reduc consumul specific de furaje sau unii dintre ei așa cum sunt unele virusuri sau unele vaccinuri vi atenuate pot induce stări imunosupresive.

După anul 1920 pe continentul Nord American unde a început prima dată intensivizarea aviculturii, au apărut mai multe boli infecțioase cu etiologie virală, dintre care s-a detașat ca importanța bursitei infecțioase aviare, semnalată pentru prima dată în anul 1962. Aceste boli au fost semnalate în timp și în fermele avicole din România, astfel că în anul 1968 ADAMEȘTENU I., semnalează pentru prima dată bursita infecțioasă aviară.

Având în vedere aceste deziderate am considerat oportun abordarea acestei teme de cercetare cu scopul de a investiga particularitățile epidemiologice și anatomoclinice ale unor focare de BIA, de a utiliza unele tehnici de diagnostic de mare actualitate și de a contribui la completarea datelor privind imunoprofilaxia acestei boli.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat, au avut următoarele obiective:

- monitorizarea epidemiologică și clinico-anatomică a BIA în patru ferme de pui broiler;
- stabilirea unei corelații între evoluția clinico-anatomică și tulpinile de virus care au circulat în aceste ferme;
- caracterizarea genetică a tulpinilor de virus BIA izolate;
- monitorizarea evoluției anticorpilor maternali pentru a stabili momentul optim de vaccinare a puilor broiler;
- monitorizarea răspunsului imun post vaccinal indus de un vaccin viu atenuat.

Realizarea acestor obiective, în cadrul cercetărilor proprii, vor fi finalizate prin rezultate utile fermierilor, laboratoarelor de diagnostic și medicilor veterinari practicieni. Aceste rezultate vor fi diseminate prin lucrări științifice prezentate în comunități academice și publicate în diverse reviste de specialitate sau în volumele unor manifestări științifice.

Teza de doctorat este structurată în două părți, respectiv **Cercetările bibliografice** (20 pagini / 23,80%) incluse în partea I-a și **Cercetările proprii** (64 pagini / 76,20%) incluse în partea a II-a.

Teza de doctorat cuprinde 84 pagini, 6 tabele și 32 figuri. Suportul științific al tezei este reprezentat de 127 referințe bibliografice, care includ lucrări științifice, tratate, pagini web.

Partea I-a

CERCETĂRI BIBLIOGRAFICE

Prima parte a tezei, reprezintă un studiu bibliografic, fiind extinsă pe un număr de 20 pagini (23,80%). În această parte se regăsesc patru figuri reprezentative alături de date bibliografice de ultimă oră privind BIA.

Capitolul 1. Bursita infecțioasă aviară

Acest capitol reprezintă o sinteză a datelor din literatura de specialitate selectate riguros privind BIA.

Sunt prezentate datele definatorii ale BIA în conformitate cu prezentarea unei boli infecțioase respectiv definiția, istoricul, răspândirea geografică, importanța economică și sanitară, etiologia, caracterele epidemiologice, patogeneza, tabloul clinic, tabloul anatomopatologic, diagnosticul, profilaxia și combaterea.

Dintre acestea se detașează ca importanță:

- *etiologia*, virusul BIA fiind prezentat în conformitate cu sistematica ICTV 2021, de asemenea fiind descrise detaliat morfologia, structura antigenică și factorii de virulență;
- *patogeneza*, cuprinde date de ultima oră ale mecanismelor procesului infecțios, care se dezvoltă în organismul puilor, conducând la exprimarea anatomo-clinică a bolii;
- *diagnosticul de laborator*, include ultimile date privind testele efectuate pentru detecția și caracterizarea tulpinilor virusului BIA și pentru detecția anticorpilor specifici postinfecțioși și postvaccinali;
- *profilaxia specifică*, include o sinteză de ultimă oră a datelor legate privind utilizarea vaccinurilor în această boală.

PARTEA A II-A . CERCETĂRI PROPRII

Partea a II-a cuprinde cercetările proprii fiind structurată în patru capitole (2-5) extinse pe un număr de 64 pagini (76,20%). Această parte a tezei este ilustrată de șase tabele și de 28 figuri originale.

CAPITOLUL 2. SCOPUL, MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Creșterea intensivă a păsărilor reprezintă o ramură importantă a agriculturii și, implicit, a economiei deoarece asigură mai multe produse destinate alimentației oamenilor, dar și produse și subproduse destinate industriei. Având în vedere aceste aspecte, în decursul timpului, s-a produs o intensivizare permanentă a creșterii păsărilor, mai ales a găinilor și curcilor, urmărindu-se, ca principal obiectiv, creșterea potențialului productiv privind carnea și ouăle. De asemenea, s-a urmărit valorificarea maximă a principiilor nutritive din furaje pentru a scurta perioada de exploatare a păsărilor. Toate aceste deziderate au avut ca scop final rentabilizarea fermelor de creștere a păsărilor și dezvoltarea industriei de procesare a cărnii și a ouălor.

Tehnologiile moderne, creșterea numărului de păsări pe unitatea de suprafață și transporturile păsărilor pe diferite distanțe reprezintă factori de stres care acționează în permanență și care au drept consecință tot reducerea rezistenței păsărilor față de diferiți agenți patogeni transmisibili.

