

Universitatea de Științele Vieții “Regele Mihai I” din Timișoara



Școala Doctorală Medicină Veterinară Timișoara

BĂLGRĂDEAN F. FLAVIA

TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ȘI
IMUNOLOGICE ÎN LEUCOZA
ENZOOTICĂ BOVINĂ**

**Conducător științific
Prof. Univ. Dr. TÎRZIU EMIL**

**Timișoara
2025**

University of Life Sciences “King Mihai I” from Timișoara



Doctoral School Veterinary Medicine Timișoara

BĂLGRĂDEAN F. FLAVIA

DOCTORAL THESIS

**EPIDEMIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL
RESEARCH IN ENZOOTIC BOVINE LEUCOSIS**

Scientific advisor

Univ. Prof. Dr. TÎRZIU EMIL

Timișoara

2025

Rezumatul tezei de doctorat

Cercetări epidemiologice și imunologice în leucoza enzootică bovină

Prezenta teză conține:

Listă de abrevieri

Rezumatele în limba Română și Engleză

Introducere

Stadiul actual al cunoașterii: 39 pagini

Cercetările proprii: 89 pagini

Tabele: 45

Figuri: 59

Surse bibliografice: 280

Anexe: 2

Introducere

Leucoza enzootică bovină (LEB) este o boală infecțioasă cronică a bovinelor, cauzată de virusul leucozei bovine (VLB), care determină o infecție persistentă, localizată în special la nivelul limfocitelor B. Infecția se menține pe tot parcursul vieții animalului, iar evoluția bolii este adesea asimptomatică în stadiile incipiente, ceea ce face diagnosticarea precoce esențială. Impactul economic al leucozei enzootice bovine este semnificativ, afectând producția de lapte și carne și generând costuri mari pentru testarea periodică, izolarea și carantinarea animalelor infectate. În plus, sacrificarea animalelor pozitive din punct de vedere al infecției cu VLB contribuie la pierderi economice suplimentare. De asemenea, această boală poate avea implicații asupra sănătății publice și bunăstării animalelor, motiv pentru care controlul și prevenirea sa sunt esențiale. În prezent, nu există un vaccin disponibil pentru leucoza enzootică bovină, iar tratamentele specifice pentru infecția cu VLB sunt ineficiente, ceea ce face ca măsurile de prevenție să fie vitale. Acestea includ implementarea unor programe stricte de monitorizare a efectivelor de bovine, izolare a animalelor pozitive și eradicarea infecției prin sacrificarea animalelor infectate.

Diagnosticul precoce al infecției este posibil doar prin utilizarea testelor de laborator, cum ar fi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), care detectează prezența anticorpilor specifici sau PCR (Polymerase Chain Reaction), care identifică materialul genetic al virusului. Aceste teste sunt esențiale pentru confirmarea infecției și pentru stabilirea unui plan de control eficient al bolii. Din punct de vedere legislativ, Uniunea Europeană impune reglementări stricte pentru monitorizarea și controlul leucozei enzootice bovine.

În România, Programul Național de Control al Leucozei Enzootice Bovine include măsuri obligatorii de testare periodică a bovinelor, monitorizarea și identificarea rapidă a animalelor infectate, precum și eliminarea acestora din efectivele de animale pentru a preveni răspândirea bolii. Aceste reglementări sunt esențiale pentru limitarea impactului economic și pentru protecția sănătății publice.

I. Stadiul actual al cunoașterii

Această parte a tezei se extinde pe 39 de pagini (30% din teză) și este structurată în șase capitole, după cum urmează:

Capitolul 1. Date actuale privind etiologia, răspândirea și importanța economică a leucozei enzootice bovine

Din punct de vedere taxonomic, virusul leucozei bovine face parte din genul *Deltaretrovirus*, familia *Retroviridae* și ordinul *Ortevirales*. Virusul provoacă o infecție persistentă, cu evoluție asimptomatică în majoritatea cazurilor, dar care poate duce, în etapele avansate, la dezvoltarea unor tumori limfoide sau alte manifestări clinice severe. VLB are un mecanism de infecție lent, iar animalele infectate devin purtătoare ale virusului pe toată durata vieții, fără a prezenta simptome clinice până în stadiile finale ale bolii. Leucoza este o boală cu o distribuție geografică largă, afectând toate continentele și având un impact semnificativ asupra producției de lapte și carne. Prevalența bolii variază considerabil în funcție de regiune și de măsurile de control adoptate. În Europa și America de Nord, prevalența leucozei enzootice bovine este de obicei între 1 și 5%, în timp ce în America de Sud și Africa, prevalența poate ajunge până la 20%. În România, leucoza enzootică bovină a fost semnalată pentru prima dată în anul 1954. Totuși, numărul cazurilor a cunoscut o creștere alarmantă între anii 2001 și 2003, ceea ce a atras atenția autorităților sanitare-veterinare și a provocat implementarea unor măsuri de control mai stricte.

Leucoza enzootică bovină generează pierderi economice semnificative pentru sectorul de creștere a bovinelor. Aceste pierderi se datorează mai multor factori, inclusiv scăderea producției de lapte, reducerea productivității animalelor infectate, sacrificarea prematură a acestora și costurile suplimentare asociate cu testarea, carantinarea și controlul bolii. Uniunea Europeană și alte organizații internaționale de sănătate animală au impus reglementări stricte pentru controlul leucozei enzootice bovine, care includ programe naționale de testare și măsuri de prevenire a răspândirii bolii. De asemenea, monitorizarea continuă a focarelor și implementarea unor măsuri de carantină sunt esențiale pentru limitarea răspândirii infecției.

În concluzie, leucoza enzootică bovină reprezintă o problemă majoră de sănătate animală și de economie agricolă, iar măsurile eficiente de prevenire și control sunt necesare pentru a minimiza impactul acestei boli asupra producției de bovine și asupra economiilor naționale.

Capitolul 2. Epidemiologia și patogeniza infecției produse de virusul leucozei enzootice bovine

În mod natural, speciile receptive la infecția cu virusul leucozei enzootice bovine (VLB) sunt bovinele și bubalinele, indiferent de vârstă. Cu toate acestea, incidența bolii este mai crescută la bovinele aflate în perioada de vârf a producției, în special în grupa de vârstă 5–7 ani.

Virusul are o răspândire lentă în cadrul efectivului, cu o perioadă de incubație lungă, de 4–5 ani, ceea ce face ca detectarea și controlul infecției să fie dificile. Sursele principale de infecție sunt reprezentate de animalele bolnave, care pot transmite virusul atât orizontal (de la animal la animal), cât și vertical (de la mamă la făt). Transmiterea orizontală este cea mai frecventă și are loc prin contact direct sau indirect, prin intermediul obiectelor contaminate (ace, echipamente medicale) ori procedurilor chirurgicale sau obstetricale efectuate fără respectarea normelor de igienă veterinară.

