

UNIVERSITATEA OVIDIUS DIN CONSTANȚA ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE
DOMENIUL BIOLOGIE / BIOCHIMIE

TEZĂ DE DOCTORAT

**PESTA PORCINĂ AFRICANĂ LA PORCII DOMESTICI ȘI MISTREȚI PRIN PRISMA
INVESTIGAȚIILOR FOLOSITE ÎN CADRUL LABORATORULUI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ
CE PERMIT PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A GENOMULUI VIRAL PRIN TEHNICA REAL TIME PCR
ȘI ELISA**

CONDUCĂTOR DOCTORAT

Prof.univ. Emerit Dr. Natalia Roșoiu

Membru Titular al Academiei Oamenilor de Știință din România

COMISIA DE ÎNDRUMARE

Prof.univ. Dr. Chifiriuc Carmen

Prof.univ. Dr. Negreanu - Pârjol Ticuța

CS I. Dr. Olariu Laura

DOCTORAND

Anghel (Cireășă) Larisa

Constanța

2025

CUPRINS

PESTA PORCINĂ AFRICANĂ LA PORCII DOMESTICI ȘI MISTREȚI PRIN PRISMA INVESTIGAȚIILOR FOLOSITE ÎN CADRUL LABORATORULUI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ CE PERMIT PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A GENOMULUI VIRAL PRIN TEHNICA REAL TIME PCR ȘI ELISA

OBIECTIVELE SI SCOPUL LUCRĂRI	1-2
PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3-48
CAPITOLUL 1 VIRUSUL PESTEII PORCINE AFRICANE	3-27
1.1 Structura genomului	3-9
1.2 Replicarea virusului	9-10
1.3 Manifestări clinice și patologice	11-18
1.4 Modificări hematologice	18-20
1.5 Cultivarea virusului pesteii porcine africane	20-22
1.6 Antigenitate	22-23
1.7 Răspunsul imun	24-27
CAPITOLUL 2 ASPECTE EPIDEMIOLOGICE ȘI ECOLOGICE	28-36
2.1. Circulația virusului	28-32
2.2 Importanța porcilor mistreți în transmiterea bolii	32-33
2.3 Alte posibilități de difuzare a virusului	33-34
2.4 Rezistența virusului pesteii porcine africane la factorii de mediu	34-36
CAPITOLUL 3 METODE DE DETECȚIE A VIRUSULUI PESTEII PORCINE AFRICANE	37-43
3.1 Izolarea și testul de hemabsorpție	38-39
3.2 Detectarea antigenului prin tehnica anticorpilor fluorescenți și imunomicroscopia	39-40
3.3 Detectarea ADN-ului prin reacția în lanț a polimerazei și hibridizarea în situ	40-42
3.4 Detectarea anticorpilor prin teste serologice	42-43
CAPITOLUL 4 ASPECTE PRIVIND IMUNOPROFILAXIA ȘI NEUTRALIZAREA VIRUSULUI PESTEII PORCINE AFRICANE	44-48
PARTEA II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	49-145
INTRODUCERE	49
CAPITOLUL 5 MATERIALE ȘI METODE, TEHNICI, APARATURĂ	50-78
5.1 Metoda de analiză pentru studiu epidemiologic al evoluției PPA în arealul județului Constanța	50
5.1.1 Ancheta epidemiologică	50-63
5.1.2 Analiza statistică	63
5.1.3 Analiza geografică	64
5.2 Metoda de analiză pentru examen genetic folosind metoda de virus secvențiere și analiza filogenetică	64
5.2.1 Materialul biologic	64
5.2.2 Materiale chimice	64
5.2.3 Metoda de lucru	64-66
5.2.4 Echipamente	66
5.3 Metoda de analiză pentru examenul virusologic prin metoda de identificarea genomului virusului PPA folosind metoda Reacției în lanț a polimerazei în Timp Real qPCR	66
5.3.1 Materialul biologic	66
5.3.2 Materiale chimice	67
5.3.3 Metoda de lucru	67-70
5.3.4 Echipamente	71-72
5.4 Metoda de analiză pentru examenul serologic folosind metoda de detecție a anticorpilor anti-virus PPA prin tehnica imuno-enzimatică ELISA	72

5.4.1 Materialul biologic	72
5.4.2 Materiale chimice	72-73
5.4.3 Metoda de lucru	73-75
5.4.4 Echipamente	75-76
5.5 Metoda de analiză pentru examenul hematologic prin analiza constituenților din sânge pe EDTA la animalele testate pozitiv pentru virusul PPA	76
5.5.1 Materialul biologic	76
5.5.2 Materiale chimice	76-77
5.5.3 Metoda de lucru	77
5.5.4 Echipamente	77-78
CAPITOLUL 6 EXPERIMENTE PROPRII	79-145
6.1 Studiu epidemiologic al evoluției PPA în arealul județului Constanța	79
6.1.1 Scopul studiului	79-80
6.1.2 Rezultate și discuții	80-92
6.2 Examen genetic folosind metoda de virus secvențiere și analiză filogenetică	93
6.2.1 Scopul studiului	93-94
6.2.2 Rezultate și discuții	94-95
6.3 Examen virusologic prin metoda de identificarea genomului virusului PPA folosind metoda Reacției în lanț a polimerazei în timp Real qPCR	96
6.3.1 Scopul studiului	96
6.3.2 Rezultate și discuții	97
6.3.2.1 Detectarea și monitorizarea infecției cu virusul PPA prin utilizarea testului Real Time qPCR	97-108
6.3.2.2 Compararea a două tipuri de matrici (sânge pe EDTA și organe)	109-118
6.4 Examen serologic folosind metoda de detecție a anticorpilor anti-virus PPA prin tehnica imuno-enzimatică ELISA	119
6.4.1 Scopul studiului	119
6.4.2 Rezultate și discuții	119
6.4.2.1 Studiu comparativ al rezultatelor obținute prin două metode Real Time PCR și ELISA	119-125
6.4.2.2 Detectarea și monitorizare infecției cu virusul PPA utilizând testul ELISA	125-135
6.5 Examen hematologic prin analiza constituenților din sânge pe EDTA la animalele testate pozitiv pentru virusul PPA	136-141
6.5.1 Scopul studiului	136
6.5.2 Rezultate și discuții	136-141
Capitolul 7. CONCLUZII GENERALE	142-145
BIBLIOGRAFIE	146-168
LUCRĂRI PUBLICATE ÎN EXTENSO ÎN CURSUL STAGIULUI DE DOCTORAT ÎN REVISTE ISI ȘI BD	169-170
LUCRĂRI SUSȚINUTE LA DIVERSE MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE PUBLICATE SUB FORMA DE REZUMAT	170-172
PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE, CURSURI DE PERFECTIONARE ORGANIZATE	173

OBIECTIVELE ȘI SCOPUL LUCRĂRII

În ultimi ani datorită numărului ridicat de focare de pestă porcină africană (PPA) raportate și consecințelor economice, această viroză este considerată cea mai importantă dintre toate bolile care se manifestă la suine atât în țara noastră cât și la nivel global. Pesta porcină africană (PPA) este o boală virală a porcului domestic și a mistreților.

Am ales să studiem această boală datorită impactului medical, dar și socio-economic deosebit pe care îl are asupra comerțului internațional și care impune ca raportarea noilor cazuri de boală să fie obligatoriu notificabilă către WOA (Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor). Boala este produsă de un virus distinct, singurul din Familia *Asfarviridae*. Animalele infectate prezintă o mare varietate de forme clinice care variază în funcție de virulența virusului dar și de caracteristicile imunologice ale gazdei. Absența actuală a profilaxiei sau a contramăsurilor eficiente, face ca aceasta să reprezinte un pericol economic atât pentru regiunile afectate cât și învecinate. De aceea considerăm că este imperativă urmărirea unor aspecte privind epidemiologia, precum modul de transmitere al bolii, reacția organismului gazdă, pentru a putea în acest fel preveni transmiterea și de asemenea pentru a implementa măsuri stricte de biosecuritate și strategii de control și eradicare.

Pornind de la aceste aspecte enunțate anterior, lucrarea de față are drept scop identificarea genomului PPA prin tehnici de laborator desfășurate în cadrul DSVSA Constanța prin identificarea cazurilor pozitive de PPA și își propune următoarele obiective:

Stabilirea curbei epidemiologice și a incidenței PPA în județul Constanța pe o perioadă de șase ani (2018-2023) și totodată o comparație a dinamicii de transmitere a focarelor de PPA între diferite țări.

Un al doilea obiectiv epidemiologic urmărit îl reprezintă evidențierea existenței unei posibile dinamici sezoniere ce permite analiza îndeaproape a posibilităților vectori transmisibili.

S-a realizat analiza datelor de secvențiere și generarea arborelui filogenetic folosind datele de secvențiere GenBank pentru a evidenția asemănări între izolatele noastre versus izolatele din alte țări.

Compararea a două tipuri de probe examinate prin metoda Polymerase Chain Reaction (PCR) ce au evidențiat pe baza analizei valorilor de Cycle Threshold (CT) detectarea genomului viral PPA în cantitate predominantă în probele de sânge cu acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) comparativ cu probele de țesuturi și organe, ce indică faptul că sângele pe EDTA are o specificitate mai mare pentru detectarea genomului viral PPA, atât în stadiile incipiente ale bolii cât și în stadiile târzii de evoluție.

Detectarea și monitorizarea infecției cu virusul PPA la porcii domestici și mistreți, printr-o abordare bilaterală, utilizând metode de detecție a genomului viral precum și detectarea anticorpilor anti-virus. Prin examinarea unei palete extinse de probe s-a evidențiat că metoda PCR permite detectarea în stadiile pre-viremice ale infecției PPA cât și în stadiul de diseminare sistemică a virusului ce duce la instalarea viremiei în timp ce metoda testul imunosorbant legat de enzimă (ELISA) permite detectarea prezenței anticorpilor specifici PPA începând cu a 14-a zi după contactul cu virusul. Prin urmare nu este o metodă de analiză fiabilă pentru confirmarea bolii însă poate fi utilizat pentru a monitoriza starea imunologică post-infecție PPA a populațiilor de porci domestici și mistreți.

Am luat în considerare o altă metodă de analiză pentru a depista cât mai rapid cazurile pozitive de PPA bazându-ne pe punerea în evidență a schimbărilor privind parametrii sangvini în diferitele etape ale viremiei prin compararea cazurilor pozitive cu cazurile negative.

CAPITOLUL 1

VIRUSUL PESTEI PORCINE AFRICANE

1.1 Structura genomului

Acest capitol aprofundează caracteristicile și diversitatea semnificativă dintre izolate a genomului virusului PPA ce face parte din Familia *Asfarviridae*, fiind singurul membru din această familie, Specia Virusul pestei porcine africane (PPA), gen *Asphivirus* clasificat ca un *Arbovirus ADN* (Alejo et al., 2018). Virusul PPA a fost clasificat în 24 de genotipuri bazate pe secvențierea genei B626L, ce codifică proteina p72. S-a constatat o distribuție a acestor genotipuri în diferite regiuni geografice cu răspândire variată în funcție de zone (Chapman et al., 2008).

Structura genomului viral a fost studiată încă de la apariția bolii iar rezultatele au arătat că această moleculă de ADN dublu catenară de dimensiuni mari 170- 193 perechi kilobaze (kbp) codifică între 151-175 de cadre de citire deschise (ORF) (L. Wang et al., 2020). Virusul PPA are o structură multistrat, nucleul viral este învelit de un dublu strat lipidic, de o capsidă ce conferă forma icosaedrică a virionului, de un înveliș interior derivat din

reticulul endoplasmatic. Și un înveliș de bază care înconjoară nucleul viral acest înveliș este compus din două poliproteine, pp220 și pp62. Cercetările au arătat că în absența pp62 infecția produce particule virale fără nucleu (Suárez et al., 2010).