În fermele de creștere a păsărilor, în sistem intensiv, au apărut și au evoluat boli infecțioase endemice, denumite generic infecții de fermă, a căror etiologie este preponderent virală. Aceste boli s-au răspândit la nivel mondial, în principal, prin comerțul cu material avicol (ouă de reproducție, pui, tineret și adulte), dar și prin intermediul comerțului cu carne congelată sau cu ouă destinate consumului uman sau reproducției.

Bursita infecțioasă aviară a fost semnalată în 1962 sub denumirea de boală de Gumboro, iar în anul 1970 a primit denumirea actuală. În țara noastră boala a fost semnalată în 1967 de către ADAMEȘTEANU I., iar după anul 1990 a reizbucnit în fermele de creștere a puilor broiler cu o evoluție de la estul spre vestul țării, fiind consecința pătrunderii și în țara noastră a unor tulpini cu patogenitate crescută.

În cadrul serotipului 1, începând cu anul 1987, au fost identificate tulpini cu patogenitate crescută denumite tulpini *very virulente plus*, care sunt tulpini variant ale virusului BIA.

Apariția BIA, pe teritoriul țării noastre, sub forma focarelor cu evoluție gravă, a morbidității și mortalității, a contribuit la relansarea cercetărilor privind această boală în vederea elaborării unor măsuri de control care să conducă la diminuarea semnificativă a pierderilor economice. De asemenea, s-a avut în vedere și diminuarea efectului imunosupresiv al virusului BIA, care favorizează apariția unor boli infecțioase asociate, care, la rândul lor, generează pierderi semnificative.

Având în vedere toate acestea aspecte am considerat oportun efectuarea, în cadrul cercetărilor proprii, a unui amplu studiu epidemiologic, clinico-anatomic, de laborator și imunoprofilactic, privind BIA care a evoluat în ferme de pui broiler din vestul țării.

Scopul cercetărilor efectuate în cadrul tezei de doctorat au avut următoarele obiective:

- monitorizarea epidemiologică și clinico-anatomică a BIA în patru ferme de pui broiler;

- stabilirea unei corelații între evoluția clinico-anatomică și tulpinile de virus care au circulat în aceste ferme;
 - caracterizarea genetică a tulpinilor de virus BIA izolate;
 - monitorizarea evoluției anticorpilor maternali pentru a stabili momentul optim de vaccinare a puilor broiler;
 - monitorizarea răspunsului imun post vaccinal indus de un vaccin viu atenuat.
- Realizarea acestor obiective, în cadrul cercetărilor proprii, vor fi finalizate prin rezultate utile fermierilor, laboratoarelor de diagnostic și medicilor veterinari practicieni.

CAP. 3. OBSERVAȚII EPIDEMIOLOGICE, CLINICE ȘI ANATOMOPATOLOGICE ÎN BURSITA INFECȚIOASĂ AVIARĂ

În focarele monitorizate au fost efectuate examene epidemiologice, clinice și anatomopatologice pentru a surprinde, în integralitate, evoluția BIA cu scopul de a cuantifica mortalitatea cumulativă și pentru a înregistra simptomele și leziunile anatomopatologice macro și microscopice. Cercetările au fost efectuate în 4 ferme de pui broiler situate în 3 județe din vestul țării.

Examenul epidemiologic

BIA a fost suspiciată la vârsta de 19 zile, a puilor broiler din toate cele 4 ferme când s-a constatat o creștere a mortalității zilnice și un număr mare de pui bolnavi.

Pe durata evoluției focarelor de BIA, în efectivele de pui broiler monitorizate, existente în cele 4 ferme, **mortalitatea cumulativă** a fost cuprinsă între 6,03% și 11,21%. Valorile acestui indicator epidemiologic au fost diferite, mortalitatea fiind influențată de condițiile de creștere a puilor broiler din cele 4 ferme și în funcție de virulența tulpinilor circulante.

Examenul clinic

Simptomele semnalate în efectivele monitorizate s-au încadrat în tabloul clinic al BIA, respectiv în forma clinic manifestă sau evolutivă, care evoluează în mod frecvent la puii broiler. Numărul mare de pui existenți în hală nu a permis un triaj clinic zilnic pentru a stabili morbiditatea bolii în efectivele monitorizate. De asemenea, a fost prezentă și forma subclinică, simptomele acestei forme fiind greu sesizabile clinic.

Examenul anatomopatologic

Leziunile anatomopatologice macroscopice, caracteristice acestei boli au fost centralizate în funcție de categoria de vârstă, de caracteristicile inflamației bursei Fabricius, de leziunile musculaturii gambei și sternului și de leziunile renale, iar rezultatele finale au fost redată grafic pentru fiecare efectiv și categorie de vârstă.

Din bursele Fabricius, cu leziunile descrise anterior, au fost efectuate secțiuni după tehnica descrisă anterior, iar examinarea acestora la microscop, a pus în evidență leziuni histologice corelate cu leziunile macroscopice:

- în bursita catarală leziunile histologice au fost: edemul peretelui bursal, liza bursocitelor din foliculi, prezența macrofagelor și a reticulocitelor și început de fibroplazie;
- în bursita cataral-hemoragică și hemoragică leziunile histologice au fost: necroza foliculilor bursali urmată de absența completă a bursocitelor, chiști foliculari, celule reticulo-epiteliale, infiltrație macrofagică perifoliculară și infiltrații sero-hemoragice perifoliculare.