Capitolul 3. Simptomatologia și modificările anatomo-patologice în leucoza enzootică bovină

Evoluția infecției cu VLB la bovine este multistadială și poate fi împărțită în trei etape: Stadiul de infecție subclinică, apare la aproximativ 70% dintre animalele infectate, care sunt pozitive la testele serologice, dar nu prezintă semne clinice vizibile; în această fază, animalele reprezintă principala sursă de infecție în efectiv; Stadiul de limfocitoză persistentă, se manifestă la aproximativ 30% dintre bovinele infectate și se caracterizează printr-o creștere persistentă a numărului de limfocite în sângele periferic, fără alte semne clinice evidente, dar cu risc crescut de progresie spre forma tumorală; Stadiul tumoral (limfosarcom), este cel mai grav și afectează între 5% și 10% dintre animalele infectate; în această fază, se dezvoltă tumori maligne la nivelul țesutului limfoid și în diverse organe (inimă, stomac, ficat, rinichi, splină etc.).

Din punct de vedere morfopatologic, în stadiile avansate se observă proliferări neoplazice masive ale țesutului hematopoietic malign, cu mărirea considerabilă a ganglionilor limfatici și infiltrarea organelor interne, afectând funcționalitatea acestora.

Capitolul 4. Restructurări imunologice induse de virusul leucozei enzootice bovine

Virusul leucozei enzootice bovine (VLB) induce modificări semnificative în sistemul imun al animalelor infectate, afectând în special limfocitele B, care exprimă imunoglobulina M (IgM) de membrană, acestea reprezentând principala țintă celulară a virusului. Pe lângă limfocitele B, cercetările au evidențiat și implicarea altor tipuri de celule imunocompetente, precum limfocitele T, monocitele, precum și modularea producției de citokine și a expresiei receptorilor de suprafață. Printre moleculele afectate se numără receptorul interleukinei 2 (IL-2R/CD25), precum și molecule ale complexului major de histocompatibilitate (CMH) de clasa a II-a sau proteine înrudite.

Răspunsul imun umoral post-infecțios se declanșează într-un interval de 3 până la 16 săptămâni, fiind marcat de apariția anticorpilor specifici împotriva proteinelor virale majore, cum ar fi gp51 (glicoproteina de suprafață) și p24 (proteină internă a capsidei). Nivelul titrurilor de anticorpi variază în funcție de încărcătura provirală. Astfel, titrurile scăzute de anticorpi anti-gp51 și anti-p24 sunt corelate cu o replicare virală redusă și o încărcătură provirală mică iar titrurile ridicate sugerează o replicare intensă a virusului și o activitate infecțioasă crescută.

Aceste disfuncții imune joacă un rol important în persistența infecției, dar și în evoluția bolii spre stadii avansate, precum limfocitoza persistentă sau limfosarcomul. Înțelegerea acestor mecanisme este esențială pentru elaborarea strategiilor de monitorizare și intervenție imunologică în cadrul programelor de control al bolii.

Capitolul 5. Metode de diagnostic în leucoza enzootică bovină

Leucoza enzootică bovină (LEB) este o boală cu o evoluție lentă și, în majoritatea cazurilor, asimptomatică, ceea ce face ca diagnosticul de certitudine să se bazeze exclusiv pe examinările de laborator. Cele mai frecvent utilizate teste în practica diagnostică sunt cele serologice, care permit identificarea anticorpilor specifici, produși în urma infecției cu virusul leucozei bovine (VLB). Printre acestea se numără: testul de imunodifuzie în gel de agar (AGID) – considerat metodă de referință de către OIE pentru confirmarea infecției; testul ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – folosit pentru screening datorită

sensibilității și specificității ridicate; reacția de fixare a complementului; testul de neutralizare virală și imunofluorescența.

Pentru confirmarea prezenței virusului sau în cazurile în care testele serologice oferă rezultate incerte, se pot utiliza metodele de biologie moleculară, dintre care menționăm PCR (Reacția de polimerizare în lanț) – pentru detectarea materialului genetic viral, microscopia electronică – folosită mai ales în studii de cercetare și confirmări avansate și examenele imunocitologice și hematologice – utile pentru evaluarea răspunsului imun și a modificărilor limfocitare. Conform Organizației Mondiale pentru Sănătatea Animalelor (OIE), testele AGID și ELISA sunt metodele oficiale acceptate pentru diagnosticarea LEB. În România, supravegherea activă a bolii se realizează atât în exploatațile comerciale, cât și în cele nonprofesionale și constă în testarea anuală a tuturor bovinelor și bubalinelor cu vârsta de peste 24 luni, utilizând testul ELISA, iar în cazul unui rezultat pozitiv, confirmarea se face prin testul de imunodifuzie în gel de agar (AGID).

Testarea prin metoda PCR este indicată în următoarele situații: la viței tineri, care pot avea anticorpi colostrali, interferând cu testele serologice, în cazuri de limfosarcom, pentru diferențierea între formele sporadice și cele infecțioase, pentru detectarea precoce a infecției, înainte de apariția anticorpilor, în situațiile neclare sau rezultate slab pozitive la testele serologice, precum și pentru verificarea țesuturilor suspecte în cadrul inspecțiilor post-mortem în abatoare. Implementarea riguroasă a acestor metode este esențială pentru controlul eficient al bolii, reducerea pierderilor economice și protejarea sănătății animalelor.

Capitolul 6. Măsuri de supraveghere, profilaxie și control în leucoza enzootică bovină

Leucoza enzootică bovină (LEB) este o boală cu o prevalență semnificativă la nivel global, deși multe țări europene au implementat programe eficiente de eradicare. În ciuda acestor eforturi, prevalența leucozei enzootice bovine rămâne ridicată, iar lipsa unui vaccin eficient face ca depistarea timpurie și diagnosticarea corectă să fie esențiale pentru prevenirea răspândirii și diminuarea pierderilor economice.

În majoritatea țărilor, strategiile de control al leucozei enzootice bovine sunt bazate pe testarea serologică periodică a efectivelor de bovine, pentru identificarea animalelor infectate. Testele serologice cele mai utilizate includ testul ELISA și testul de imunodifuzie în gel de agar (AGID), care ajută la diagnosticarea infecțiilor cu virusul leucozei bovine (VLB). În România, măsurile de supraveghere sunt reglementate printr-un program național obligatoriu, care impune testarea anuală a tuturor bovinelor și bubalinelor de peste 24 de luni, indiferent de statutul lor sanitar. Dacă un animal este diagnosticat pozitiv, acesta trebuie sacrificat și eliminat din efectiv, iar restul animalelor sunt retestate la intervale de 30 și 60 de zile.