Genomul este constituit dintr-o regiune centrală ce este foarte bine conservată și regiunile aflate la capete ce sunt variabile având rol în adaptabilitatea și diversitatea acestuia (Bao et al., 2022) fiind bogate în familii multigene (MGF) acestea contribuie la virulența și la modul de adaptare a virusului (Domelevo Entfellner et al., 2024). Variația dintre genomurile diferitelor izolate PPA se datorează cel mai frecvent câștigului sau pierderii membrilor familiilor multigene, MGF 100,110,300,360,505/530 impactul pe care îl are pierderea MGF 110 asupra modului în care virusul își crește patogenitatea prin evitarea răspunsului imun (Vega et al., 1990).

Au fost identificate 68 de proteine structurale și alte 100 de proteine nestructurale (Y. Wang et al., 2021). Dintre proteinele structurale p72, p15 și p35 sunt implicate în formarea virionului iar proteinele nestructurale precum deoxidiurină trifosfat (dUTP) ce sunt implicate în replicare și transcripție (G. Wang et al., 2021), dar și gene flexibile cu proteine asemănătoare histaminelor și factorilor de transcripție ce codifică proteinele implicate în evitarea răspunsului imun al gazdei cum este gena ASFV 5-HL aceasta codifică gena Bcl-2 care prelungește supraviețuirea celulelor apoptotice, ajutând astfel virusul să evite efectele răspunsului imun al gazdei. Pe când gena 4CL deși are o structură similară nu prezintă activitate apoptotică (Neilan et al., 1997).

PARTEA II

CONTRIBUȚII PERSONALE

INTRODUCERE

Având în vedere că nu există date științifice privind evoluția bolii PPA în județul Constanța, România, am concentrat cercetarea de față asupra diagnosticului și confirmării focarelor de PPA și implicit asupra aspectelor epidemiologice întâlnite în rândul mistreților și populației de porci domestici. Factorul de risc uman a fost luat în considerare ca având un rol important în răspândirea și menținerea PPA în populația porcilor domestici crescuți în sistem gospodăresc privat. Testarea ELISA a fost un instrument util folosit pentru a arăta răspândirea PPA pe parcursul a șase ani de la confirmarea primului caz PPA. Lucrarea de față are drept scop identificarea genomului PPA prin tehnici de laborator desfășurate în cadrul DSVSA Constanța pentru confirmarea cazurilor pozitive PPA și analizele filogenetice virale desfășurate în laboratorul de Genomică de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca.

CAPITOLUL 5

MATERIALE ȘI METODE, TEHNICI, APARATURĂ

5.1 Metoda de analiză pentru studiul epidemiologic al evoluției pestei porcine africane în arealul județului Constanța

5.1.1 Ancheta epidemiologică

Pentru identificarea virusului PPA, a gazdei și a factorilor de mediu care provoacă această boală o întreagă echipă, reprezentată de medici veterinari și ingineri din Biroul de Sănătate Animală aflat în cadrul DSVSA Constanța ce are o structură și responsabilități specifice privind eradicarea PPA la nivel local pe baza cerințelor Manualului Operațional pentru PPA (Terrestrial Code Online Access, n.d.), elaborează planul de contingență și responsabilitățile asociate. Aceste demersuri sunt stabilite de Centrul Local pentru Controlul Bolilor (CLCB), organizat în trei divizii distincte: Unitatea Locală de Decizie (ULD), Unitatea Operațională Locală (UOL), care supraveghează și Centrul de Investigații pe teren (CIT) și Unitatea de Suport Local (ULS).

Metodele epidemiologice sunt utilizate pentru a stabili originile bolii PPA, mecanismele de transmitere a acesteia și strategiile necesare de prevenire și control. Faza inițială presupune colectarea de date prin intermediul programului de supraveghere, cuprinzând informații privind debutul simptomelor, incidența bolii și mortalitatea în rândul populației de porci domestici dintr-o fermă specifică sau populația de mistreți din apropierea focarului, precum și starea clinică a porcilor afectați. Pe baza unei evaluări aprofundate a datelor colectate, echipa de epidemiologie clasifică și sintetizează aceste informații, identificând ulterior discrepanțele și formulând concluzii cu privire la potențialii factori cauzali pentru transmiterea bolii sau elementele de risc asociate. În cele din urmă, propune și execută strategii prin măsuri de intervenție menite să reducă diseminarea ulterioară a bolii și să informeze fermierii, vânzătorii și publicul mai larg cu privire la semnificația comportamentului lor în legătură cu propagarea bolii. Protocoalele de eradicare sunt instituite de echipa CIT ca urmare a confirmării oficiale a bolii PPA în laborator, necesitând eutanasia imediată a tuturor porcilor.

CLCB are obligația de a stabili un perimetru de protecție de 3 km în jurul focarului PPA și va dispune sacrificarea tuturor porcilor din incinta afectată, care vor fi plasați sub supraveghere veterinară oficială pentru a

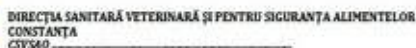
atenua orice potențial de transmitere virală. Procedurile de prelevare de probe se execută la toți porcii în momentul eutanasiei, în conformitate cu Manualul operațional pentru pesta porcină africană (Terrestrial Code Online Access, n.d.) pentru a stabili modul de introducere a virusului în fermă și pentru a determina durata prezenței acestuia înainte de notificarea bolii. Eliminarea carcaselor și a tuturor materialelor periculoase rezultate din focar se efectuează printr-o metodă alternativă de neutralizare, în special prin îngropare într-o locație selectată de Agenția pentru Protecția Mediului Constanța (APM), Administrația Bazinului Apelor Litoral Dobrogea (ABADL) și Administrația Județeană Autonomă a Apelor (RAJA). Se instituie măsuri complete de curățare și dezinfectare mecanică, alături de incinerarea tuturor surselor de contaminare. Se stabilesc măsuri adecvate de dezinfectare la intrările în fermă și în grajduri. Se efectuează o cartografiere cuprinzătoare a tuturor spațiilor din zona de protecție. Intrarea sau ieșirea animalelor din orice specie din și/sau în zona de protecție este strict interzisă. Probele sunt prelevate atât de la animale bolnave, cât și de la animale decedate și expediate la laborator pentru confirmare. Aceste probe urmează să fie colectate, înregistrate, procesate statistic și datele fiind ulterior utilizate în eforturile de control și eradicare pentru PPA. Aglomerările de animale din toate speciile, inclusiv târguri, expoziții, circuri etc., sunt interzise în mod expres. Aplicarea măsurilor în zona de protecție va persista până la finalizarea protocoalelor de curățare și dezinfectare în incinta infectată. Toți porcii localizați în toate exploatațile din zona de protecție vor fi supuși evaluărilor clinice și de laborator pe o durată de 45 de zile. După finalizarea acestor proceduri și confirmarea absenței bolii, restricțiile vor fi ridicate.

Zona de supraveghere a PPA este stabilită pe distanța de 10 km în jurul focarului de PPA și se efectuează o cartografiere a tuturor exploataților din zona de supraveghere. Furnizarea de informații și educația crescătorilor trebuie asigurată.

Proprietarii de animale sunt mandatați să efectueze o evaluare clinică pasivă a porcilor lor și sunt obligați să raporteze orice modificare a stării de sănătate a acestor animale medicului veterinar oficial desemnat. Deplasarea animalelor domestice în afara zonei de supraveghere este strict interzisă, cu excepția porcilor desemnați pentru sacrificare și a celor care au primit autorizația autorităților veterinare locale. Aglomerările de animale din toate speciile în contextul târgurilor și expozițiilor de animale este interzisă în mod expres. Orice porc decedat sau bolnav dintr-o anumită exploatație trebuie raportat prompt medicului veterinar oficial, care va iniția investigațiile necesare în conformitate cu protocoalele delimitate în Manualul operațional pentru pesta porcină africană (Terrestrial Code Online Access, n.d.). Comunicarea cu direcțiile și filialele județene de silvicultură ale Asociației Județene a Vânătorilor și Pescarilor Sportivi (AJVPS) cu privire la prevederile CNCB este esențială. Se evaluează cuantificarea și delimitarea zonelor locuite de mistreți pentru a evita orice interacțiune cu zona de supraveghere.

În contextul operațiunilor la scară mică, cum ar fi gospodăriile private, procesul de repopulare este prefăcut de introducerea porcilor santinelă care au avut un test negativ pentru anticorpi PPA sau provin din exploatații care nu sunt afectate de restricțiile privind PPA. Porcii santinelă sunt distribuiți strategic în întreaga exploatație, în conformitate cu dispozițiile stabilite de autoritatea veterinară. După o durată de 45 de zile, acești porci vor fi supuși testelor pentru a stabili prezența anticorpilor împotriva virusului PPA, în conformitate cu Manualul operațional pentru PPA (Terrestrial Manual Online Access, n.d.).

În situația în care rezultatele testelor sunt negative, procesul complet de repopulare poate începe. În cazul exploatațiilor comerciale, repopularea porcilor se efectuează în conformitate cu directivele legislative stabilite și este condiționată de repopularea totală a tuturor porcilor proveniți din exploatații care nu sunt supuse restricțiilor PPA. Porcii din efectivul nou populat sunt supuși evaluării serologice în conformitate cu Manualul operațional pentru PPA (Terrestrial Manual Online Access, n.d.). Prelevarea de probe pentru această anchetă se efectuează nu mai devreme de 45 de zile de la sosirea grupului final de porci. Echipa de cercetare, compusă din medici veterinari, utilizează o varietate de surse și metodologii pentru colectarea datelor în domeniu, cu scopul de a investiga și evalua fundalul epidemiologic al bolii. Un chestionar standardizat (Figura 1.) este utilizat pentru a aduna informații precise referitoare la tipul de producție, detaliile proprietarului, numărul de ferme suplimentare deținute de același proprietar, identificarea animalelor și numărul total al fiecărei specii de animale deținute, precum și coordonate geografice și caracteristicile de mediu, cum ar fi fermele vecine sau zonele agricole, precum și rutele primare și secundare și artere conform Manualului Operațional pentru intervenția în focarele de PPA (Manual Operațional Pentru Intervenția În Focarele De Peste Porcină Africană – Editia 4 – 2019 – A.N.S.V.S.A., 2019)



pentru PESTA PORCINĂ AFRICANĂ în exploatarele non-profesionale,
exploatarele comerciale tip A și în exploatarele tip "gospodăria pârdească"
conform Legii nr. 6/2022

Efectuarea în unitate:

Tipul unității: exploatare non-profesională, o exploatare comercială tip A o exploatare tip "gospodăria țărănească" conform Legii nr. 8/2022

Numele și prenume proprietar/detinator de animale

Adresa: Iașiul, comuna localitatea

Nr. telefon Cod exploatare

Coordonate geografice exploatare: Longitudine Latitudine

CIVIAO Numele medic veterinar împuternicit

Medic veterinar oficial care efectuează aneceta epidemiologică

1.1 Soluția exploatare (secen de min)

1.2. Amplasarea exploatareii în localitatea/ zonă cu descrierea principalelor obiective: (exploatareii învecinate cu sau fără animale, terenuri agricole, pădure, drumuri principale și secundare etc)

Coordonate geografice: Longitudine Latitudine

Specie	Bovine	Cabaline	ovine	caprine	păcări	Altele, specificați
Număr animale						

2.1 Certeze minime de binecuvantare

- Amplasarea exploatarei la nivelul localității:

Strategic business cooperation in the Journal Comments
 Gal Pridem, 800111, November 04-05, 2007, Rev. 0541, 125, 114
 E-mail: gal@pau.com.br, gal@pau.com.br, Web: www.pau.com.br