În focarele de BIA monitorizate, tabloul anatomopatologic s-a încadrat în **forma agresivă** a acestei boli, produs de tulpinile *very virulente plus*, acest aspect fiind confirmat de testul de biologie moleculară.

Concluzii

Examenle epidemiologice efectuate în cele patru ferme sub forma acchetelor de tip longitudinal au evidențiat deficiențe epidemiologice care au permis pătrunderea și circulația tulpinilor *very virulente plus* ale virusului BIA, care au fost responsabile de producerea și evoluția focarelor de boală în aceste ferme.

Mortalitatea cumulativă calculată pentru fiecare efectiv monitorizat a fost cuprinsă între 6,03% și 11,21% încadrându-se în limitele semnalate și de alți autori în focare de BIA.

Examenul clinic a dovedit că BIA a apărut în cele patru efective de la vârsta de 19 zile, morbiditatea crescând progresiv până la vârsta de 21 de zile a puilor, iar simptomele constatate au fost caracteristice formei acute.

După vârsta de 26 de zile, în cele patru efective au evoluat ca infecții asociate micoplasmoza și colisepticemia, datorită imunosupresiei indusă de tulpinile *very virulente plus*.

La cadavrele necropsiate au fost prezente leziuni macroscopice, caracteristice BIA, care constituie triada anatomopatologică a acestei boli, prezentă în forma acută (agresivă) produsă de tulpinile *very virulente plus*.

Leziunile bursei Fabricius au fost reprezentate de **bursita catarală** care a avut o frecvență în cele patru efective cuprinsă între 12,5% și 56,25% și de **bursita hemoragică** care a avut o frecvență în cele patru efective cuprinsă între 5,12% și 24% .

Leziunile anatomopatologice microscopice au fost reprezentate de modificări ale țesutului bursal caracteristice celor două tipuri de inflamații ale bursei Fabricius.

CAPITOLUL 4. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN BURSITA INFECȚIOASĂ AVIARĂ

Având în vedere prevalența crescută a bolii, precum și prezența altor viroze endemice la puii broiler, se impune efectuarea diagnosticului de laborator utilizând fie RT-PCR, în mai multe variante, pentru detecția genomului viral în țesutul bursal, fie pentru detecția anticorpilor cu ajutorul tehnicii ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Metoda rPCR cu SybrGreen a detectat virusul BIA în probele reprezentate de burse Fabricius cu leziuni, mai precis a detectat gena *vp2-vv* și gena *vp2-att*, aceste gene fiind situate în regiunea hipervariabilă a acidului nucleic. Tulpinile virale detectate, pe baza acestor două gene, au fost încadrate în două grupe, respectiv tulpini foarte virulente (*very virulente plus*) care conțin gena *vp2-vv* și tulpini atenuate (vaccinale) care conțin gena *vp2-att*. La tulpinile foarte virulente ampliconii obținuți au avut mărimea de 141 bp, iar la tulpinile atenuate ampliconii obținuți au avut mărimea de 106 bp.

Prin tehnica RAPD, în probele de organe prelevate, de la cadavrele de pui broiler, au fost detectate patru tulpini *very virulente plus* și patru tulpini atenuate (vaccinale). Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele furnizate de tehnica rPCR, dovedind astfel că în efectivele de pui broiler monitorizate au circulat tulpini *very virulente plus* care produc focare de BIA și tulpini atenuate (vaccinale) cu care puii broiler din aceste efective au fost vaccinate.

Rezultatele furnizate de tehnica imunoenzimatică

Rezultatele examenului serologic efectuat prin testul imunoenzimatic au evidențiat anticorpi specifici față de virusul BIA, care a produs focare de boală în ferma A și în ferma B. Aceste rezultate evidențiază faptul că în cele două efective de pui broiler, monitorizate serologic, VBIA respectiv tulpinile *very virulente plus* au rupt imunitatea postvaccinală a puilor și au produs boala.

Concluzii

- Testul rPCR a detectat virusul BIA în probe de burse Fabricius prelevate de la cadavre de pui broiler cu leziuni de bursită infecțioasă aviară.
- Testul rPCR a detectat gena *vp2-vv* prezentă la tulpinile de virus BIA *very virulente plus*.
- Testul rPCR a detectat și gena *vp2-att* prezentă la tulpinile atenuate, respectiv la tulpina vaccinală utilizată pentru vaccinarea *in ovo* în stația de incubație.