Eradicarea leucozei enzootice bovine presupune un proces riguros, care include următoarele etape: identificarea animalelor infectate, sacrificarea animalelor pozitive, retestarea periodică, colaborarea între autoritățile veterinare, crescători și instituțiile administrative. În absența unui vaccin eficient, măsurile profilactice sunt esențiale pentru prevenirea răspândirii bolii și includ: izolarea tuturor nou-introduse într-o fermă, controlul mișcărilor de animale, controlul obiectelor și echipamentelor utilizate în fermă. În concluzie, eradicarea leucozei enzootice bovine este un proces complex care necesită eforturi coordonate, monitorizare continuă și implementarea unor măsuri stricte de control și prevenție.

II. Cercetările proprii

Această parte se extinde pe 89 de pagini (70% din teză) și include patru capitole mari, la care se adaugă concluziile generale și elementele de originalitate.

Capitolul 7. Cercetări privind evoluția leucozei enzootice bovine în două județe din centrul României.

Obiectivele studiului

Scopul principal al cercetării a constat în stabilirea evoluției, răspândirii, incidenței și prevalenței virusului leucozei enzootice bovine în două județe din centrul României, în perioada 2019-2024. De asemenea, au fost evaluate comparativ rezultatele obținute prin două teste serologice, ELISA și testul de imunodifuzie în gel de agar (AGID), pe probe de sânge recoltate în cadrul programelor strategice pentru detectarea precoce a bolii.

Materiale și metode

Pentru efectuarea cercetărilor din cadrul prezentei teze de doctorat, au fost recoltate probe de sânge de la 434.209 bovine din două județe din centrul României, majoritatea provenind din exploatații nonprofesionale, urmate de unități tip PFA și un număr mai mic din ferme, pe parcursul celor șase ani de studiu. În prima etapă, probele au fost analizate prin tehnica imunoenzimatică (ELISA de competiție/blocare), în pool-uri de câte 10 probe. Testele imunoenzimatică se bazează pe evidențierea reacției antigen-anticorp cu ajutorul reagenților marcați cu enzime. În cazul în care un pool a reacționat pozitiv, cele 10 probe au fost analizate separat. Pentru probele pozitive la testul imunoenzimatic ELISA, confirmarea a fost realizată prin testul de imunodifuzie în gel de agar, un test care pune în evidență anticorpii seroprecipitanți de la animalele infectate.

Rezultate și discuții

În primul, din cele două județe, în perioada 2019-2024, au fost recoltate și testate 257.468 de probe, din care 135 au reacționat pozitiv la ELISA (0.052), iar 29 dintre acestea au fost confirmate prin testul de imunodifuzie în gel de agar (0.011%). În cel de-al doilea județ, în aceeași perioadă, au fost recoltate și testate 176.761 de probe, din care 40 au fost pozitive la testul imunoenzimatic, iar 17 animale au fost confirmate prin testul de imunodifuzie în gel de agar.

Din ambele județe, cele mai multe cazuri provin din exploatații nonprofesionale, respectiv 25 de cazuri, urmate de ferme cu 17 cazuri, iar în unitățile tip PFA au fost înregistrate doar 4 cazuri. Din cele 14 cazuri pozitive apărute în primul județ, 11 cazuri au provenit din aceeași fermă, în anul 2021, ceea ce sugerează faptul că boala a evoluat în focar, contaminând mai multe animale din același loc. În funcție de vârstă, s-a constatat o incidență mai mare a bolii la bovinele cu vârsta cuprinsă între 4-8 ani, cu un total de 34 de bovine pozitive. De asemenea, s-au înregistrat 6 cazuri la categoria de vârstă 0-3 ani, 5 cazuri la categoria de vârstă 9-12 ani, și doar un singur caz la animalele de peste 12 ani. În ceea ce privește sexul, toate cazurile pozitive au fost înregistrate la femele.

Capitolul 8. Cercetări hematologice și histopatologice în leucoza enzootică bovină

Obiectivele studiului

Scopul principal al studiului a fost de a evidenția modificările hematologice și biochimice, asociate leucozei enzootice bovine, la animalele contaminate cu virusul leucozei bovine (VLB+), comparativ cu un lot de animale sănătoase (VLB-). În acest capitol au fost evaluate prin examene hematologice și biochimice un număr semnificativ de bovine VLB(+)

și VLB(-), din focare cu leucoză enzootică bovină declarate și a avut ca scop stabilirea diferențelor dintre bovinele VLB(+) și VLB(-) privind evoluția principalilor parametri hematologici și biochimici.

Materiale și metode

În scopul stabilirii modificărilor hematologice și biochimice asociate leucozei enzootice bovine, au fost analizate 60 de probe biologice, recoltate de la 30 de bovine. Din cele 30 de probe de sânge recoltate, 20 provin de la animalele VLB(+) (infectate cu virusul leucozei bovine) și 10 de la animalele VLB(-) (neinfectate). Pentru analiza hematologică, au fost determinați următorii parametri: numărul de celule roșii (RBC), hematocritul (Ht), concentrația hemoglobinei (Hb), volumul eritrocitar mediu (VEM), hemoglobina eritocitară medie (HEM), concentrația eritocitară medie (CHEM), coeficientul de variație a dimensiunii eritrocitelor (RDW), numărul total de celule sanguine albe (WBC), volumul plachetar mediu (MPV), inclusiv procentul de limfocite, monocite, neutrofile, eozinofile și bazofile. Probele de sânge au fost recoltate în vacutainere cu EDTA, iar determinările au fost realizate cu ajutorul analizatorului hematologic veterinar ProCyte Dx IDEXX.

La examenul biochimic, au fost determinate următoarele componente: concentrația globulinelor, proteinele totale și albuminele serice. Probele pentru analiza biochimică au fost recoltate în vacutainere fără anticoagulat, iar determinarea s-a realizat prin spectrofotometrie.

Rezultate și discuții

În urma analizei probelor biologice de la bovinele VLB(+), majoritatea acestora au fost surprinse într-un stadiu incipient al bolii, fără modificări clinice și hematologice semnificative, ceea ce subliniază natura asimptomatică a leucozei enzootice bovine în primele etape ale infecției.

La analiza rezultatelor hematologice, s-a observat o diferență semnificativă a numărului total de leucocite, între bovinele VLB(+) adulte și cele tinere, acesta fiind mai crescut la animalele adulte. Acest fapt sugerează că bovinele adulte pot fi încadrate în categoria purtătoarelor de virus, fără a manifesta modificări hematologice notabile, iar numărul crescut al leucocitelor poate reprezenta un indicator important în diagnosticul bolii, în special în stadiile incipiente.

În ceea ce privește ceilalți parametri hematologici, precum volumul eritocitar mediu (VEM), numărul total de leucocite (WBC) și volumul plachetar mediu (MPV), au fost observate modificări semnificative, ceea ce sugerează influența virusului asupra acestor parametri. Aceste modificări indică necesitatea efectuării unor analize suplimentare pentru a înțelege mai bine mecanismele prin care virusul leucozei enzootice bovine afectează parametri hematologici.