- La intrarea în perimetrul adăpostului cu porcine se asigură schimbarea încălțămintei Da o Nu o;
- La intrarea în perimetrul adăpostului cu porcine există facilități pentru a se asigura spălarea mâinilor Da o Nu o;
- La intrarea în adăpostul de porcine există un desinfector pentru dezinfectia încălțămintei Da o Nu o;
- Dacă da, substanța folosită (ex. ver cloros, alți substanțe virucide)

2.2 Se practică înzămănțarea artificială/naturală. Da = Nu =
dacă da, detaliați (numele și adresa înzămănătorului, sursele materialului pominal/sursele vierului, data înzămănțării)

2.3 În cazul efectuării montei/încălzirii artificiale de stabilire a stabilității
vinului/încălzătorului în ultimele 30 de zile înainte de cupciune/apartia primelor semne de
boala

2.4 În cazul achiziționării/vânzării de porcine, menționați ce mijloace de transport au fost folosite, numărul de înmatriculare a mijlocului de transport

2.5 Site aspects related to biocentrism

2.6 În ultimele 30 de zile înainte de suplicione/aparitia primelor semne de boala au existat:

- turta intrării cărții sau produselor din carne de porc Da = Nu =

Deși de multe ori este prezentat

- Dați da, extindeți anchetă epidemiologică cu privire la persoane participante și la surse de aprovizionare cu carne/produse din carne de porc

- au fost efectuate activități de reparații/construcții. Da ☐ Nu ☐
 Dacă da, extindeți ancheta epidemiologică cu privire la persoanele participante și la
 surse de aprovizionare cu materiale folosite

- vizite efectuate de persoane străine în perimetrul adăpostului cu porcine Da o Nu o.
Dacă da, extindeți ancheta epidemiologică la aceste persoane

2.7. Verificare activitate a membrilor familiei sau angajati in:

- mediu silvatic posibil afectat de PPA (vârstitoare, activități de gestionare material lemnos, cuie cluperi/ etc)

- activități agricole
- activități unități industrie alimentară, SNCU, furale, ferme etc.

2.8 Există mistreți pe fondul cinetic din apropiere? $Da = Nu =$

Dați da, când a fost ultima oară depistat un caz pozitiv? Se va menționa ultimul caz pozitiv virologic sau ultimul caz pozitiv serologic și negativ virologic

2.9 Future

- din productie proprie Da
- ☐
- Nu
- ☐

Gracia Soto and Margaret M. M. Austin, Germany
 Carl-Friedrich Wolff, Germany
 E-mail: gracia.soto@uni-erlangen.de, margaret.austin@uni-erlangen.de
 Web: www.uni-erlangen.de



Tăci de, amplasare tarla/coră cultivată (au fost observate urme de porci sălbatici)

3.10.2 Date de identificare ale porcinelor în conformitate cu Regulamentul delegat (UE) 2019/2005 (se va anexa un raport al exploatarei din BND extras la data suspingerii bolii/anchetei pentru perioadă de cel puțin un an și jumătate în urmă).

3.11 Verificarea evidențelor exploatarei

3.11.1 Verificarea coerenței inventarului menționat la punctul 3.10 cu constatările din exploatare:

(de menționat dacă și care sunt neconcordanțele constatate)

3.11.2 Verificarea coerenței dintre instalațiile din BND și cele existente în teren

3.11.3 Verificarea intrărilor în BND de porcine, cu minim 30 zile retroactiv de la data suspingerii/apărții primelor semne de boală, se va menționa originea acestora

3.11.4 Verificarea ieșirilor din BND de porcine, cu minim 30 zile retroactiv de la data suspingerii/apărții primelor semne de boală, se va menționa destinația acestora

3.11.5 Verificarea evenimentelor cu privire la sacrificarea Conșun Progru de porcine, cu minim 30 zile retroactiv de la data suspingerii/apărții primelor semne similare, se va menționa motivul sacrificării

3.11.6 În cazul evenimentelor menționate la pct. 3.11.5, se va menționa destinația cîrmii

3.11.7 Verificarea evenimentelor constatate la nivelul exploatarei și care nu au fost înregistrate în BND, detalierea acestora

3.11.8 În cazul porcinelor prezente în exploatare și neînregistrate de stabilit originea lor și perioada introduselor lor în exploatare

3.11.9 Data ultimei vizite și scopul acesteia efectuată de către HVLUP/personal sanitar (conf. declarației personalului sanitar veterinar, registrul consultații și tratamentelor, BND cu privire la identificarea animalelor din exploatare în cazul acțiunilor sanitare veterinare obligatorii, etc)



3.11.10 Ce alte exploatare de porcine au fost vizitate de personal sanitar veterinar care a vizitat exploatarea controlată în ultimele 30 de zile anterioare suspingerii bolii?

4. Confirmarea PPA

4.1 Confirmarea s-a făcut la data de pe baza buletnului nr. data teste efectuate

4.2 Modul de gestionare al cadavrelor s înmormântare, unitate și îngropare

4.3 Puncte de depozitare a carcasei primelor semne clinice Da o Nu o

4.4 Numărul și categoria porcilor uciși/morți

4.5 Reperele afecțiunii/scurtarea carnea, organe, mase gastrointestinale
Da o Nu o, dacă da se specifică și care este destinația acestora?

4.6 Tratamentul efectuat în ultimele 30 zile (se va menționa tratamentul, medicamente administrate (a se menționa denumirea produselor utilizate, data/perioada efectuării tratamentului)

4.7 Numărul porcilor după tratamentul

4.10 Simptomatologie și diagnostic clinic corectat în registrul de consultații și tratamente

5. Perioada Risk Cessus - PRC stabilită:

Data probabilității de introducere a virusului PPA în exploatare:

Data Data Data anchetei Momentul cel Momentul cel
suspectării confirmării epidemiologice mai îndepărtat mai apropiat

Perioada probabilității de timp scurs de la apariția PPA

6. Ipoteze privind originea probabilității de boală și a infecțiilor de răspândire:

6.1 Legătura cu porcine deținute, unități și activități epidemiologice din cadrul acestora, structura din sursele alimentare sau al furajelor, unitățile producătoare de subproduse de origine animală sau orice alte amplasamente în care animalele din spina lăsată pentru boala lăsată suspectată ar fi putut fi infectate



Ipoteză	Constatări	Probabilitate * Exclus/Mică/Medie/Mare
Legătură epidemiologică cu o altă unitate (exploatare porcine, etc), prin:		
- Circulația porcinelor (achiziție/vânzare porcine, mișcarea temporară a porcinelor în vederea reproducției)		
- Circulația persoanelor		
- Activități sanitare veterinare (tratamente, intervenții chirurgicale)		
- Activități de identificare și înregistrare animale		
- Activități de inseminare artificială		
- Produse de origine animală		
- Subproduse de origine animală		
- Mijloace de transport		
- Fecale posibile contaminate		
- Utilaje/ Echipamente		
- Așternut		
- Altele		

6.2. Legătură cu porcinile sălbatice (mediul sălbatic)

Ipoteză	Constatări	Probabilitate * Exclus/Mică/Medie/Mare
Legătură epidemiologică prin:		
- Contactul porcinelor deținute cu mistreții		
- Produse provenite de la mistreții poștivi		
- Vânători		
- Persoane care efectuează activități de gestionare a materialului lemnos		
- Persoane care efectuează activități în mediul silvatic (cules ciupercii, fructe de pădure, etc)		
- Activități agricole		
- Cadavre mistreți incorect gestionate		
- Altele		

Strada Ștefaniei Măgurelei nr. 79 - Județul Constanța
Cod Poștal 900111, Telefon: 0241.652.4117, Fax: 0241.652.118
E-mail: scos@scos.ro Web: www.scos.ro

Page 7 din 8



7. Concluzii:

Originea probabilită a bolii: _____
Mijloacele de răspândire: _____

Perioada probabilită de timp scurs de la apariția bolii PPA/data probabilită a introducerii virusului în exploatare: _____

Unică și unitate epidemiologică din cadrul acestora, orice alte angajamente în care porcinile pentru boala suspectată ar fi putut fi infectate: _____

Mijloace prin care agentul patogen s-ar fi putut răspândi pe durata perioadei relevante de dinaintea notificării suspiciunii sau confirmării PPA: _____

Medici veterinar oficiali care au efectuat ancheta epidemiologică
Nume și prenume/semnătura

Responsabil specie
Nume și prenume/semnătura

Șef serviciu SCOSA
Nume și prenume/semnătura

Director/director adj.
Nume și prenume/semnătura

Strada Ștefaniei Măgurelei nr. 79 - Județul Constanța
Cod Poștal 900111, Telefon: 0241.652.4117, Fax: 0241.652.118
E-mail: scos@scos.ro Web: www.scos.ro

Page 8 din 8



Figura 1. Model Ancheta Epidemiologică pentru PPA în exploatațiile non-profesionale. Exploatațiile comerciale de tip A și în exploatațiile de tip gospodăresc conform (conține 8 pagini).

Ancheta epidemiologică se concentrează pe 30 de zile înainte de primele semne ale bolii sau suspiciune a boli. Sunt colectate și date atunci când proprietarul utilizează înseminarea artificială, data la care a avut loc inocularea, numele și adresa furnizorului de material seminal și trasabilitatea donatorului.

Date privind intrarea produselor și subproduselor din carne contaminate în fermă, dacă se confirmă, proprietarul trebuie să furnizeze detalii despre proveniență și astfel ancheta epidemiologică trebuie să se extindă și astfel sunt înregistrați toți participanții și sursa principală a aprovizionării cu carne și produse din carne contaminate. Verificările activităților desfășurate în fermă se efectuează asupra tuturor angajaților sau membrilor familiei, cum ar fi activitățile de întreținere a grajdurilor, activități de vânătoare, tăierea lemnului sau culesul ciupercilor, activitățile agricole ce asigură hrana pentru animale, interacțiunea cu alte ferme.

În situația în care ferma se află în apropierea unui fond de vânătoare confirmat pozitiv pentru PPA, se înregistrează când a fost confirmat ultimul caz pozitiv prin metoda Real Time PCR sau ELISA și când a fost ultimul test negativ folosind aceleași metode de analiză. În ceea ce privește hrana pentru animale, proprietarul trebuie să precizeze dacă utilizează în acest caz cereale provenite din producția proprie și dacă a observat urme de mistreț pe terenul său agricol. În situația în care proprietarul achiziționează hrana, se înregistrează data achiziției, sursa, plăcuța de înmatriculare a vehiculului utilizat pentru transport și toate livrările către alte ferme de porci cu 30 de zile înainte de primele semne clinice din care apare debutul PPA. De asemenea se înregistrează dacă porcii au fost hrăniți cu resturi din bucătărie și dacă nu au fost tratate termic. În ce privește așternutul folosit (paie) se înregistrează dacă a fost depozitat cu cel puțin 90 de zile înainte de izbucnirea epidemiei.

5.1.2 Analiza statistică

Pentru prelucrarea statistică a datelor de studiu, a fost utilizată IBM SPSS Software Descriptive Statistics for Windows, versiunea 29.0. (versiune de încercare de 30 de zile) Armonk, NY: IBM Corp. Datele nominale au fost prezentate ca frecvență absolută și procent, iar variabilele continue au fost exprimate ca deviație medie și standard. O valoare a coeficientului de semnificație statistică $p < 0,05$ a fost considerată semnificativă.

5.1.3 Analiza geografică

Trasarea focarelor de PPA pe hartă s-a făcut prin utilizarea imaginilor Sistemului Informațional Geografic pe Google Earth Pro care permite integrarea datelor de longitudine și latitudine colectate de echipa de epidemiologie cu informații spațiale. Conținutul hărții include dispunerea fizică a terenurilor, orașelor, drumurilor, frontierelor vamale și localizarea exactă a focarelor PPA obținute prin longitudine și latitudine pentru a prezice apariția focarelor PPA și pentru a genera ipoteze privind posibila asociere între factorii de risc, cum ar fi porcii mistreții și intervenția umană în transmiterea bolii.