- Pentru detecția virusului BIA a fost utilizată și tehnica RAPD cu ajutorul căreia au fost detectate atât tulpini very virulente plus, cât și tulpini atenuate (vaccinale).
- Rezultatele furnizate de tehnica RAPD demonstrează că această tehnică de biologie moleculară, mai simplă și mai ușor de efectuat poate fi utilizată în diagnosticul BIA.
- Examenul serologic efectuat cu ajutorul tehnicii imunoenzimatică a evidențiat o seroprevalență, în dinamică, privind BIA, în efectivele de pui broiler monitorizate.
- În efectivele de pui broiler monitorizate testul imunoenzimatic a evidențiat un răspuns imun post infecțios ilustrat de titrurile anticorpilor antibursitici cuantificate cu ajutorul M.G., a căror valori au crescut progresiv începând de la vârsta de 17 zile în **ferma A** și de la vârsta de 29 de zile în **ferma B**.
- Valorile M.G. ale titrurilor anticorpilor antibursitici au fost mai mari, în ambele efective de pui broiler decât limitele anticorpilor antibursitici post vaccinali stabilite de firma IDEXX, aceste rezultate dovedind existența unui răspuns imun post infecțios.
- Aceste rezultate evidențiază faptul că vaccinul anti BIA și schema de vaccinare utilizată nu au fost adecvate pentru inducerea unui răspuns imun post vaccinal care să protejeze puii față de BIA.

CAPITOLUL 5. CERCETĂRI IMUNOPROFILACTICE ÎN BIA LA PUII BROILERI

Scopul cercetărilor efectuate, în cadrul acestui capitol, a fost de a testa capacitatea imunoprofilactică, la puii broiler, a unui vaccin viu atenuat obținut dintr-o tulpină intermediară.

Rezultatele obținute completează datele existente în literatura de specialitate, privind BIA, în special, imunoprofilaxia acestei boli și, în același timp, demonstrează că tulpina intermediară E-Ro₁ a indus un răspuns imun post vaccinal protectiv, dovedit de valorile mari ale titrurilor stabilite prin testul imunoenzimatic. De asemenea, această tulpină intermediară chiar dacă are o remanență, în corpul puilor, nu are efect imunosupresiv, aspect dovedit de absența unor boli intercurrente după vaccinare.

Tehnica imunoenzimatică utilizată a permis monitorizarea răspunsului imun postvaccinal și a evidențiat creșterea în dinamică a titrurilor anticorpilor induși de vaccinul utilizat, dovedind că poate fi utilizată în acest scop după cum a recomandat JACWOOD D.J. și col. în anul 1999 pe baza cercetărilor efectuate.

Rezultatele obținute privind dinamica răspunsului imun postvaccinal au fost redată grafic și dovedesc capacitatea imunogenă a tulpinii intermediare E-Ro₁.

Concluzii

- Vaccinul utilizat administrat pe cale orală în conformitate cu recomandările firmei producătoare a fost bine tolerat, iar după administrare nu au fost semnalate reacții postvaccinale.
- Tulpina intermediară E-Ro₁ nu a avut efect imunosupresiv, care să favorizeze apariția unor boli infecțioase virale sau bacteriene.
- Monitorizarea imunității viteline, la vârsta de o zi și la vârsta de 11 zile, a permis stabilirea momentului optim privind vaccinarea anti BIA a puilor cu vaccinul utilizat.
- Administrarea vaccinului pe cale orală, în apa de băut, cu lapte degresat ca stabilizator, după o scurtă perioadă de privare a apei, evită stresul generat de diverse manopere și asigură consumul total de apă.
- Titrurile anticorpilor vitelini au scăzut progresiv, aspect dovedit de rezultatele furnizate de testul imunoenzimatic, ceea ce a permis stabilirea momentului optim pentru vaccinare.
- Tulpina intermediară E-Ro₁ nu a interferat cu anticorpii vitelini și a indus un răspuns imun postvaccinal protectiv, dovedit de valorile mari ale titrurilor și de uniformitatea acestora.
- Rezultatele obținute recomandă acest vaccin în imunoprofilaxia BIA, la puii broiler, cu respectarea recomandărilor firmei producătoare și, implicit, cu monitorizarea evoluției anticorpilor vitelini.