În ceea ce privește concentrația proteinelor serice, nu s-au înregistrat diferențe semnificative între animalele VLB(+) și cele VLB(-), ceea ce sugerează că, din punct de vedere biochimic, leucoza enzootică bovină nu provoacă modificări majore ale proteinelor serice în stadiile incipiente ale bolii.

Aceste rezultate subliniază importanța unui diagnostic precoce, bazat pe testarea serologică, pentru că boala poate rămâne asimptomatică în primele etape, iar modificările hematologice pot fi subtile. De asemenea, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a înțelege mai bine efectele virusului asupra parametrilor hematologici și biochimici și pentru a îmbunătăți metodele de diagnostic și control al bolii.

Capitolul 9. Evaluarea comparativă a eficienței metodelor de diagnostic în leucoza enzootică bovină

Obiectivele studiului

În cadrul acestui studiu, ne-am propus să realizăm o evaluare a eficienței celor două teste serologice utilizate în diagnosticul curent al leucozei enzootice bovine, respectiv în ce măsură animalele testate pozitiv prin metoda ELISA au fost ulterior confirmate prin testul de imunodifuzie în gel de agar (AGID). De asemenea, a fost analizată densitatea optică obținută prin ELISA, comparând valorile densității optice ale probelor pozitive confirmate prin AGID cu cele ale probelor pozitive la testul ELISA, dar neconfirmate prin AGID.

Materiale și metode

Pentru realizarea cercetărilor, au fost analizate 175.825 de probe de sânge, recoltate în vacutainere fără aditivi și testate inițial prin metoda imunoenzimatică ELISA, în pool-uri de câte 10 probe. În cazul în care un pool a reacționat pozitiv, toate cele 10 probe componente au fost testate individual. Ulterior, probele individuale pozitive au fost supuse testului de imunodifuzie în gel de agar (AGID), utilizat ca metodă de confirmare. La testarea prin ELISA, a fost analizată densitatea optică a probelor, comparând valorile înregistrate la animalele confirmate pozitiv prin AGID cu valorile obținute la animalele pozitive doar în testul ELISA, dar neconfirmate prin AGID.

Rezultate și discuții

Analiza densităților optice ale probelor pozitive la testul imunoenzimatic a evidențiat diferențe semnificative între probele confirmate pozitiv și cele neconfirmate prin testul AGID, în toate determinările efectuate. Din punct de vedere statistic, la probele confirmate prin AGID s-a înregistrat o valoare medie a densității optice de $0,17 \pm 0,05$, cu un coeficient de variație de 0.32%. În schimb, la probele neconfirmate prin AGID, media densității optice a fost de $0,80 \pm 0,26$, cu un coeficient de variație semnificativ mai mare, de 1.046%.

Pe baza acestor rezultate, obținute în urma analizei a 88 de probe pozitive la ELISA, se poate concluziona că valorile densității optice (DO) pot constitui un indicator relevant pentru diferențierea între animalele cu infecție confirmată și cele fals pozitive, permițând o orientare preliminară în interpretarea rezultatelor ELISA.

Capitolul 10. Cercetări privind determinarea virusului leucozei enzootice bovine prin examene de biologie moleculară

Obiectivele studiului

Scopul principal al acestui studiu a constat în evidențierea prezenței virusului leucozei enzootice bovine prin metoda Real-Time PCR, utilizând probe de sânge recoltate de la animale testate pozitiv prin metoda imunoenzimatică (ELISA) și reconfirmate prin testul de imunodifuzie în gel de agar (AGID). Comparativ cu testele serologice utilizate curent, metoda Real-Time PCR prezintă o sensibilitate superioară și poate fi utilizată ca test de confirmare în cazurile cu rezultate serologice neconcludente sau incerte. Totuși, din cauza costurilor ridicate, această metodă nu este implementată în mod uzual în diagnosticul curent al leucozei enzootice bovine.

Materiale și metode

Pentru efectuarea cercetărilor, au fost recoltate probe de sânge pe EDTA de la zece bovine, provenite din localități diferite, dintre care opt probe de la bovine VLB(+), confirmate atât prin ELISA, cât și prin imunodifuzie în gel de agar (AGID), și două probe de la bovine VLB(-). În prima etapă, s-a realizat extracția ADN-ului viral folosind kitul

comercial PathoGene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit. Calitatea și cantitatea ADN-ului extras au fost evaluate prin spectrofotometrie UV-VIS, utilizând un spectrofotometru NanoDrop 8000, pentru a determina puritatea probelor. Etapa de amplificare a fost împărțită în două faze: în prima fază s-a preparat amestecul principal de reacție, iar în cea de-a doua fază s-a realizat amplificarea propriu-zisă și citirea rezultatelor în timp real. Confirmarea infecției a fost efectuată prin metoda Real-Time qPCR, cu SYBR Green (colorant fluorescent folosit frecvent în reacțiile de Real-Time PCR (qPCR) pentru a detecta și cuantifica acizii nucleici - ADN dublu catenar) utilizând o strategie de detecție de tip Prezent/Absent.

Rezultate și discuții

În urma analizei probelor, s-a constatat o corelație foarte bună între testele serologice (ELISA + AGID) și metoda moleculară Real-Time PCR, confirmând că animalele pozitive serologic sunt și purtătoare de ADN proviral VLB. În urma analizei valorilor Ct-ului (Cycle threshold) s-a constatat prezența ADN-ului proviral la toate probele VLB(+) iar la animalele VLB(-) s-a constatat absența ADN-ului proviral VLB. În urma stabilirii limitei de detecție, se poate observa că probele pozitive au o valoare a CT-ului cuprinsă între 19-23 (încărcătură provirală ridicată → semnale clare, pozitive), iar probele negative au o valoare a CT-ului care variază între 34 și 35 (semnale foarte slabe sau nedetectabile → interpretate ca negative - absența ADN-ului proviral detectabil). Această diferență mare între valorile CT pozitive și negative indică o separare clară între probele infectate și cele neinfectate, ceea ce susține utilizarea testului Real-Time PCR ca instrument de confirmare de înaltă sensibilitate.

III. Concluzii generale și recomandări

Capitolul 11. Concluzii generale

În urma studiilor efectuate, cele mai importante concluzii sunt:

➤ Testele serologice, atât testul imunoenzimatic (ELISA), cât și testul de imunodifuzie în gel de agar (AGID), sunt metode eficiente pentru detecția virusului leucozei enzootice bovine.

➤ Testul imunoenzimatic (ELISA) este un test accesibil, care permite testarea unui număr mare de bovine într-un timp relativ scurt, în timp ce testul AGID este mai sensibil și specific, fiind utilizat ca metodă de confirmare a infecției cu VLB.