Metodele de laborator utilizate pentru confirmarea focarelor de PPA au fost Real Time PCR pentru detectarea genomului virusului PPA și supravegherea serologică pasivă prin utilizarea unui antigen de testare pentru detectarea anticorpilor PPA în proba de ser sangvin.

5.2 Metoda de analiză pentru examene genetice prin testul de virus secvențiere și analiză filogenetică

Pentru identificarea tulpinii circulante de PPA în zona investigată, s-a efectuat secvențierea ampliconilor (produșilor PCR) obținuți după extragerea și purificarea ADN-ului (etapă detaliată în capitolul 5.3) a zece probe pozitive de porci domestici și mistreți.

5.3 Metoda de analiză pentru examenul virusologic prin metoda de identificarea genomului virusului PPA folosind metoda Reacției în lanț a polimerazei în timp

Real qPCR

Reacția în lanț a polimerazei se bazează pe folosirea într-un amestec de reacție a eluatului (ADN șablon), polimerază ADN termostabilă, primeri și cei patru trifosfați dezoxiribonucleozide (dNTPs) în exces într-o soluție tampon. Tuburile care conțin amestecul de reacție sunt supuse unor cicluri repetitive la temperaturi diferite, de 40 de ori în interiorul blocului de încălzire al unui sistem termo-block precum Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA)/ sau CFX96 Touch System Real – Time PCR (Bio-Rad, USA) Aparatul permite stabilirea duratei și succesiunea ciclurilor de etape de temperatură.

Obținerea valorilor CT. Reprezintă acel ciclu în care semnalul fluorescent al reacției traversează linia de prag (threshold). Valoarea CT este invers proporțională în raport cu cantitatea de pornire a țintei ADN, în concluzie,

cantitatea ADN-ului scade iar valoarea CT va crește. Threshold-ul Real Time PCR reprezintă nivelul unui semnal fluorescent care reflectă o creștere semnificativă peste semnalul baseline calculat. Threshold-ul este menit să distingă semnalele de amplificare relevante de background (zona de zgomot) acesta este setat automat de către soft-ul instrumentului Real Time PCR la o valoare de zece ori înmulțit cu deviația standard a valorii de fluorescență a baseline-ului. Threshold-ul este reprezentat de o linie orizontală în graficul de amplificare ce este setat acolo unde curbele de amplificare sunt drepte și paralele una față de cealaltă și unde precizia replicatelor este cea mai ridicată. În Figura 2. se observă valorile CT obținute în timpul analizei probelor pozitive.

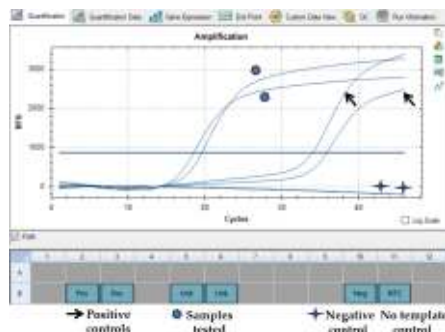


Figura 2. Graficul de amplificare PCR în timp real care evidențiază două probe testate pozitiv pentru infecția cu PPA. Unk: probe testate; Pos: martori pozitivi (referință tulpină BA71VR); Neg: martor negativ (proba de apă); NTC: martor negativ (conține doar Master Mix).

5.3.4 Echipamente

Analiza fazelor de amplificare

Amplificarea a fost efectuată pe doua aparate și anume prin utilizarea Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR folosind software-ul 2.4 (Figura 3) și Bio Rad CFX96 Touch System Real-Time PCR folosind software-ul CFX Maestro 2.3 (Bio-Rad, SUA) (Figura 4) ambele aparate utilizează reacția în lanț a polimerazei pe bază de fluorescență pentru a oferi detectarea cantitativă a secvențelor de acid nucleic folosind analiza în timp real. A fost utilizat următorul profil termic: denaturare inițială timp de 2 min la 95 °C(1 ciclu) urmată de 45 de cicluri timp de 10 s la 95°C, alinierea a primerilor timp de 15 s la 58°C și extensia lor timp de 45 s la 60°C. Plăcile au fost citite cu filtrul FAM activat la sfârșitul prelungirii celor 45 de cicluri. Rezultatul a fost considerat negativ pentru valorile CT ≥ 39 (Anghel et al., 2022).



Figura 3. Echipament de amplificare 7900HT Fast Real-Time PCR Applied Biosystems.



Figura 4. Echipament de amplificare CFX96 Touch System Real-Time PCR Bio Rad.

5.4 Metoda de analiză pentru examenul serologic folosind metoda de detecție a anticorpilor anti-virus PPA prin tehnica imuno-enzimatică ELISA

5.4.4 Echipamente

Metoda ELISA a fost utilizată pentru detectarea anticorpilor antivirus PPA prin tehnica imunologică indirectă. Probele de plasmă și ser au fost analizate folosind kitul ID VET și cititorul ELISA Ledetect 96 Led

Based; Channel Microplate Reader Austria (Figura 5). Multi-antigen indirect ELISA Kit- ID Screen African porcine pesta porcină Testul indirect de screening (Louis Pasteur- Grabels, Franța) a fost utilizat pentru detectarea anticorpilor împotriva P32, P62 și P72 ai PPA (sensibilitate, 99% corespondență cu OIE ELISA și specificitate – corespondență 100% OIE ELISA).



Figura 5. Echipament de citire Ledetect 96 Led Based Channel Microplate Reader Austria.

5.5 Metoda de analiză pentru examenul hematologic prin analiza constituentilor din sânge pe EDTA la animalele testate pozitiv pentru virusul PPA

Studiul s-a efectuat într-o gospodărie, în care cu o zi înainte s-a confirmat un focar de PPA prin metoda Real Time PCR, pe un grup de 15 porci domestici (*Sus Scrofa Domesticius*) compus din 14 porci tineri în vârstă de 6 luni și o scroafă în vârstă de 18 luni. Porcii erau găzduiți în patru țarcuri dispuse linear și despărțite printr-un gard metalic tip plasă. Primul grup compus din 3 porci (o scroafă și doi purcei) care prezentau semne clinice critice febră (41°C) și decubit prelungit deplasându-se doar asistat, al doilea grup compus din 5 porci prezentau dezorientare, lipsa poftei de mâncare și ataxie intermitentă, al treilea grup era compus din alți 4 porci cu mobilitate redusă și lipsa poftei de mâncare iar al patrulea grup format din 3 porci care nu prezentau semne clinice de boală. Acești porci ce au fost în cele din urmă eliminați în conformitate cu legislația europeană și națională privind bunăstarea și îngrijirea animalelor. Grupul control negativ reprezentat de 5 porci, toți în vârstă de 9 luni, dintr-o altă fermă care nu prezentau semne clinice asociate nici unei boli cunoscute.

Probele de sânge pe EDTA au fost analizate la clinica Quick Vet, Constanța la interval de 6 ore de la recoltare cu ajutorul unui analizor automat de hematologie veterinară (URIT – 3000Plus) producător fiind Urit Medical Electronics pentru determinarea celulelor albe totale din sânge (WBC), volumul mediu de trombocite (MPV), celulele roșii din sânge (RBC), concentrația hemoglobinei (HGB), hematocritul (volumul relativ al eritrocitelor HCT), volumul corpuscular mediu (MCV), hemoglobina medie corpusculară (MCH), concentrația medie de hemoglobină corpusculară (MCHC), distribuția celulelor roșii din sânge (RDW_CV). Toate rezultatele au fost comparate cu referințele calibrate ale analizorului URIT-3000Plus pentru *Sus scroafă domestica*.

Probele de plasmă și ser au fost analizate la laboratorul de serologie din cadrul DSVSA Constanța pentru detectarea anticorpilor anti-virus pesta porcină africană prin tehnica imunoenzimatică (ELISA) folosind Kit ID Screen African Swine Fever Indirect Screening Test și pentru citirea plăcilor a fost utilizat și cititorul ELISA- Ledetect 96 Led Based, Channel Microplate Reader.

5.5.4 Echipamente

Pentru a analiza probele, am folosit un analizor de hematologie URIT-3000Plus URIT Medical Electronic (Figura 14) și un cititor ELISA- Ledetect 96 Led Based, Channel Microplate Reader pentru detectarea anticorpilor anti-virus PPA prin tehnica imunoenzimatică (ELISA) (Figura 13).



Figura 6. Echipament analizor automat de hematologie URIT-3000Plus URIT Medical Electronic.

CAPITOLUL 6

EXPERIMENTE PROPRII

6.1 STUDIUL EPIDEMIOLOGIC AL EVOLUȚIEI PPA ÎN AREALUL JUDEȚULUI CONSTANȚA

(Anghel et al., 2025)

Prevenirea și controlul virusului PPA este dificilă datorită ușurinței cu care acesta se răspândește, rezistența la condițiile de mediu dar mai ales lipsa unei imunoprofilaxii eficiente, acest lucru afectează economia țării datorită pierderilor din comerț și a producției de suine prin punerea în aplicare a strategiilor de control drastice și costisitoare pentru eradicarea bolii. La nivel mondial la ora actuală conform Raportului de autodeclarare a bolii PPA către Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (WOAH) singura țară indemnă de PPA este Belgia și conform aceluiași raport două țări din Europa au raportat noi evenimente PPA, în timp ce nouă țări din Europa și-au actualizat situația PPA ca fiind în curs de evoluție (Self-Declared Disease Status – World Organisation for Animal Health, n.d). Nu a fost raportat niciun focar nou 2025 de către țări din America, Asia, Africa sau Oceania.

În ciuda faptului că PPA este una din bolile virale studiate de mai bine de 100 de ani (Penrith și Kivaria, 2022) aceasta continuă să provoace pierderi economice semnificative ce pot fi prevenite doar prin înțelegerea cât mai aprofundată a modului de distribuție a virusului PPA, pentru a direcționa cât mai eficient metodele de control a boli.

6.1.1 Scopul studiului

În studiul actual am investigat evoluția a unui număr total 93 de focare PPA confirmate pe teritoriul județului Constanța prin testarea unui număr total de 3085 de probe colectate, de la animale susceptibile la boală, pe perioada 2018- 2023. Am analizat arealul geografic în zona de vest a județului unde am găsit un număr de 35 de focare la mistreți și astfel putem să previzionăm că focarele de PPA s-au răspândit și în alte zone datorită traseului mistreților prin migrarea lor dinspre Delta Dunării către zona (vestică) forestiera a județului Constanța (Actualizarea Situației Privind Evoluția Pestei Porcine Africane (PPA)- ANVSA., 2023).

Am realizat o analiză a curbei epidemiologice pentru a deduce unde și când a avut loc distribuția bolii în județ și am concluzionat că în unele regiuni cel mai probabil mod de răspândire a epidemiei îl reprezintă porcii mistreți ce sunt considerați rezervorul principal de boală însă urmărind mapa geografică a focarelor putem observa și zone în care virusul ar fi putut fi transmis de interacțiunea om animal.

Începând cu data de 05 iulie 2018, a fost confirmată pentru prima dată în județul Constanța într-o gospodărie privată din provincia Istria. Cazul index descris în timpul anchetei a fost o scroafă gestantă găsită moartă în grajd. În urma notificării medicului veterinar oficial din zona afectată, probele au fost recoltate și trimise la laboratorul de biologie moleculară DSVSA Constanța pentru analize Real Time PCR, la care s-au obținut rezultate pozitive pentru PPA. Zona afectată a fost pusă sub supraveghere oficială, în conformitate cu măsurile de control stabilite de Manualul operațional al PPA (Terrestrial Code Online Access, n.d.).