CAPITOLUL 6. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

- Anchetele epidemiologice, de tip longitudinal, efectuate în cele patru ferme au semnalat unele deficiențe epidemiologice care au permis pătrunderea și circulația tulpinilor *very virulente plus* ale virusului BIA.
- Mortalitatea cumulativă calculată în efectivele monitorizate a fost cuprinsă între 6,03% și 11,21% încadrându-se în limitele acceptate în această boală.
- Bursita infecțioasă aviară a apărut începând cu vârsta de 19 zile, iar morbiditatea a crescut progresiv până la vârsta de 21 de zile.
- În efectivele monitorizate, BIA a evoluat cu simptome caracteristice formei acute.
- Imunosupresia indusă de tulpinile *very virulente plus* a favorizat apariția și evoluția unor boli infecțioase bacteriene asociate, după vârsta de 26 de zile.
- La cadavrele necropsiate au fost prezente leziuni anatomopatologice macroscopice, reprezentate de triada anatomopatologică caracteristică formei acute.
- Leziunile bursei Fabricius au fost reprezentate de **bursita catarală** care a avut o frecvență cuprinsă între 12,5% și 56,25% și de **bursita hemoragică** care a avut o frecvență cuprinsă între 5,12% și 24% .
- Modificări histologice ale țesutului bursal au fost caracteristice celor două tipuri de inflamații ale bursei Fabricius.
- Testul rPCR a detectat virusul BIA în probe de burse Fabricius prelevate de la cadavre și a permis detecția genei *vp2-vv* prezentă la tulpinile de virus BIA *very virulente plus* și a genei *vp2-att* prezentă la tulpinile atenuate vaccinale.
 - Aceste aspecte recomandă utilizarea tehnicii rPCR, ca metodă de rutină, în diagnosticul BIA și pentru caracterizarea tulpinilor de virus circulante.
 - Tehnica RAPD poate fi utilizată pentru detecția tulpinilor *very virulente plus* și tulpinilor atenuate (vaccinale) fiind mai simplă și mai ieftină.
 - Tehnica imunoenzimatică a evidențiat o seroprevalență, în dinamică, privind BIA, în efectivele de pui broiler monitorizate.
 - Răspunsul imun post infecțios, reprezentat de titrurile anticorpilor antibursitici, a crescut progresiv începând de la vârsta de 17 zile în **ferma A** și de la vârsta de 29 de zile în **ferma B**.
 - Vaccinul utilizat administrat pe cale orală în conformitate cu recomandările firmei producătoare a fost bine tolerat, iar după administrare nu au fost semnalate reacții postvaccinale.
 - Vaccinul utilizat a fost bine tolerat , nu a dat reacții postvaccinale, iar tulpina intermediară E-Ro₁ nu a avut efect imunosupresiv.
 - Monitorizarea imunității viteline, permite stabilirea momentului optim privind vaccinarea anti BIA cu acest vaccin.
 - Administrarea vaccinului în condițiile recomandate de firma producătoare a evitat stresul generat de diverse manopere specifice altor căi de vaccinare .
 - Tulpina intermediară E-Ro₁ nu a interferat cu anticorpii vitelini și a indus un răspuns imun postvaccinal protectiv, dovedit de valorile mari ale titrurilor și de uniformitatea acestora.

Rezultatele obținute recomandă acest vaccin în imunoprofilaxia BIA, la puii broiler, cu respectarea recomandărilor firmei producătoare și, implicit, cu monitorizarea evoluției anticorpilor vitelini.

SUMMARY

PHD THESIS

EPIDEMIOLOGICAL, ANATOMOCLINICAL, LABORATORY AND IMMUNOPROPHYLACTIC RESEARCH IN AVIAN INFECTIOUS BURSTITIS

Poultry is an important branch of agriculture and implicitly of the economy because it provides both food products and products and by-products used in industry. The mentioned objectives contributed to the intensification and profitability of poultry farms, regardless of production category and age. Attention was constantly paid to the obtaining of hybrids with high productive potential, and the profitability of poultry farms was followed.

As a result of the trade in poultry material, frozen poultry meat and eggs, several infectious, viral or bacterial diseases have spread worldwide, which can currently evolve as endemic farm diseases. For the most part, these diseases are conditioned by the presence of intrinsic and extrinsic favorable factors. These factors decrease the resistance of the birds' body, reduce specific feed consumption, or some of them, such as some viruses or some attenuated vaccines, can induce immunosuppressive conditions.

After 1920, on the North American continent, where the intensification of poultry farming first began, several infectious diseases with viral etiology appeared, the most important of which was the avian infectious bursitis, reported for the first time in 1962. These diseases were reported over time and in poultry farms in Romania, so that in 1968 ADAMEȘTENU I. reports for the first time avian infectious bursitis.

Considering these wishes, we considered it appropriate to approach this research topic with the aim of investigating the epidemiological and anatomoclinical peculiarities of some outbreaks of BIA, to use some very up-to-date diagnostic techniques and to contribute to the completion of data on the immunoprophylaxis of this disease.

The research carried out as part of the doctoral thesis had the following objectives:

- epidemiological and clinical-anatomical monitoring of BIA in four broiler chicken farms;
- establishing a correlation between the clinical-anatomical evolution and the virus strains that circulated in these farms;
- genetic characterization of the isolated BIA virus strains;
- monitoring the evolution of maternal antibodies in order to establish the optimal moment of vaccination of broiler chicks;
- monitoring the post-vaccination immune response induced by a live attenuated vaccine.

The achievement of these objectives, within the framework of own research, will be completed by results useful to farmers, diagnostic laboratories and practicing veterinarians. These results will be disseminated through scientific papers presented in academic communities and published in various specialized magazines or in the volumes of scientific events.

The doctoral thesis is structured in two parts, namely the bibliographic research included in part I and the own research included in part II.

The doctoral thesis includes 98 pages, 6 tables and 32 figures, which include ...original images and six graphics. The scientific support of the thesis is represented by 127 bibliographic references, which include scientific works, treatises, web pages.

Part I

BIBLIOGRAPHICAL RESEARCH

The first part of the thesis represents a bibliographic study, extending over a number of 20 pages (23,80%). In this part you will find four representative figures alongside up-to-date bibliographic data on the BIA.

CHAPTER 1. AVIAN INFECTIOUS BURSTITIS

This chapter represents a synthesis of rigorously selected literature data on BIA.

The defining data of BIA are presented according to the presentation of an infectious disease, namely the definition, history, geographical spread, economic and sanitary importance, etiology,

epidemiological characteristics, pathogenesis, clinical picture, anatomopathological picture, diagnosis, prophylaxis and combat.