➤ În perioada 2019-2024, în urma activităților de supraveghere epidemiologică, au fost identificate cazuri izolate de leucoză enzootică bovină, prevalența generală fiind ne semnificativă, raportat la numărul total de probe analizate.

➤ Rezultatele testelor serologice, efectuate pe un total de 257.468 de probe în județul Alba, au indicat o incidență de 0.052% (135 de probe pozitive la testul ELISA), dintre care 0.011% (29 de cazuri) au fost confirmate prin testul AGID.

➤ În județul Sibiu, din cele 176.761 de probe, incidența a fost de 0.02% prin ELISA și de 0.009% prin AGID. Cele mai multe cazuri pozitive au fost identificate în exploatațiile nonprofesionale, iar, din punct de vedere al vârstei, incidența cea mai mare a fost înregistrată la categoria 4-8 ani, corespunzătoare perioadei productive. Toate cazurile pozitive au fost înregistrate la femele.

➤ Conform rezultatelor obținute, la bovinele VLB(+) examinate nu s-au constatat modificări hematologice semnificative, ceea ce sugerează că infecția a fost depistată într-un stadiu incipient. Acest fapt subliniază eficiența testării serologice anuale, care contribuie la

reducerea riscului de răspândire a bolii și la depistarea precoce a animalelor infectate, înainte de apariția semnelor clinice. Totuși, numărul crescut de leucocite poate constitui un indiciu valoros în diagnostic.

➤ Testele imunoenzimactice (ELISA) au arătat că valorile medii ale densității optice (DO) au fost semnificativ mai mici ($p < 0,05$) în cazul probelor confirmate ca fiind pozitive prin testul AGID, comparativ cu probele neconfirmate. Astfel, valoarea DO, obținută prin ELISA, reprezintă un criteriu obiectiv și fiabil pentru diferențierea netă între animalele seropozitive și cele seronegative.

➤ Metoda Real-Time PCR are o sensibilitate și specificitate superioară, față de testele serologice convenționale, fiind o opțiune eficientă pentru clarificarea rezultatelor incerte. Totuși, utilizarea sa pe scară largă este limitată din cauza costurilor ridicate, fiind recomandată mai ales în cazuri punctuale, cu importanță epidemiologică.

IV. Elemente de originalitate

Capitolul 12. Elemente de originalitate

➤ Studiul se bazează pe un volum mare de date serologice (peste 430.000 de probe) și oferă o imagine clară a evoluției VLB într-o zonă geografică limitată, dar relevantă pentru controlul bolii.

➤ Este prima cercetare mai amplă privind epidemiologia leucozei enzootice bovine în două dintre județele cu un număr mare de bovine din centrul României, abordarea geografică comparativă având un impact practic în managementul regional al bolii.

➤ Se analizează tipologia exploatațiilor afectate (ferme, gospodăriile ale populației, PFA-uri), cu detalii privind distribuția cazurilor în județele analizate.

➤ Caracterizarea profilului epidemiologic în funcție de tipul exploatației, rar detaliat în alte cercetări.

➤ Studiul indică o incidență crescută a infecției la bovinele între 4–8 ani, aspect care poate contribui la optimizarea strategiilor de testare și control.

➤ Propunerea segmentării testării în funcție de grupa de vârstă ca măsură de eficientizare.

➤ Studiul oferă date statistice solide privind modificările hematologice (WBC, MPV, VEM) la bovine seropozitive în funcție de vârstă și stadiul bolii.

➤ Propunerea MPV și WBC ca posibili markeri hematologici precoce ai infecției subclinice.

➤ Este evidențiată diferențierea semnificativă statistic între valorile DO ale probelor confirmate pozitiv și cele negative, sugerând valoarea predictivă a acestui parametru cantitativ.

➤ Propunerea valorilor DO ca indicator de selecție a probelor pentru confirmare prin AGID sau RT-PCR.

➤ Studiul demonstrează, într-un mod sistematic și susținut statistic, relația directă între statusul serologic și cel molecular (RT-PCR) în infecția cu VLB.

➤ Identificarea ADN-ului proviral, exclusiv în probele seropozitive, oferă un argument solid pentru validarea RT-PCR ca metodă de referință în confirmarea infecției, aspect tratat rar în alte lucrări cu acest nivel de detaliu.

➤ Se subliniază capacitatea metodei moleculare de a distinge între infecția activă și interferența anticorpilor maternali, un aspect deosebit de util în diagnosticul neonatal.

➤ Valorificarea RT-PCR în contextul erorilor serologice generate de imunitatea pasivă.

Summary of the PhD thesis

Epidemiological and immunological research into enzootic bovine leukosis

This thesis contains:

List of abbreviations

Summaries in Romanian and English

Introduction

Current state of knowledge: 39 pages

Own research: 89 pages

Tables: 45

Figures: 59

Bibliographic sources: 280

Annexes: 2

Introduction

Enzootic bovine leukosis (EBL) is a chronic infectious disease of cattle caused by bovine leukosis virus (BLV), which causes a persistent infection, localized mainly in B lymphocytes. The infection persists throughout the animal's life and the disease is often asymptomatic in its early stages, making early diagnosis essential. The economic impact of EBL is significant, affecting milk and meat production and generating high costs for periodic testing, isolation and quarantine of infected animals. In addition, the slaughter of BLV-positive animals contributes to additional economic losses. The disease can also have implications for public health and animal welfare, which is why its control and prevention are essential. There is currently no vaccine available for EBL and specific treatments for BLV infection are ineffective, making preventive measures vital. These include implementing strict monitoring programs for cattle herds, isolating positive animals, and eradicating the infection by slaughtering infected animals.

Early diagnosis of infection is only possible through the use of laboratory tests, such as ELISA, which detects the presence of specific antibodies, or PCR, which identifies the genetic material of the virus. These tests are essential for confirming the infection and for establishing an effective disease control plan. From a legislative point of view, the European Union imposes strict regulations for the monitoring and control of enzootic bovine leukosis.

In Romania, the National Enzootic Bovine Leukosis Control Program includes mandatory measures for periodic testing of cattle, monitoring and rapid identification of infected animals, as well as their elimination from livestock to prevent the spread of the disease. These regulations are essential for limiting the economic impact and for protecting public health.