Ulterior în data de 11 iulie 2018, a fost confirmat un al doilea focar PPA când alți șaptesprezece porci au murit într-o exploatare de tip gospodărie privată din localitatea Cheia, la aproximativ 32 km de Istria. Acțiunii de restricție și supraveghere a fost luate în ambele focare pentru a se conforma cu At. 5 din UE 429/2016 cu completările și modificările ulterioare (Regulament-2016/429-RO-EUR-Lex,n.d.) și în conformitate cu UE 1099/2009 cu completările și modificările ulterioare(Regulamentul (CE) nr. 1099/2009 al Consiliului din 24 septembrie 2009 privind protecția animalelor în momentul uciderii, 2009) privind metoda de ucidere și protecția animalelor. Astfel animalele, produsele și deșeurile pot fi distruse prin metode de îngropare și ardere într-o locație aprobată. În timpul uciderii, procedurile stricte de biosecuritate au fost urmate prin pulverizarea carcaselor, țesuturilor, sângelui, adăpostului și curții cu dezinfectant. Au fost implementate măsuri de prevenire a răspândirii virusului PPA prin restricționarea animalelor, vehiculelor și echipamentelor la și de la focar și stabilirea zonei de protecție (3 km) și a zonei de supraveghere (10 km) (Figura 7). În ciuda eforturilor de izolare a fiecărui focar, până la sfârșitul anului 2023 au fost notificate 164 de focare PPA (atât la porcii domestici cât și mistreți)

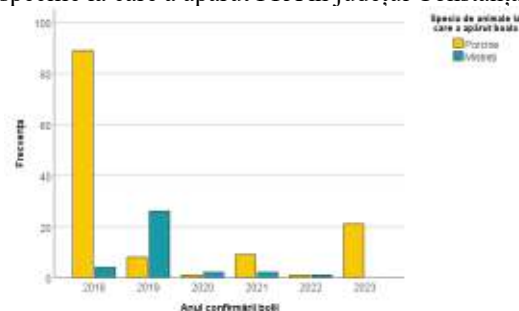


Figura 7. Zonele de protecție și supraveghere ale primului caz de PPA în Istria măsoară minimum 3 km, respectiv 10 km.

A fost utilizată o curbă epidemiologică pentru a identifica modul în care a fost transmis virusul PPA. Curba indică 93 de noi focare de PPA declarate în 2018 (din totalul de animale bolnave 254 de porci și 4 mistreți), urmate de o scădere, ajungând la 34 de focare de PPA în 2019 (din totalul de animale bolnave 19 porci și 50 de mistreți) și la 3 focare de PPA în 2020 (din totalul de animale bolnave 4 porci și 2 mistreți). În 2021, au fost confirmate 11 focare PPA (din totalul de animale bolnave 62 porci și 2 mistreți); în 2022, au fost confirmate doar 2 focare de PPA (din totalul de animale bolnave 4 porci și 1 mistreț), urmate de 21 de focare de PPA confirmate în 2023 (din totalul de animale bolnave 38 de porci) (Tabelul 1 și 4; Grafic 1). Acest grafic arată o tendință epidemică propagată, deoarece nu există o sursă comună de infecție. Progresul PPA este reprezentat de numărul mare de cazuri confirmate de porci domestici în 2018. Un număr mare de notificări la mistreți și porci domestici a fost confirmat în 2019, 2020 și 2021. Cu toate acestea, în 2023, nu au fost raportate cazuri de PPA la mistreți.

An	Porc		Mistreț		Total
	Număr	Procentaj (%)	Număr	Procentaj (%)	
2018	89	95.7	4	4.3	93
2019	8	23.5	26	76.5	34
2020	1	33.3	2	66.7	3
2021	9	81.8	2	18.2	11
2022	1	50	1	50	2
2023	21	100	0	0	21

Tabelul 1. Anul confirmării și speciile la care a apărut PPA în județul Constanța.



Grafic 1. Reprezentarea grafică a speciei de animale la care a apărut PPA pe fiecare an.

Distribuția anuală a PPA a confirmat focarele pe specii în care a apărut boala.

Hărțile de mai jos indică locația focarelor confirmate de PPA în județul Constanța în fiecare an. Un număr mare de focare au fost identificate în anul 2018 atât la porci domestici din gospodăriile private dar și la mistreți (Figura 8 a) urmând o descreștere a numărului de focare înregistrat în anul 2019 (Figura 8 b).



(a)



(b)

Figura 7. Harta distribuției în timp a virusului PPA în județul Constanța: (a) Punctele etichetate cu litera H de culoare albastră indică locația focarelor de PPA mistreț și punctele etichetate cu 1 în culoarea portocalie indică locația creșterii tradiționale a porcilor cu focare confirmate de PPA în 2018; (b) Punctele etichetate cu litera H de culoare albastră indică locația focarelor de PPA de mistreț, iar punctele etichetate cu 2 de culoare portocalie indică locația creșterii tradiționale a porcilor cu focare confirmate de PPA în 2019.



(c)



(d)

Figura 7. Harta distribuției în timp a virusului PPA în județul Constanța: (c) Punctele etichetate cu litera H de culoare albastră indică locația focarelor de mistreți 2020 și punctele etichetate cu litera C în culoarea violet indică locația focarelor de mistreți 2021. Punctele etichetate cu 3 în culoarea verde închis indică locația creșterii tradiționale a porcilor cu focare confirmate PPA 2020 și punctele etichetate cu 4 în culoarea verde deschis indică locația creșterii tradiționale a porcilor cu focare PPA confirmate 2021; (d) Punctele etichetate cu litera H de culoare albastră indică locația focarelor de mistreți în 2022, iar punctele etichetate cu 5 în culoarea roșie indică locația creșterii tradiționale a porcilor cu focare confirmate de PPA 2022, iar punctele etichetate cu 6 în culoarea verde indică locația creșterii tradiționale a porcilor cu focare confirmate PPA 2023.

Toate cazurile confirmate de PPA au apărut la porcii domestici crescuți în sistem gospodăresc privat. Analiza statistică a confirmat că au fost identificate mai multe focare de PPA la porcii domestici în august (54 de focare), iulie (26 de focare), astfel putem să concludem că focarele de PPA apar în timpul verii datorită mistreților care devin dependenți de zonele cu apă (râuri, iazuri) dar și de umbră, condiții asigurate de păduri, în încercarea de a face față temperaturilor ridicate și a resurselor reduse de hrană. Dar și în luna septembrie (22 de focare) o dată ce hrana devine mai abundentă mistreții fiind atrași de câmpurile agricole unde se pot hrăni cu cereale. Un alt aspect luat în considerare a fost și perioada de împerechere a mistreților noiembrie – decembrie în care datele noastre statistice arată în noiembrie (4 mistreți pozitivi PPA), în luna decembrie (5 mistreți pozitivi PPA) și ianuarie – aprilie în februarie au fost cei mai mulți mistreți confirmați cu PPA (7 mistreți pozitivi PPA) (Tabelul 2).

Luna	Focare de porcine		Focare de mistreți	
	Număr	Procentaj (%)	Număr	Procentaj (%)
Ianuarie	3	2.32	3	8.57
Februarie	2	1.55	7	20
Martie	4	3.1	5	14.2
Aprilie	3	2.32	2	5.7
Mai	0	0	4	11.4
Iunie	1	0.77	0	0
Iulie	26	20.1	0	0
August	54	41.8	0	0
Septembrie	22	17	3	8.57
Octombrie	7	5.42	2	5.7
Noiembrie	6	4.6	4	11.4
Decembrie	1	0.77	5	14.2
Total	129	100	35	100

Tabelul 2. Lunile în care au fost confirmate focare de PPA în județul Constanța.

Animale ucise și distruse.

Un total de 1985 de animale au fost ucise și distruse: 1406 în 2018, 134 în 2019, 70 în 2020, 107 în 2021, 16 în 2022 și 252 în 2023(Tabelul 3)

Specii de animale la care a apărut boala	An	Numărul de focare	Total animale ucise	Media	Abaterea standard	Minim	Maxim
Porc	2018	89	1403	15.76	24.088	0	123
	2019	8	100	12.50	20.771	0	63
	2020	1	68	68.00	0	68	68
	2021	9	105	11.67	13.029	0	37
	2022	1	15	15.00	0	15	15
	2023	21	252	12.00	15.238	0	57
Mistreț	2018	4	3	0.75	0	0	2
	2019	26	34	1.31	1.408	0	5
	2020	2	2	1.00	0	1	1
	2021	2	2	1.00	0	1	1
	2022	1	1	1.00	0	1	1

Tabelul 3. Animale ucise și distruse.

A fost utilizată o curbă epidemiologică pentru a identifica modul în care a fost transmis virusul PPA. Curba indică 93 de noi focare de PPA declarate în 2018 (din totalul de animale bolnave 254 de porci și 4 mistreți), urmate de o scădere, ajungând la 34 de focare de PPA în 2019 (din totalul de animale bolnave 19 porci și 50 de mistreți) și la 3 focare de PPA în 2020 (din totalul de animale bolnave 4 porci și 2 mistreți). În 2021, au fost confirmate 11 focare PPA din totalul de animale bolnave (62 porci și 2 mistreți); în 2022, au fost confirmate doar 2 focare de PPA (din totalul de animale bolnave 4 porci și 1 mistreț), urmate de 21 de focare de PPA confirmate în 2023 (din totalul de animale bolnave 38 de porci) (Tabelul 1 și 4; Grafic 1). Se observă o menținere a curbei epidemiologice, diferența dintre ani în ceea ce privește numărul de focare, numărul de animale susceptibile și numărul de animale bolnave la data declarării nu este semnificativă din punct de vedere statistic, după cum arată rezultatele testului Kruskal-Wallis de mai jos (Tabelul 7), atât pentru porci, cât și pentru mistreți.

Cu toate acestea, în cazul porcilor, există o diferență semnificativă în ceea ce privește numărul de animale bolnave confirmate de la începutul epizootiei în perioada analizată 2018-2023.

Deoarece testul Kruskal Wallis nu ne spune în ce ani diferențele sunt semnificative din punct de vedere statistic, am comparat anii doi câte doi aplicând testul Mann-Whitney U și ajustând pragul de semnificație în funcție de numărul de comparații (15 în cazul nostru), astfel încât $p = 0,05/15 = 0,003$.

Specii de animale la care a apărut boala	Metoda de analiză	Numărul focarelor	Animale sensibile	Animale bolnave la momentul declarării bolii	Animalele bolnave confirmate de la începutul bolii epizootice
Porc	Kruskal-Wallis H	0,000	4,154	4,952	14,982
	Df	5	5	5	5
	Asimp. Sig.	1,000	0,527	0,422	0,010
Mistreț	Kruskal-Wallis H	0,000	4,673	7,430	7,790
	df	4	4	4	4
	Asimp. Sig.	1,000	0,323	0,115	0,100

Tabelul 3. Analiza statistică a datelor colectate pe perioada 2018 până în 2023.

Au existat diferențe semnificative în ceea ce privește numărul de animale bolnave confirmate de la începutul epidemiei între 2018 și alți ani (2019, 2020, 2021, 2022, 2023).

Cu toate acestea, în perioada 2019-2023, nu se observă diferențe semnificative statistic în ceea ce privește numărul de animale bolnave confirmate de la începutul epizootiei.