Of these, the following stands out in terms of importance:

- the etiology, the BIA virus being presented in accordance with the ICTV 2021 systematics, also the morphology, antigenic structure and virulence factors being described in detail;
- pathogenesis, includes up-to-date data on the mechanisms of the infectious process, which develops in the body of the child, leading to the anatomic-clinical expression of the disease;
- laboratory diagnosis, includes the latest data on tests performed for the detection and characterization of BIA virus strains and for the detection of specific post-infectious and post-vaccination antibodies;
- specific prophylaxis, includes an up-to-date synthesis of data related to the use of vaccines in this disease.

PART II. OWN RESEARCH

Part II includes the own research, being structured in four chapters (2-5) spread over a number of 64 pages (76,20%). This part of the thesis is illustrated by 6 tables and 32 original figures.

CHAPTER 2. PURPOSE, MOTIVATION AND RESEARCH OBJECTIVES

Intensive breeding of birds represents an important branch of agriculture and, implicitly, of the economy because it provides several products intended for human consumption, but also products and by-products intended for industry. Considering these aspects, over time, there has been a permanent intensification of poultry breeding, especially chickens and turkeys, with the main objective of increasing the production potential for meat and eggs. Also, the maximum utilization of the nutritional principles in the feed was pursued in order to shorten the period of exploitation of the birds. All these wishes had as their final goal the profitability of poultry farms and the development of the meat and egg processing industry.

Modern technologies, the increase in the number of birds per surface unit and the transport of birds over different distances represent stress factors that act permanently and which have the consequence of reducing the resistance of birds to different transmissible pathogens.

In poultry farms, in an intensive system, endemic infectious diseases, generically called farm infections, whose etiology is predominantly viral, appeared and evolved. These diseases have spread worldwide, mainly through the trade in poultry material (breeding eggs, chicks, juveniles and adults), but also through the trade in frozen meat or eggs intended for human consumption or reproduction.

Infectious avian bursitis was reported in 1962 under the name of Gumboro disease, and in 1970 it received its current name. In our country, the disease was reported in 1967 by ADAMEȘTEANU I., and after 1990, it broke out again in broiler farms with an evolution from the east to the west of the country, being the consequence of the penetration of pathogenic strains into our country as well raised.

Within serotype 1, since 1987, strains with increased pathogenicity have been identified called very virulent plus strains, which are variant strains of the BIA virus.

The emergence of BIA, in the territory of our country, in the form of outbreaks with serious evolution, morbidity and mortality, contributed to the relaunch of research on this disease in order to develop control measures that lead to the significant reduction of economic losses. It was also considered to reduce the immunosuppressive effect of the BIA virus, which favors the occurrence of associated infectious diseases, which, in turn, generate significant losses.

Considering all these aspects, we considered it appropriate to carry out, within our own research, an extensive epidemiological, clinical-anatomical, laboratory and immunoprophylactic study on BIA that evolved in broiler chicken farms in the west of the country.

The purpose of the research carried out within the doctoral thesis had the following objectives:

- epidemiological and clinical-anatomical monitoring of BIA in four broiler chicken farms;
- establishing a correlation between the clinical-anatomical evolution and the virus strains that circulated in these farms;
- genetic characterization of the isolated BIA virus strains;
- monitoring the evolution of maternal antibodies in order to establish the optimal moment of vaccination of broiler chicks;
- monitoring the post-vaccination immune response induced by a live attenuated vaccine.

The achievement of these objectives, within the framework of own research, will be completed by results useful to farmers, diagnostic laboratories and practicing veterinarians.

CHAPTER. 3. EPIDEMIOLOGICAL, CLINICAL AND ANATOMOPATHOLOGICAL OBSERVATIONS IN Avian INFECTIOUS BURSTITIS

Epidemiological, clinical and anatomopathological examinations were carried out in the monitored outbreaks to capture, in its entirety, the evolution of BIA in order to quantify the cumulative mortality and to record the macro and microscopic anatomopathological symptoms and lesions. The research was carried out in 4 broiler chicken farms located in 3 counties in the west of the country.

Epidemiological examination

BIA was suspected at the age of 19 days, in broiler chickens from all 4 farms when an increase in daily mortality and a large number of sick chickens were observed.

During the evolution of BIA outbreaks, in the monitored broiler flocks existing in the 4 farms, the cumulative mortality was between 6.03% and 11.21%. The values of this epidemiological indicator shown on graph no. 1 were different, the mortality being influenced by the growing conditions of the broiler chicks in the 4 farms and depending on the virulence of the circulating strains.

Clinical examination

The symptoms reported in the monitored herds were included in the clinical picture of BIA, respectively in the clinically manifest or evolutionary form, which frequently evolves in broiler chickens. The large number of chickens in the house did not allow a daily clinical triage to determine the morbidity of the disease in the monitored herds. The subclinical form was also present, the symptoms of this form being difficult to detect clinically.

Anatomopathological examination

The macroscopic anatomopathological lesions, characteristic of this disease, were centralized according to the age category, the characteristics of the inflammation of the bursa of Fabricius, the lesions of the calf and sternum muscles and the kidney lesions, and the final results were displayed graphically for each herd and age category. Based on these results, injuries were graphically displayed for each farm and age category.