I. Current state of knowledge

This part of the thesis extends over 39 pages (30% of the thesis) and is structured in six chapters, as follows:

Chapter 1. Current data on the etiology, spread and economic importance of enzootic bovine leukosis

Taxonomically, bovine leukosis virus belongs to the genus Deltaretrovirus, family Retroviridae and order Ortervirales. The virus causes a persistent infection, with asymptomatic evolution in most cases, but which can lead, in advanced stages, to the development of lymphoid tumors or other severe clinical manifestations. BLV has a slow infection mechanism, and infected animals become carriers of the virus throughout their lives, without showing clinical symptoms until the final stages of the disease. Leukosis is a disease with a wide geographical distribution, affecting all continents and having a significant impact on milk and meat production. The prevalence of the disease varies considerably depending on the region and the control measures adopted. In Europe and North America, the prevalence of enzootic bovine leukosis is usually between 1 and 5%, while in South America and Africa, the prevalence can reach up to 20%. In Romania, enzootic bovine leukosis was first reported in 1954. However, the number of cases experienced an alarming increase between 2001 and 2003, which attracted the attention of the sanitary-veterinary authorities and prompted the implementation of stricter control measures.

Enzootic bovine leukosis causes significant economic losses to the cattle industry. These losses are due to several factors, including reduced milk production, reduced productivity of infected animals, premature culling of animals, and additional costs associated with testing, quarantine, and disease control. The European Union and other international animal health organizations have imposed strict regulations for the control of enzootic bovine leukosis, which include national testing programs and measures to prevent the spread of the disease. Continuous monitoring of outbreaks and the implementation of quarantine measures are also essential to limit the spread of the infection. In conclusion, enzootic bovine leukosis is a major animal health and agricultural economic problem, and effective prevention and control measures are necessary to minimize the impact of this disease on cattle production and national economies.

Chapter 2. Epidemiology and pathogenesis of enzootic bovine leukosis virus infection

Naturally, the species susceptible to infection with enzootic bovine leukosis virus (EBV) are cattle and buffaloes, regardless of age. However, the incidence of the disease is higher in cattle at peak production, especially in the 5–7 year age group.

The virus spreads slowly within herds, with a long incubation period of 4–5 years, which makes detection and control of the infection difficult. The main sources of infection are sick animals, which can transmit the virus both horizontally (from animal to animal) and vertically (from mother to fetus). Horizontal transmission is the most common and occurs through direct or indirect contact, through contaminated objects (needles, medical equipment) or surgical or obstetric procedures performed without compliance with veterinary hygiene standards.

Chapter 3. Symptoms and anatomo-pathological changes in enzootic bovine leukosis

The evolution of BVD infection in cattle is multistage and can be divided into three stages: The stage of subclinical infection, occurs in approximately 70% of infected animals, which are positive in serological tests, but do not show visible clinical signs; in this phase, the animals represent the main source of infection in the herd; The stage of persistent lymphocytosis, occurs in approximately 30% of infected cattle and is characterized by a persistent increase in the number of lymphocytes in the peripheral blood, without other obvious clinical signs, but with an increased risk of progression to the tumoral form; The tumoral stage (lymphosarcoma),

is the most serious and affects between 5% and 10% of infected animals; in this phase, malignant tumors develop in the lymphoid tissue and in various organs (heart, stomach, liver, kidneys, spleen, etc.).

From a morphopathological point of view, in advanced stages massive neoplastic proliferations of malignant hematopoietic tissue are observed, with considerable enlargement of the lymph nodes and infiltration of internal organs, affecting their functionality.

Chapter 4. Immunological restructuring induced by enzootic bovine leukosis virus

Enzootic bovine leukosis virus (EBV) induces significant changes in the immune system of infected animals, affecting in particular B lymphocytes, which express membrane immunoglobulin M (IgM), which are the main cellular target of the virus. In addition to B lymphocytes, research has also highlighted the involvement of other types of immunocompetent cells, such as T lymphocytes, monocytes, as well as the modulation of cytokine production and surface receptor expression. Among the affected molecules are the interleukin 2 receptor (IL-2R/CD25), as well as molecules of the major histocompatibility complex (MHC) class II or related proteins.

The post-infectious humoral immune response is triggered within a period of 3 to 16 weeks, being marked by the appearance of specific antibodies against major viral proteins, such as gp51 (surface glycoprotein) and p24 (internal capsid protein). The level of antibody titers varies depending on the proviral load. Thus, low titers of anti-gp51 and anti-p24 antibodies are correlated with reduced viral replication and a low proviral load, and high titers suggest intense viral replication and increased infectious activity.

These immune dysfunctions play an important role in the persistence of infection, but also in the evolution of the disease towards advanced stages, such as persistent lymphocytosis or lymphosarcoma. Understanding these mechanisms is essential for the development of immunological monitoring and intervention strategies within disease control programs.

Chapter 5. Diagnostic methods in enzootic bovine leukosis

Enzootic bovine leukosis (EBL) is a disease with a slow evolution and, in most cases, asymptomatic, which makes the diagnosis of certainty based exclusively on laboratory examinations. The most frequently used tests in diagnostic practice are serological ones, which allow the identification of specific antibodies produced following infection with bovine leukosis virus (BLV). Among them are: the agar gel immunodiffusion test (AGID) – considered the reference method by the OIE for confirming infection; the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test – used for screening due to its high sensitivity and specificity; the complement fixation reaction; the viral neutralization test and immunofluorescence.

To confirm the presence of the virus or in cases where serological tests provide uncertain results, molecular biology methods can be used, including PCR (Polymerization Chain Reaction) – for the detection of viral genetic material, electron microscopy – used mainly in research studies and advanced confirmations, and immunocytological and hematological examinations – useful for evaluating the immune response and lymphocytic changes. According to the World Organization for Animal Health (OIE), the AGID and ELISA tests are the officially accepted methods for diagnosing LEB. In Romania, active surveillance of

the disease is carried out in both commercial and non-professional farms and consists of annual testing of all cattle and buffaloes over 24 months of age, using the ELISA test, and in case of a positive result, confirmation is made by the agar gel immunodiffusion test (AGID).

PCR testing is indicated in the following situations: in young calves, which may have colostral antibodies, interfering with serological tests, in cases of lymphosarcoma, to differentiate between sporadic and infectious forms, for early detection of infection, before the appearance of antibodies, in unclear situations or weakly positive results in serological tests, as well as for checking suspicious tissues during post-mortem inspections in slaughterhouses. Rigorous implementation of these methods is essential for effective disease control, reducing economic losses and protecting animal health.

Chapter 6. Surveillance, prevention and control measures in enzootic bovine leukosis

Enzootic bovine leukosis (EBL) is a disease with a significant prevalence worldwide, although many European countries have implemented effective eradication programs. Despite these efforts, the prevalence of EBL remains high, and the lack of an effective vaccine makes early detection and correct diagnosis essential to prevent spread and reduce economic losses.

In most countries, EBL control strategies are based on periodic serological testing of cattle herds to identify infected animals. The most commonly used serological tests include the ELISA test and the agar gel immunodiffusion test (AGID), which help diagnose bovine leukosis virus (BLV) infections. In Romania, surveillance measures are regulated by a mandatory national program, which requires annual testing of all cattle and buffaloes over 24 months of age, regardless of their health status. If an animal is diagnosed positive, it must be slaughtered and removed from the herd, and the remaining animals are retested at 30 and 60 day intervals.