Bazându-ne pe o bună funcționare a serviciului sanitar veterinar, ar trebui să putem eradica PPA la porcii domestici la nivel de fermă. Având în vedere că toate măsurile sunt luate într-o fermă cu PPA și urmați toți pașii pentru eradicarea acestei boli înainte de a fi transmisă unei ferme vecine. După cum sa menționat, este o boală lentă în comparație cu alte boli (febra aftoasă), iar în cazul PPA este timp să se aplice măsurile de eradicare. Pe baza a ceea ce am învățat despre PPA și a cunoștințelor noastre despre epidemiologie, am ajuns la concluzia că este o boală transfrontalieră menținută de către migrația mistreților și întreținută de oameni. Depinde de modul în care oamenii se comportă și cum transportă virusul. În trecut, pentru că nu exista o schemă de compensare pentru fermieri, pe măsură ce pierdeau mulți porci fie că mureau sau începeau să se îmbolnăvească, fermierii au fost tentați să economisească bani prin sacrificarea porcilor bolnavi. Carnea contaminată a fost transportată la distanțe foarte mari. Deci, comportamentul individual este foarte important pentru a controla răspândirea PPA, numai dacă oamenii sunt responsabili și implicați activ putem reuși prin educație în ceea ce privește buna gestionare a fermei, muncitorii, medicii veterinari și tot felul de oameni, astfel încât să prevenim răspândirea bolii.

Este dificil să prevenim PPA în pădure. Bazându-ne pe o bună cooperare cu vânătorii, populația de mistreți este sub supraveghere în privința evoluției bolii în pădure. Vânătorii sunt cei care asigură căutarea carcaselor și este cea mai bună abordare pentru identificarea semnelor clinice de boală, în pădure împreună cu testarea animalelor vâdate pentru PPA. Ca perspectivă pentru viitor, speranțele mari se concentrează pe un vaccin aprobat. Acest lucru va atenua probabil efectul bolii.

Studiul analizează procesarea statistică a datelor colectate dintr-un studiu, utilizând IBM SPSS Statistics for Windows, versiunea 29.0. Analiza se concentrează pe prezentarea datelor nominale ca frecvențe și procente absolute, în timp ce variabilele continue sunt exprimate prin valori medii și abateri standard. Un nivel de

semnificație de $p < 0.05$ este considerat semnificativ statistic, indicând faptul că rezultatele probabil nu se datorează întâmplării.

6.2 EXAMENE GENETICE PRIN TESTUL DE VIRUS, SECVENȚIERE ȘI ANALIZA FILOGENETICĂ

(Anghel et al., 2025) In Press

În ultimi ani se observă o creștere exponențială a numărului rapoartelor de cercetare publicate despre boala PPA și cele mai recente studii de cercetare implică metode de analiză moleculară care permit caracterizarea genetică a virusului PPA. Sunt 24 de genotipuri identificate în Africa. În Europa, genotipul I a fost identificat pentru prima dată în Portugalia în 1957 și s-a răspândit rapid în Spania, Franța, Malta, Belgia, Italia și Țările de Jos (Gaudreault et al., 2020). În 1978, un nou focar de PPA a apărut în Sardinia, Italia (Mur et al., 2016). În Rusia, prezența PPA a fost raportată pentru prima dată în 1977 (Kolbasov et al., 2018). La sfârșitul anilor 1970, virusul a fost identificat în Brazilia (Tokarnia et al., 2004), Cuba (Negrin și Frias Lepoureau, 2002) și Insulele Caraibe (Ruiz Saenz et al., 2022).

Studiul a vizat secvențierea a ampliconilor, de 251 pb al genei B646L a virusului PPA (pozițiile 105,320-105,570; GenBank MN194591.1), care codifică proteina capsidei p72, a fost amplificată folosind un test TaqMan, obținuți din zece probe pozitive pentru PPA din județul Constanța (5 de la porci domestici și 5 de mistreți) colectate din 10 zone de focar și supuse unei analize filogenetice prin comparația referințelor cu secvențele disponibile GenBank de PPA din Europa (România: MK850402, OK623917; Ungaria: MN715134; Republica Cehă: LR722600; Polonia: MH681419; Ucraina: JX857521; Georgia: MH910496; Rusia: JX857510; Lituania: MK628478), asiatică (China, MT332151; Vietnam, MN393476; Coreea de Sud, MN817977) și African (Tanzania: MK276921), au evidențiat asemănări de 100% cu tulpina II a PPA. Arborele filogenetic Neighbor-Join, construit folosind modelul Tajima Nei cu 1000 de replicări bootstrap, a confirmat aceste constatări (Figura 8).

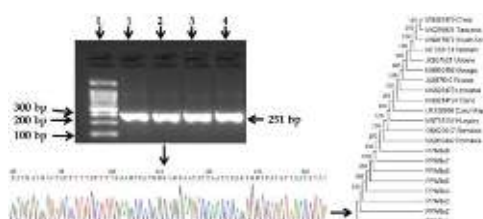


Figura 8. Identificarea tulpinii circulante în județul Constanța a virusului PPA.

Prin metode de diagnostic molecular: electroforeză pe gel de agaroză evidențiind ampliconi PCR de 251 pb obținuți din B646L în probe pozitive pentru VPPA (1-4), scară L-100 bp; Secvențierea cromatogramelor și a arborelui filogenetic al izolatelor PPA din județul Constanța versus izolatele din tulpina II a PPA din alte țări.

6.3 EXAMENE VIRUSOLOGICE PRIN METODA DE IDENTIFICAREA GENOMULUI VIRUSULUI PPA FOLOSIND METODA REACȚIEI ÎN LANȚ A POLIMERAZEI ÎN TIMP REAL qPCR

(Anghel et al., 2022)

Scopul studiului este de a sublinia cât de esențială este supravegherea de rutină a bolii PPA pentru depistarea rapidă a focarelor în județul Constanța demonstrând modul în care monitorizarea continuă permite intervenții în timp util pentru a preveni răspândirea ulterioară. Prin înțelegerea dinamicii infecției cu PPA poate ajuta părțile interesate să implementeze măsuri mai bune de biosecuritate și reducerea pierderilor economice.

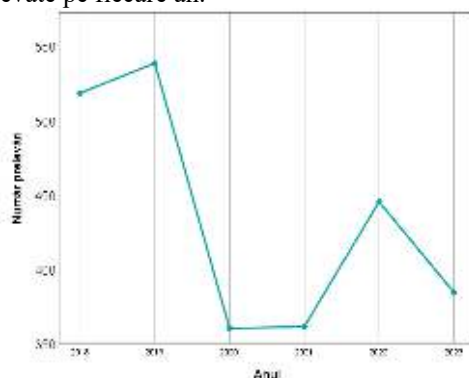
6.3.2.1 Detectarea și monitorizarea infecției cu virusul PPA la porcii domestici și mistreți pe o perioadă de șase ani utilizând testul PCR

În perioada 2018-2023 s-au efectuat un număr de 2606 de prelevări de probe pentru testul PCR, din care 518 (19,9%) în anul 2018, 538 (20,6%) în anul 2019, 360 (13,8%) în anul 2021, 445 (17,1%) în anul 2022, respectiv 384 (14,7%) în anul 2023 (Tabelul 4; Grafic 2).

Anul	2018	2019	2020	2021	2022	2023	Total
Total frecvență	518	538	360	361	445	384	2606

%	19,9	20,6	13,8	13,9	17,1	14,7	100,0
---	------	------	------	------	------	------	-------

Tabelul 4. Numărul de probe prelevate pe fiecare an.



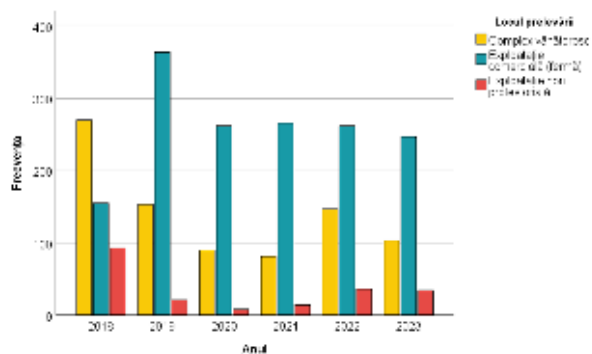
Grafic 2. Reprezentarea grafică a numărului de probe prelevate pe fiecare an.

Locul prelevării

Majoritatea probelor au fost prelevate din exploatațiile comerciale (1556). 844 (32,4%) probe au fost prelevate din complexul vânătoresc, iar 206 (7,9%) din exploatațiile non-profesionale (Tabelul 5; Grafic 4).

			Locul prelevării			
			Complex vânătoresc	Exploatație comercială (fermă)	Exploatație non-profesională	Total
Anul	2018	Frecvența	270	155	93	518
		%	52,1%	29,9%	18,0%	100,0%
	2019	Frecvența	153	364	21	538
		%	28,4%	67,7%	3,9%	100,0%
	2020	Frecvența	90	262	8	360
		%	25,0%	72,8%	2,2%	100,0%
	2021	Frecvența	81	266	14	361
		%	22,4%	73,7%	3,9%	100,0%
	2022	Frecvența	147	262	36	445
		%	33,0%	58,9%	8,1%	100,0%
	2023	Frecvența	103	247	34	384
		%	26,8%	64,3%	8,9%	100,0%
Total		Frecvența	844	1556	206	2606
		%	32,4%	59,7%	7,9%	100,0%

Tabelul 5. Anul și locul prelevării probelor



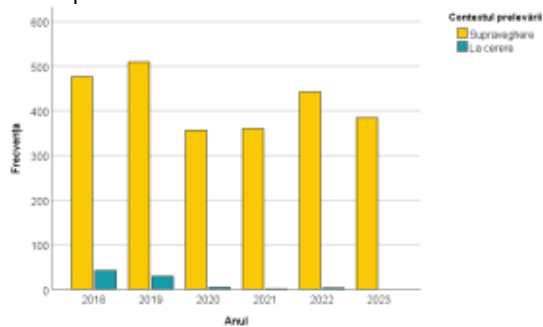
Grafic 4. Reprezentarea grafică a locului de unde au fost prelevate probele pe fiecare an

Contextul prelevării

Majoritatea covârșitoare a probelor (97%) au fost colectate în contextul supravegherii răspândirii PPA și doar 3% au fost prelevate la cerere (Tabelul 6; Grafic 5).

		Contextul prelevării		Total	
		Supraveghere	La cerere		
Anul	2018	Frecvența	476	42	518
		%	91,9%	8,1%	100,0%
	2019	Frecvența	509	29	538
		%	94,6%	5,4%	100,0%
	2020	Frecvența	356	4	360
		%	98,9%	1,1%	100,0%
	2021	Frecvența	360	1	361
		%	99,7%	0,3%	100,0%
	2022	Frecvența	442	3	445
		%	99,3%	0,7%	100,0%
	2023	Frecvența	384	0	384
		%	100,0%	0,0%	100,0%
Total		Frecvența	2527	79	2606
		%	97,0%	3,0%	100,0%

Tabelul 6. Contextul prelevării probelor pe fiecare an.



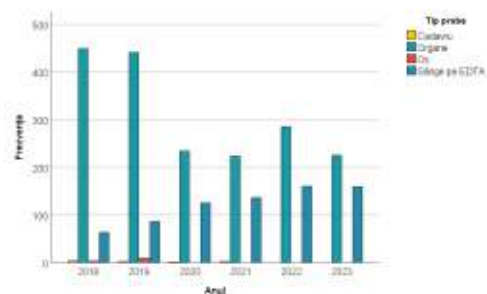
Grafic 5. Reprezentarea grafică a contextului prelevării probelor pe fiecare an.

Tip probe

Tipurile de probe au fost preponderent au fost organe (71,3%). Alte tipuri de probe prelevate au fost: sânge pe EDTA (28%), țesut osos (0,5%) și cadavre de animale (0,3%) (Tabelul 7; Grafic 6).

		Tip probe				Total	
		Cadavru	Organe	Os	Sânge pe EDTA		
Anul	2018	Frecvența	3	449	3	63	518
		%	0,6%	86,7%	0,6%	12,2%	100,0%
	2019	Frecvența	2	441	9	86	538
		%	0,4%	82,0%	1,7%	16,0%	100,0%
	2020	Frecvența	1	234	0	125	360
		%	0,3%	65,0%	0,0%	34,7%	100,0%
	2021	Frecvența	2	223	0	136	361
		%	0,6%	61,8%	0,0%	37,7%	100,0%
	2022	Frecvența	0	285	0	160	445
		%	0,0%	64,0%	0,0%	36,0%	100,0%
	2023	Frecvența	0	225	0	159	384
		%	0,0%	58,6%	0,0%	41,4%	100,0%
Total		Frecvența	8	1857	12	729	2606
		%	0,3%	71,3%	0,5%	28,0%	100,0%

Tabelul 7. Tipul de probe prelevate pe fiecare an.