From the bursa of Fabricius, with the previously described lesions, sections were performed according to the previously described technique, and their microscopic examination revealed histological lesions correlated with the macroscopic lesions: - in catarrhal bursitis the histological lesions were: edema of the bursal wall, lysis of bursocytes from the follicles, the presence of macrophages and reticulocytes and the beginning of fibroplasia; - in catarrhal-hemorrhagic and hemorrhagic bursitis the histological lesions were: necrosis of the bursal follicles followed by the complete absence of bursocytes, follicular cysts, reticulo-epithelial cells, perifollicular macrophage infiltration and perifollicular sero-hemorrhagic infiltrations. In the monitored BIA outbreaks, the anatomopathological picture was in the aggressive form of this disease, produced by the very virulent plus strains, this aspect being confirmed by the molecular biology test.

Conclusions

- The epidemiological examinations carried out in the four farms in the form of longitudinal surveys highlighted epidemiological deficiencies that allowed the penetration and circulation of the very virulent plus strains of the BIA virus, which were responsible for the production and evolution of disease outbreaks in these farms.
- The cumulative mortality calculated for each monitored flock was between 6.03% and 11.21%, falling within the limits reported by other authors in outbreaks of BIA.
- The clinical examination proved that BIA appeared in the four herds from the age of 19 days, the morbidity increasing progressively until the age of 21 days of the chickens, and the symptoms observed were characteristic of the acute form.

- After the age of 26 days, mycoplasmosis and colisepticemia developed as associated infections in the four flocks, due to the immunosuppression induced by the very virulent plus strains.
- In the necropsied corpses, macroscopic lesions were present, characteristic of BIA, which constitute the anatomopathological triad of this disease, present in the acute (aggressive) form produced by the very virulent plus strains.
- The lesions of the Fabricius bursa were represented by catarrhal bursitis, which had a frequency in the four groups between 12.5% and 56.25%, and by hemorrhagic bursitis, which had a frequency in the four groups between 5.12% and 24 %.
- The microscopic anatomopathological lesions were represented by bursal tissue changes characteristic of the two types of inflammation of the bursa of Fabricius.

CHAPTER 4. LABORATORY DIAGNOSIS IN AVIAN INFECTIOUS BURSTITIS

Considering the increased prevalence of the disease, as well as the presence of other endemic viruses in broiler chickens, it is necessary to carry out the laboratory diagnosis using either RT-PCR, in several variants, for the detection of the viral genome in the bursal tissue, or for the detection of antibodies using the technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

The rPCR method with SybrGreen detected the BIA virus in the samples represented by Fabricius bursae with lesions, more precisely it detected the *vp2-vv* gene and the *vp2-att* gene, these genes being located in the hypervariable region of the nucleic acid. The detected viral strains, based on these two genes, were classified into two groups, namely very virulent strains (*very virulent plus*) containing the *vp2-vv* gene and attenuated (vaccinal) strains containing the *vp2-att* gene. In the highly virulent strains the amplicons obtained were 141 bp in size, and in the attenuated strains the amplicons obtained were 106 bp in size.

Through the RAPD technique, four very virulent plus and four attenuated (vaccinal) strains were detected in the organ samples taken from broiler chicken carcasses. These results are consistent with the results provided by the rPCR technique, thus proving that very virulent plus strains that produce BIA outbreaks and attenuated (vaccinal) strains with which the broiler chickens in these flocks were vaccinated circulated in the monitored broiler flocks.

The results provided by the immunoenzymatic technique

The results of the serological examination carried out by the immunoenzymatic test showed specific antibodies against the BIA virus, which produced disease outbreaks in farm A and in farm B. These results highlight the fact that in the two herds of broiler chickens, monitored serologically, VBIA and the strains very virulent plus broke the post-vaccination immunity of the chickens and produced the disease.

Conclusions

- The rPCR assay detected BIA virus in bursae of Fabricius samples taken from broiler chicken carcasses with avian infectious bursitis lesions.
- The rPCR test detected the *vp2-vv* gene present in very virulent plus BIA virus strains.
- The rPCR test also detected the *vp2-att* gene present in the attenuated strains, respectively in the vaccine strain used for in ovo vaccination in the incubation station.
- For the detection of the BIA virus, the RAPD technique was also used, with the help of which both very virulent plus strains and attenuated (vaccinal) strains were detected.
- The results provided by the RAPD technique demonstrate that this molecular biology technique, simpler and easier to perform, can be used in the diagnosis of BIA.
- The serological examination carried out with the help of the immunoenzymatic technique revealed a dynamic seroprevalence regarding BIA in the monitored broiler chicken flocks.

- In the monitored broiler flocks, the immunoenzymatic test revealed a post-infectious immune response illustrated by the titers of anti-bursitis antibodies quantified with the help of M.G., whose values increased progressively starting from the age of 17 days in farm A and from the age of 29 days in farm B.
- M.G. values of anti-bursitis antibody titers were higher, in both flocks of broiler chickens, than the post-vaccination anti-bursitis antibody limits established by the IDEXX company, these results proving the existence of a post-infectious immune response.
- These results highlight the fact that the BIA vaccine and the vaccination schedule used were not adequate to induce a post-vaccination immune response to protect chickens against BIA.