The eradication of enzootic bovine leukosis involves a rigorous process, which includes the following steps: identification of infected animals, slaughter of positive animals, periodic retesting, collaboration between veterinary authorities, breeders and administrative institutions. In the absence of an effective vaccine, prophylactic measures are essential to prevent the spread of the disease and include: isolation of all new arrivals to a farm, control of animal movements, control of objects and equipment used on the farm. In conclusion, the eradication of enzootic bovine leukosis is a complex process that requires coordinated efforts, continuous monitoring and the implementation of strict control and prevention measures.

II. Own researches

This part extends over 89 pages (70% of the thesis) and includes four large chapters, to which general conclusions and original elements are added.

Chapter 7. Research on the evolution of enzootic bovine leukosis in two counties in central Romania.

Study objectives

The main aim of the research was to establish the evolution, spread, incidence and prevalence of enzootic bovine leukosis virus in two counties in central Romania, during the period 2019-2024. Also, the results obtained through two serological tests, ELISA and the

agar gel immunodiffusion test (AGID), were comparatively evaluated, on blood samples collected within the strategic programs for the early detection of the disease.

Materials and methods

To carry out the research within the framework of this doctoral thesis, blood samples were collected from 434,209 cattle from two counties in central Romania, the majority coming from non-professional farms, followed by PFA units and a smaller number from farms, during the six years of study. In the first stage, the samples were analyzed by the immunoenzymatic technique (competitive/blocking ELISA), in pools of 10 samples. Immunoenzymatic tests are based on the detection of the antigen-antibody reaction using enzyme-labeled reagents. If a pool reacted positively, the 10 samples were analyzed separately. For samples positive in the ELISA immunoenzymatic test, confirmation was performed by the agar gel immunodiffusion test, a test that highlights seroprecipitating antibodies from infected animals.

Results and Discussion

In the first of the two counties, during the period 2019-2024, 257,468 samples were collected and tested, of which 135 reacted positively to ELISA (0.052%), and 29 of these were confirmed by the agar gel immunodiffusion test (0.011%). In the second county, during the same period, 176,761 samples were collected and tested, of which 40 were positive to the enzyme immunoassay test, and 17 animals were confirmed by the agar gel immunodiffusion test.

In both counties, most cases come from non-professional farms, respectively 25 cases, followed by farms with 17 cases, and only 4 cases were recorded in PFA units. Of the 14 positive cases in the first county, 11 cases came from the same farm in 2021, which suggests that the disease evolved into an outbreak, contaminating several animals from the same place. Depending on age, a higher incidence of the disease was found in cattle aged between 4-8 years, with a total of 34 positive cattle. There were also 6 cases in the 0-3 age category, 5 cases in the 9-12 age category, and only one case in animals over 12 years old. Regarding gender, all positive cases were recorded in females.

Chapter 8. Hematological and histopathological research in enzootic bovine leukosis

Objectives of the study

The main aim of the study was to highlight the hematological and biochemical changes associated with enzootic bovine leukosis in animals contaminated with bovine leukosis virus (BLE+), compared to a group of healthy animals (BLE-). In this chapter, a significant number of BLE(+) and BLE(-) cattle from declared BLE outbreaks were evaluated through hematological and biochemical examinations and the aim was to establish the differences between BLE(+) and BLE(-) cattle regarding the evolution of the main hematological and biochemical parameters.

Materials and methods

In order to establish the hematological and biochemical changes associated with enzootic bovine leukosis, 60 biological samples were analyzed, collected from 30 cattle. Of the 30 blood samples collected, 20 came from BLV(+) animals (infected with bovine leukosis virus) and 10 from BLV(-) animals (uninfected). For hematological analysis, the following parameters were determined: red blood cell count (RBC), hematocrit (Ht), hemoglobin concentration (Hb), mean erythrocyte volume (MEV), mean erythrocyte hemoglobin (MCH), mean erythrocyte concentration (MEC), erythrocyte size variation coefficient (RDW), total white blood cell count

(WBC), mean platelet volume (MPV), including the percentage of lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and basophils. Blood samples were collected in vacutainers with EDTA, and the determinations were performed using the ProCyte Dx IDEXX veterinary hematology analyzer.

During the biochemical examination, the following components were determined: globulin concentration, total proteins and serum albumins. Samples for biochemical analysis were collected in vacutainers without anticoagulant, and the determination was performed by spectrophotometry.

Results and discussions

Following the analysis of biological samples from VLB(+) cattle, most of them were detected at an early stage of the disease, without significant clinical and hematological changes, which underlines the asymptomatic nature of enzootic bovine leukosis in the early stages of infection.

When analyzing the hematological results, a significant difference in the total leukocyte count was observed between adult and young VLB(+) cattle, with the count being higher in adult animals. This suggests that adult cattle can be classified as virus carriers without showing notable hematological changes, and the increased leukocyte count may represent an important indicator in the diagnosis of the disease, especially in the early stages.

Regarding the other hematological parameters, such as mean erythrocyte volume (MEV), total leukocyte count (WBC) and mean platelet volume (MPV), significant changes were observed, suggesting the influence of the virus on these parameters. These changes indicate the need for further analyses to better understand the mechanisms by which enzootic bovine leukosis virus affects hematological parameters.

Regarding serum protein concentration, there were no significant differences between VLB(+) and VLB(-) animals, suggesting that, biochemically, enzootic bovine leukosis does not cause major changes in serum proteins in the early stages of the disease.

These results emphasize the importance of early diagnosis, based on serological testing, because the disease may remain asymptomatic in the early stages and haematological changes may be subtle. Further research is also needed to better understand the effects of the virus on haematological and biochemical parameters and to improve methods for diagnosis and control of the disease.

Chapter 9. Comparative evaluation of the efficiency of diagnostic methods in enzootic bovine leukosis

Study objectives

In this study, we aimed to evaluate the efficiency of the two serological tests used in the current diagnosis of enzootic bovine leukosis, namely to what extent animals tested positive by the ELISA method were subsequently confirmed by the agar gel immunodiffusion test (AGID). The optical density obtained by ELISA was also analyzed, comparing the optical density values of positive samples confirmed by AGID with those of samples positive by the ELISA test, but not confirmed by AGID.

Materials and methods

To carry out the research, 175,825 blood samples were analyzed, collected in vacutainers without additives and initially tested by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in pools of 10 samples. If a pool reacted positively, all 10 component samples were tested individually. Subsequently, individual positive samples were subjected to the agar gel

immunodiffusion test (AGID), used as a confirmatory method. In ELISA testing, the optical density of the samples was analyzed, comparing the values recorded in animals confirmed positive by AGID with the values obtained in animals positive only in the ELISA test, but not confirmed by AGID.