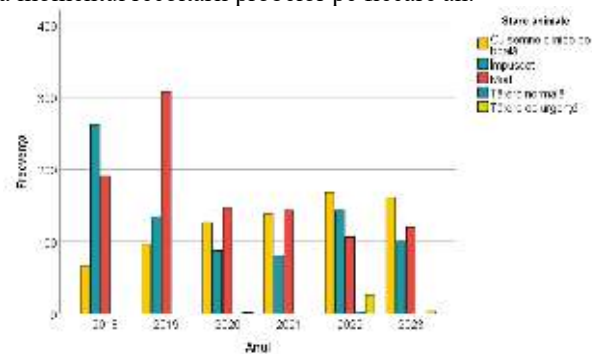
Grafic 6. Reprezentarea grafică tipului de probe prelevate pe fiecare an.

Stare animale

38,9% dintre animalele de la care s-au prelevat probe au fost moarte, 30,9% au fost împușcate, 28,9% au fost cu semne clinice de boală. Doar 1,2% din probe au fost prelevate din tăieri de urgență și 0,1% din tăieri normale (Tabelul 8; Grafic 7).

Stare clinică a animalelor la momentul recoltării							
Anul		Cu semne clinice de boală	Împușcat	Mort	Tăiere normală	Tăiere de urgență	Total
2018	Frecvența	65	262	191	0	0	518
	%	12,5%	50,6%	36,9%	0,0%	0,0%	100,0%
2019	Frecvența	96	134	308	0	0	538
	%	17,8%	24,9%	57,2%	0,0%	0,0%	100,0%
2020	Frecvența	126	87	146	0	1	360
	%	35,0%	24,2%	40,6%	0,0%	0,3%	100,0%
2021	Frecvența	138	80	143	0	0	361
	%	38,2%	22,2%	39,6%	0,0%	0,0%	100,0%
2022	Frecvența	168	143	106	2	26	445
	%	37,8%	32,1%	23,8%	0,4%	5,8%	100,0%
2023	Frecvența	161	100	120	0	3	384
	%	41,9%	26,0%	31,3%	0,0%	0,8%	100,0%
Total	Frecvența	754	806	1014	2	30	2606
	%	28,9%	30,9%	38,9%	0,1%	1,2%	100,0%

Tabelul 8. Starea clinică animalelor la momentul recoltării probelor pe fiecare an.



Grafic 7. Reprezentarea grafică a stării clinice a animalelor la momentul recoltării probelor pe fiecare an.

Nr. probe pozitive

Au fost determinate 218 probe pozitive din 152 de prelevări de probe (Tabelul 9). Cele mai multe probe pozitive au fost determinate în anul 2018 (112 probe) (Tabelul 9;Tabelul 10; Grafic 8).

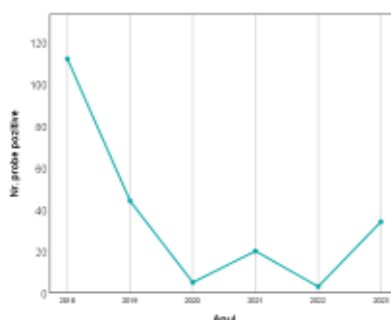
Nr. probe pozitive	
Număr prelevări cu probe pozitive	152
Număr eşantioane pozitive	218

Tabelul 9. Numărul probelor prelevate cu rezultat pozitiv și numărul total de eșantioane analizate la care am

	Nr. probe pozitive					
	Anul					
	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Număr prelevări cu probe pozitive	82	26	2	11	3	28
Număr eșantioane pozitive	112	44	5	20	3	34

obținut rezultate pozitive la testul PCR pe perioada 2018-2023.

Tabelul 10. Numărul probelor prelevate cu rezultat pozitiv și numărul total de eșantioane analizate la care am obținut rezultate pozitive la testul PCR pe fiecare an.



Grafic 8. Reprezentarea grafică a numărului de probe prelevate pe fiecare an.

Stare animale	Număr prelevări cu probe pozitive	Număr probe pozitive
Cu semne clinice de boală	63	102
Împușcat	14	14
Mort	72	99
Tăiere normală	0	0
Tăiere de urgență	3	3

Au fost determinate 218 probe pozitive, pe perioada 2018-2023, din care majoritatea (102) au fost prelevate de la animale ce prezentau semne clinice de boală (Tabelul 11).

Tabelul 11. Numărul probelor prelevate cu rezultat pozitiv la testul PCR și starea animalelor la momentul recoltării pe perioada 2018-2023.

Studiul a implicat acțiuni de supraveghere realizate de către medicii veterinari cât și de vânători care au colectat un număr total de 6820 de probe pentru testarea PCR din 2018-2023. Datele obținute în urma testării au fost analizate statistic utilizând IBM SPSS Statistic for Windows, versiunea 29.0 subliniind avantajul de a utiliza instrumente statistice fiabile și avansate ce pot duce la o mai bună înțelegere și gestionare a bolii PPA. Această colecție extinsă de date îmbunătățește robustețea studiului și permite o analiză mai amănunțită a tendințelor de sănătate în timp. Defalcarea detaliată a probelor colectate în fiecare an pe fiecare specie la care a fost confirmată boala, numărul de animale susceptibile sau care prezentau semne clinice de boală oferă informații valoroase asupra modificărilor temporale ale datelor privind statutul de boală PPA. Metodologia și constatările prezentate pot servi drept referință pentru studiile viitoare ce sporesc înțelegerea tendințelor și poate pune bazele eforturilor viitoare care pot influența deciziile și intervențiile în teren.

În urma analizei statistice am concluzionat că studiul prezintă efectiv datele nominale ca frecvențe și procente absolute, ceea ce ajută la înțelegerea distribuției variabilelor categorice. Variabilele continue sunt exprimate prin valori medii și abateri standard, oferind o imagine clară a tendinței și variabilității centrale a datelor. Această abordare îmbunătățește interpretabilitatea rezultatelor. Prin stabilirea unui nivel de semnificație de $p < 0,05$, lucrarea stabilește un standard pentru determinarea semnificației statistice a constatărilor. Acest criteriu este crucial pentru validarea rezultatelor și asigurarea faptului că acestea nu se datorează întâmplării aleatorii, contribuind astfel la fiabilitatea rezultatelor cercetării.

6.3.2.2 Compararea rezultatelor obținute pe două tipuri de probe diferite (sânge pe EDTA și organe / țesuturi)

Studiul compară două tipuri de probe pozitive PPA, sânge de pe EDTA și organe (splină, rinichi, ganglioni limfatici) recoltate atât de la mistreți, cât și de la porcii domestici. Prin această comparație s-a permis o evaluare a încărcăturii virale în diferite matrici, contribuind la înțelegerea eficienței detectării PPA prin prezentarea datelor CT (ciclu de prag), analizate în laboratorul de biologie moleculară al D.S.V.S.A Constanța, concentrându-se pe detectarea virusului PPA folosind metoda Real Time PCR, o tehnică care permite cuantificarea ADN-ului viral în timpul procesului de amplificare. Utilizarea valorilor CT oferă o măsură cantitativă care poate ajuta la evaluarea încărcăturii virale în diferite probe. Valoarea CT reprezintă numărul ciclului la care semnalul fluorescent trece un prag predeterminat. Acest prag este esențial pentru a determina dacă o probă este considerată pozitivă pentru virusul PPA. Studiul subliniază că valoarea CT este invers proporțională cu cantitatea inițială a ADN-ului viral țintă, ceea ce înseamnă că pe măsură ce încărcătura virală crește, valoarea CT scade. Valorile CT servesc ca indicator al încărcăturii virale prezente într-o probă. O valoare CT mai mică sugerează o cantitate mai mare de ADN viral PPA, indicând faptul că proba este pozitivă pentru virusul PPA. În acest studiu, valoarea medie a CT pentru probe de sânge a fost de 15,72, semnificativ mai mică decât media de 24,33 pentru probe de organe, sugerând că sângele conține o încărcătură virală mai mare decât organele. Studiul evidențiază faptul că valorile CT obținute din probe de sânge demonstrează o specificitate mai mare pentru detectarea genomului viral folosind PCR în timp real. Aceasta înseamnă că probele de sânge sunt mai fiabile pentru detectarea timpurie și târzie a PPA ceea ce este esențial pentru intervenția în timp util și aplicarea măsurilor de control.

Din totalul de 1561 de probe analizate în anul 2019 s-a obținut rezultat pozitiv la 20 de probe de la porcii domestici și 6 porci mistreți (Tabelul 12).

2019						
Porc	Total probe analizate	Probe de sânge	Probe de sânge pozitivă	Probe de organe	Probe de organ pozitiv	Rezultat pozitiv total
Domestic	1337	351	12	986	8	20
Mistreț	224	6	0	218	6	6

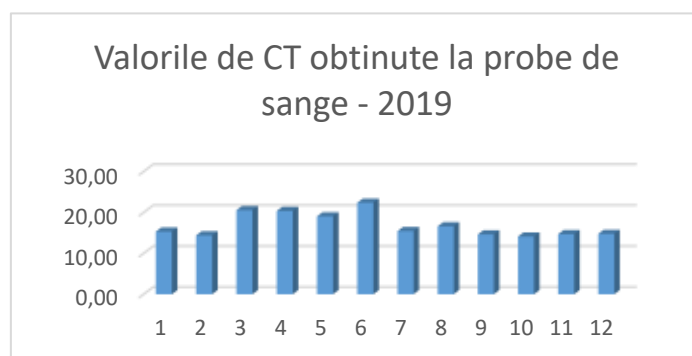
Tabelul 12. Totalul de probe de la porcii domestici cât și de la mistreți pe fiecare matrice și totalul rezultatelor pozitive obținute utilizând metoda Real Time PCR în anul 2019.

Pe baza mediei de 16,82 valorilor de CT obținute în anul 2019, la probele de sânge pe EDTA se poate concluziona că probele de sânge au prezentat încărcături virale mai mari decât probele de organe, indicând o specificitate mai bună de detectare (Tabelul 13; Grafic 10, 12).

2019		
Matricea analizată	Numărul de eșantioane	Valori CT
Sânge	1	15.29
Sânge	2	14.38
Sânge	3	20.54

Sânge	4	20.34
Sânge	5	19.03
Sânge	6	22.37
Sânge	7	15.43
Sânge	8	16.59
Sânge	9	14.62
Sânge	10	14.09
Sânge	11	14.67
Sânge	12	14.58

Tabelul 13. Valorile de CT obținute pe matrice sânge în anul 2019.



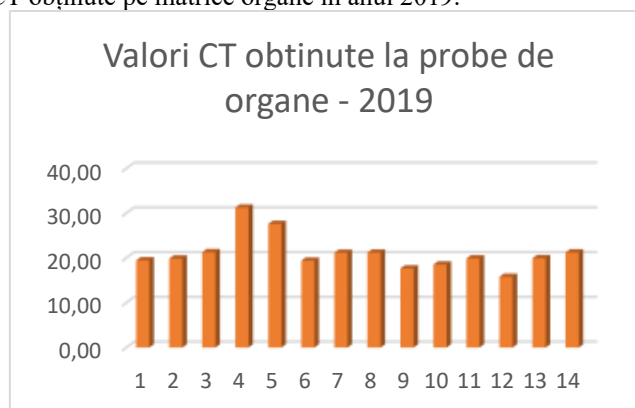
Grafic 10. Reprezentarea grafică a valorilor de CT obținute pe matricea sânge pe EDTA în anul 2019.