CHAPTER 5. IMMUNOPROPHYLACTIC RESEARCH IN BIA IN BROILER CHICKS

The purpose of the research carried out in this chapter was to test the immunoprophylactic capacity, in broiler chickens, of a live attenuated vaccine obtained from an intermediate strain.

The obtained results complement the existing data in the specialized literature, regarding BIA, in particular, the immunoprophylaxis of this disease and, at the same time, demonstrate that the intermediate strain E-Ro1 induced a protective post-vaccination immune response, proven by the high values of the titers established by the test immunoenzymatic. Also, this intermediate strain, even if it has a remanence, in the body of the chickens, does not have an immunosuppressive effect, an aspect proven by the absence of intercurrent diseases after vaccination.

The immunoenzymatic technique used allowed the monitoring of the post-vaccination immune response and highlighted the increase in the dynamics of antibody titers induced by the vaccine used, proving that it can be used for this purpose as recommended by JACWOOD D.J. and col. in 1999 based on the research carried out.

The results obtained regarding the dynamics of the post-vaccination immune response were shown graphically and proved the immunogenic capacity of the intermediate strain E-Ro1.

Conclusions

- The vaccine used, administered orally in accordance with the manufacturer's recommendations, was well tolerated, and no post-vaccination reactions were reported after administration.
- The intermediate strain E-Ro1 had no immunosuppressive effect, favoring the occurrence of viral or bacterial infectious diseases.
- Monitoring of yolk immunity, at the age of one day and at the age of 11 days, allowed the establishment of the optimal moment regarding the anti-BIA vaccination of chickens with the vaccine used.
- Administering the vaccine orally, in drinking water, with skimmed milk as a stabilizer, after a short period of water deprivation, avoids the stress generated by various operations and ensures total water consumption.
- Vitelline antibody titers decreased progressively, an aspect proven by the results provided by the immunoenzymatic test, which allowed establishing the optimal moment for vaccination.
- The intermediate strain E-Ro1 did not interfere with vitelline antibodies and induced a protective post-vaccination immune response, evidenced by high titer values and their uniformity.
- The results obtained recommend this vaccine in the immunoprophylaxis of BIA, in broiler chickens, with compliance with the recommendations of the producing company and, implicitly, with the monitoring of the evolution of yolk antibodies.

CHAPTER 6. GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

- Longitudinal epidemiologic investigations carried out in the four farms indicated some epidemiologic deficiencies that allowed the penetration and circulation of *very virulent plus* strains of the BIA virus.
- The cumulative mortality calculated in the monitored herds was between 6.03% and 11.21%, falling within the limits accepted in this disease.
- Avian infectious bursitis appeared starting at 19 days of age, and morbidity increased progressively until 21 days of age.
- In the monitored herds, BIA evolved with symptoms characteristic of the acute form.
- The immunosuppression induced by the very virulent plus strains favored the appearance and evolution of associated bacterial infectious diseases, after the age of 26 days.
- Macroscopic anatomopathological lesions were present in the necropsied corpses, represented by the anatomopathological triad characteristic of the acute form.
- Fabricius bursa lesions were represented by catarrhal bursitis which had a frequency between 12.5% and 56.25% and hemorrhagic bursitis which had a frequency between 5.12% and 24%.
- Histological changes of the bursa tissue were characteristic of the two types of inflammation of the bursa of Fabricius.
- The rPCR test detected the BIA virus in Fabricius bursa samples taken from cadavers and allowed the detection of the *vp2-vv* gene present in very virulent plus BIA virus strains and the *vp2-att* gene present in vaccine attenuated strains.
- These aspects recommend the use of the rPCR technique, as a routine method, in the diagnosis of BIA and for the characterization of circulating virus strains.
- The RAPD technique can be used for the detection of *very virulent plus* strains and attenuated (vaccinal) strains, being simpler and cheaper.
- The immunoenzymatic technique revealed a dynamic seroprevalence regarding BIA in the monitored broiler flocks.
- The post-infectious immune response, represented by anti-bursitis antibody titers, increased progressively starting from the age of 17 days in farm A and from the age of 29 days in farm B.
- The vaccine used, administered orally in accordance with the manufacturer's recommendations, was well tolerated, and no post-vaccination reactions were reported after administration.
- The vaccine used was well tolerated, it did not cause post-vaccination reactions, and the intermediate strain E-Ro₁ had no immunosuppressive effect.
- Monitoring of vitelline immunity, allows establishing the optimal moment regarding anti-BIA vaccination with this vaccine.
- Administering the vaccine under the conditions recommended by the manufacturing company avoided the stress generated by various procedures specific to other vaccination routes.
- The intermediate strain E-Ro₁ did not interfere with vitelline antibodies and induced a protective postvaccination immune response, proven by high titer values and their uniformity.
- The obtained results recommend this vaccine in the immunoprophylaxis of BIA, in broiler chickens, with compliance with the recommendations of the producing company and, implicitly, with the monitoring of the evolution of yolk antibodies.