Results and Discussion

The analysis of the optical densities of the positive samples in the enzyme immunoassay revealed significant differences between the samples confirmed positive and those not confirmed by the AGID test, in all determinations performed. From a statistical point of view, in the samples confirmed by AGID, a mean optical density value of 0.17 ± 0.05 was recorded, with a coefficient of variation of 0.32%. In contrast, in the samples not confirmed by AGID, the mean optical density was 0.80 ± 0.26 , with a significantly higher coefficient of variation of 1.046%.

Based on these results, obtained from the analysis of 88 positive samples in the ELISA, it can be concluded that the optical density (OD) values can constitute a relevant indicator for differentiating between animals with confirmed infection and false positives, allowing a preliminary orientation in the interpretation of the ELISA results.

Chapter 10. Research on the determination of enzootic bovine leukosis virus by molecular biology tests

Objectives of the study

The main aim of this study was to highlight the presence of enzootic bovine leukosis virus by the Real-Time PCR method, using blood samples collected from animals tested positive by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reconfirmed by the agar gel immunodiffusion test (AGID). Compared to currently used serological tests, the Real-Time PCR method has a higher sensitivity and can be used as a confirmatory test in cases with inconclusive or uncertain serological results. However, due to its high costs, this method is not usually implemented in the current diagnosis of enzootic bovine leukosis.

Materials and methods

To carry out the research, blood samples were collected on EDTA from ten cattle, coming from different localities, of which eight samples were from VLB(+) cattle, confirmed by both ELISA and agar gel immunodiffusion (AGID), and two samples were from VLB(-) cattle. In the first stage, viral DNA extraction was performed using the commercial PathoGene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit. The quality and quantity of the extracted DNA were evaluated by UV-VIS spectrophotometry, using a NanoDrop 8000 spectrophotometer, to determine the purity of the samples. The amplification stage was divided into two phases: in the first phase, the main reaction mixture was prepared, and in the second phase, the actual amplification and real-time reading of the results were performed. Confirmation of infection was performed by the Real-Time qPCR method, with SYBR Green (fluorescent dye frequently used in Real-Time PCR (qPCR) reactions to detect and quantify nucleic acids - double-stranded DNA) using a Present/Absent detection strategy.

Results and discussions

Following the analysis of the samples, a very good correlation was found between the serological tests (ELISA + AGID) and the Real-Time PCR molecular method, confirming that serologically positive animals are also carriers of VLB proviral DNA. Following the analysis of the Ct (Cycle threshold) values, the presence of proviral DNA was found in all

VLB(+) samples and the absence of VLB proviral DNA was found in VLB(-) animals. Following the establishment of the detection limit, it can be seen that the positive samples have a CT value ranging between 19-23 (high proviral load → clear, positive signals), and the negative samples have a CT value ranging between 34 and 35 (very weak or undetectable signals → interpreted as negative - absence of detectable proviral DNA). This large difference between positive and negative CT values indicates a clear separation between infected and uninfected samples, which supports the use of the Real-Time PCR test as a highly sensitive confirmatory tool.

III. General conclusions and recommendations

Chapter 11. General conclusions

Following the studies carried out, the most important conclusions are:

- Serological tests, both the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the agar gel immunodiffusion (AGID) test, are effective methods for the detection of enzootic bovine leukosis virus.

- The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an accessible test, which allows testing a large number of cattle in a relatively short time, while the AGID test is more sensitive and specific, being used as a method for confirming BV infection.

- During the period 2019-2024, following epidemiological surveillance activities, isolated cases of enzootic bovine leukosis were identified, the overall prevalence being insignificant, compared to the total number of samples analyzed.

- The results of serological tests, carried out on a total of 257,468 samples in Alba County, indicated an incidence of 0.052% (135 positive samples in the ELISA test), of which 0.011% (29 cases) were confirmed by the AGID test.

- In Sibiu County, out of the 176,761 samples, the incidence was 0.02% by ELISA and 0.009% by AGID. Most positive cases were identified in non-professional farms, and, in terms of age, the highest incidence was recorded in the 4–8 year category, corresponding to the productive period. All positive cases were recorded in females.

- According to the results obtained, no significant hematological changes were found in the examined VLB(+) cattle, which suggests that the infection was detected at an early stage. This fact underlines the efficiency of annual serological testing, which contributes to reducing the risk of disease spread and to the early detection of infected animals, before the appearance of clinical signs. However, the increased number of leukocytes can be a valuable indicator in the diagnosis.

- Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) showed that the mean optical density (OD) values were significantly lower ($p < 0.05$) in the case of samples confirmed as positive by the AGID test, compared to the unconfirmed samples. Thus, the OD value, obtained by ELISA, represents an objective and reliable criterion for the clear differentiation between seropositive and seronegative animals.

- The Real-Time PCR method has a higher sensitivity and specificity than conventional serological tests, being an effective option for clarifying uncertain results. However, its widespread use is limited due to high costs, being recommended mainly in specific cases with epidemiological importance.

IV. Originality aspects

Chapter 12. Elements of originality

- The study is based on a large volume of serological data (over 430,000 samples) and provides a clear picture of the evolution of BVD in a limited geographical area, but relevant for disease control.

- It is the first larger research on the epidemiology of enzootic bovine leukosis in two of the counties with a large number of cattle in central Romania, the comparative geographical approach having a practical impact on the regional management of the disease.

- The typology of affected holdings (farms, households, PFAs) is analyzed, with details on the distribution of cases in the analyzed counties.

- Characterization of the epidemiological profile according to the type of holding, rarely detailed in other research.

- The study indicates an increased incidence of infection in cattle between 4–8 years old, an aspect that may contribute to the optimization of testing and control strategies.

- Proposing the segmentation of testing according to age group as an efficiency measure.

- The study provides solid statistical data on hematological changes (WBC, MPV, VEM) in seropositive cattle according to age and stage of the disease.

- The proposal of MPV and WBC as possible early hematological markers of subclinical infection.

- The statistically significant differentiation between the OD values of the confirmed positive and negative samples is highlighted, suggesting the predictive value of this quantitative parameter.

- The proposal of OD values as an indicator for selecting samples for confirmation by AGID or RT-PCR.

- The study demonstrates, in a systematic and statistically supported way, the direct relationship between the serological and molecular status (RT-PCR) in BVD infection.

- The identification of proviral DNA, exclusively in seropositive samples, provides a solid argument for the validation of RT-PCR as a reference method in confirming the infection, an aspect rarely treated in other works with this level of detail.

- The ability of the molecular method to distinguish between active infection and maternal antibody interference is emphasized, a particularly useful aspect in neonatal diagnosis.

- The use of RT-PCR in the context of serological errors generated by passive immunity.