Pe baza mediei de 20,89 a valorilor de CT obținute în anul 2019, la probele de organe se poate concluziona că probele de organe au prezentat încărcături virale mai mici decât probele de sânge pe EDTA, indicând o specificitate mai bună de detectare (Tabelul 14; Grafic 11, 12).

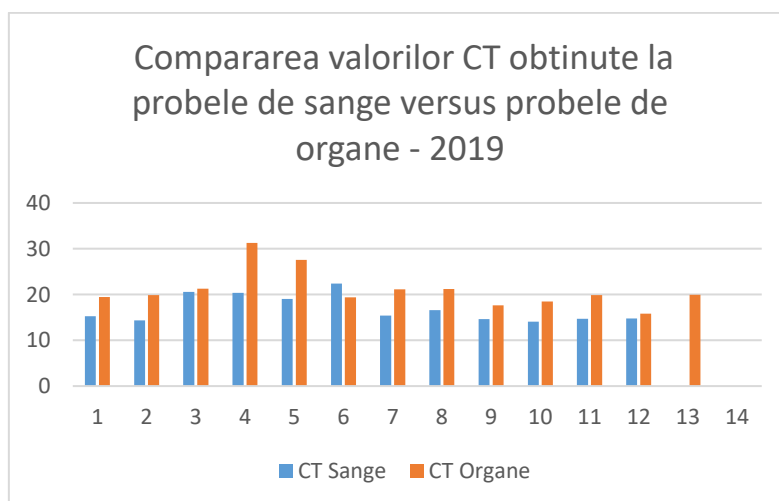
2019		
Matricea analizată	Numărul de eșantioane	Valori CT
Organe	1	19.47
Organe	2	19.85
Organe	3	21.28
Organe	4	19.52
Organe	5	31.26
Organe	6	27.60
Organe	7	19.39
Organe	8	21.16

Organe	9	21.18
Organe	10	17.64
Organe	11	18.51
Organe	12	19.90
Organe	13	15.79
Organe	14	19.93

Tabelul 14. Valorile de CT obținute pe matrice organe în anul 2019.



Grafic 11. Reprezentarea grafică a valorilor de CT obținute pe matricea organe în anul 2019.



Grafic 12. Reprezentarea grafică a comparației valorilor de CT obținute pe matricea de sânge pe EDTA versus matricea de organe în anul 2019.

Pachetul de înregistrări include o populație formată din mistreți și porci domestici, iar valorile CT obținute pentru matricea sanguină și organe ne permit să comparăm valorile CT medii pentru matricea sanguină este de 15,72 față de valorile CT medii pentru matricea de organe este de 24,33. Putem concluziona că în urma comparației făcute între cele două matrici, putem spune că în sânge cantitatea de virus este mai mare decât în organe.

6.4 EXAMEN SEROLOGIC FOLOSIND METODA DE DETECȚIE A ANTICORPILOR ANTI-VIRUS PPA PRIN TEHNICA IMUNOENZIMATICA ELISA

(Anghel et al., 2023)

6.4.2.1 Studiul comparativ al rezultatelor obținute prin două metode de diagnostic Real Time PCR și ELISA

Potrivit Laboratorului de referință al Uniunii Europene pentru PPA, cu sediul în Valdeolmos, Spania recomandă ca ambele metode să fie utilizate pentru stabilirea dinamicii infecției în cazul rezultatelor pozitive ale detectării genomului viral dar și detecția anticorpilor demonstrează că animalele erau infectate la momentul prelevării probelor. În cazul unui rezultat pozitiv la testul de anticorpi în absența detectării genomului viral indică o infecție în curs sau anterioară (Guidelines, Community Reference Laboratory for African Swine Fever, n.d.). Investigațiile arată că doar 6 cazuri de mistreți au fost confirmate printr-un rezultat pozitiv utilizând ambele metode de analiză (Tabelul 15, 16). Aceste animale erau încă în faza de viremie, cu semne clinice și în perioada de seroconversie (> 10 zile) (Guidelines, Community Reference Laboratory for African Swine Fever, n.d.). De asemenea, unul din cei doi mistreți a avut un rezultat pozitiv slab folosind metoda PCR (Tabelul 15), același animal a fost testat folosind metoda ELISA și s-a obținut rezultat negativ la testul de anticorpi (Tabelul 16) ceea ce demonstrează că acest animal a fost recent infectat cu PPA și nu a avut încă loc seroconversia (< la 7 zile de la contact), semnele clinice nu erau evidente și anticorpii nu erau încă produși. Un al doilea mistreț a rezultat slab pozitiv la testul PCR (Tabelul 15) și pozitiv pentru detectarea anticorpilor (Tabelul 16). În aceste cazuri particulare, animalul a trecut de infecție și este posibil să nu prezinte semne clinice. Acest mistreț ar fi putut fi infectat cu o tulpină atenuată (Guidelines, Community Reference Laboratory for African Swine Fever, n.d.).

Matrice	Mistreți	Pozitivi	Slab Pozitivi	Negativi
Sânge pe EDTA	6	0	0	6
Organe	229	5	2	222
Măduva osoasă	21	21	0	0

Tabelul 15. Rezultatele obținute din probe recoltate de la mistreți analizate utilizând metoda Real Time PCR pe perioada 2019.

Matricea	Mistreți	Pozitiv	Slab Pozitiv	Negativ
Ser sanguin	199	17	1	181

Tabel 16. Rezultate obținute din probe de la mistreț utilizând metoda ELISA pe perioada 2019.

Din totalul de probe analizate folosind testul ELISA de la porcii din gospodării private (879), rezultatele obținute au arătat că 6 au fost testați pozitiv pentru anticorpi și din acest grup 3 probe au fost pozitive pentru testul PCR. Acești porci erau încă în faza de viremie, cu semne clinice și seroconversia a avut loc (> 10 zile) (Tabelul 17).

Matricea	Porci din gospodării private	Pozitiv	Slab pozitiv	Negativ
Sânge pe EDTA	50	7	0	43
Organe	11	5	0	6
Măduva osoasă	0	0	0	0
Cadavru	3	3	0	0

Tabelul 17. Rezultatele obținute din probe de la porcii domestici din gospodării private analizate utilizând metoda Real Time PCR pe perioada 2019.

Testul ELISA este mai potrivit pentru detectarea prezenței anticorpilor specifici la PPA începând cu a 14-a zi după contactul cu virusul. Prin urmare, nu este recomandată în situația în care animalele au fost recent infectate cu virusul PPA. Cu toate acestea, poate fi utilizată pentru a monitoriza starea imunologică post-infecție a

populațiilor de porci domestici și mistreți ca răspuns la virusul PPA. ELISA poate ajuta statistic la păstrarea unei evidențe a procentului de porci care au devenit imuni la boală.

6.5 EXAMEN HEMATOLOGIC REALIZAT PRIN ANALIZA CONSTITUENȚILOR DIN SÂNGE PE EDTA LA ANIMALELE TESTATE POZITIV PENTRU

VIRUSUL PPA

(Anghel et al., 2022)

Datorită contagiozității ridicate a boli și de cele mai multe ori dovedindu-se a fi fatală atât pentru suinele domestice cât și la mistreți am studiat detectarea cât mai rapidă a simptomelor clinice asociate cu stadiul de viremie PPA folosind interpretarea valorilor asociate compuşilor din sânge obținute folosind analizoarele hematologice automate. Am urmărit să subliniem corelația dintre parametrii sanguini din hemoleucogramă și diferitele etape ale viremiei PPA pentru a determina dacă această metodă de analiză poate fi folosită pe viitor în practica clinică atunci când se suspicionează infecția naturală cu virusul PPA. Diagnosticarea cât mai rapidă și precisă a bolii putem controla mai bine evoluția și răspândirea ei.

În acest studiu investigăm modificările parametrilor sanguini ai celor 15 porci confirmați cu PPA prin testul Real Time PCR, care erau cazați în patru țarcuri, pentru a demonstra dinamica virală în diferitele etape de viremie. În acest sens au fost efectuate teste de hemoleucogramă pentru a arăta diferitele stadii de viremie ale PPA prin analizarea numărului de celule albe totale din sânge (WBC) ce crește rapid în intervalul 0-1dpv (zi după debutul viremiei) și scade brusc la 2-6 dpv (zi după debutul viremiei) (Oh et al., 2022).

Am efectuat și testul ELISA pe toți cei 15 porci și la care am obținut rezultate negative. Motivul pentru care am folosit testul ELISA a fost acela de a demonstra că porcii din focar se aflau în stadiul de viremie și de a exclude posibilitatea de a trece mai mult de 14 zile de infecție pentru detectarea anticorpilor pestei porcine africane specifici.

Primul grup format din trei porci aflați în primul țarc la care debutul bolii a fost cel mai rapid cu semne clinice de febră și decubit prelungit se consideră, bazându-ne pe datele expuse în tabelul 18, ca fiind donatori de virus prin contact direct cu celelalte animale (Wilkinson și Donaldson, 1977) (de Carvalho Ferreira et al., 2012) din țarcurile imediat alăturate fie prin intermediul excrementelor (Davies et al., 2017). Astfel plecând de la studiul lui (Guinat et al., 2014) care a demonstrat faptul că detectarea ADN viral PPA este asociată cu apariția semnelor clinice, au fost efectuate teste hematologice a sângelui pe EDTA pentru a arăta ca aceștia sunt încă în perioada viremică a boli, pentru a asigura controlul focarelor prin diagnostic.

Parametrii analizați ¹	Valori de referință	Scroafă	Porc 1	Porc 2
WBC conta, x10 ⁹ /L	11.0 - 22.0	6.7	6.3	7.2
Trombocite, x10 ⁹ /L	200 – 700	74	33	16
MPV, fL	6.0 - 12.0	7.6	7.4	7.4
RBC x10 ¹² /L	5.00 - 9.50	1.86	5.24	5.87
HGB, g/dl	9.9 - 16.5	2.8	7.4	10.5
HCT, %	32.0 - 50.0	10.8	30.9	42.0
MCV, fL	51.0 - 68.0	58.5	59.0	71.6
MCH, pg	17.0 - 22.0	15.0	14.1	17.8
MCHC, g/ dl	30.0 - 38.0	25.9	23.9	25.0
RDW CV, %	14.0 - 19.0	16.1	13.7	13.8

Tabel 18. Compararea parametrilor sangvini din primul grup dintr-un focar confirmat de PPA în județul Constanța, reprezentat de 3 porci domestici aflați în stare critică și care prezentau semne clinice de febră și decubit prelungit.

În rândul porcilor din al doilea țarc se pot observa modificări ale parametrilor sanguini precum leucocitopenia doar la porcii numărul 3,4 și 5, ce a fost observată conform studiilor lui (Karalyan et al., 2012) în ultimele zile de viață, o altă modificare care se menține este trombocitopenia observată la porcul 3,4,6 și 7 în

concordanța cu valori scăzute ale hemoglobinei la porcul 3,4,5,6 și 7 ce indică instalarea anemiei dovedită de valoarea hematocritului scăzută înregistrată la porcul 5 și 6, și valorile MCH respectiv MCHC sub normale observate la toți porcii din țarc, RDW_CV valori scăzute la porcul 5.

Parametrii analizați ¹	Valori de referință	Porc 3	Porc 4	Porc 5	Porc 6	Porc 7
WBC conta, x10 ⁹ /L	11.0 - 22.0	8.0	8.3	10.0	11.2	11.9
Trombocite, x10 ⁹ /L	200 – 700	111	28	263	36	53
MPV, fL	6.0 - 12.0	6.7	8.0	8.6	7.0	7.6
RBC x10 ¹² /L	5.00 - 9.50	6.48	5.68	5.29	5.33	5.54
HGB, g/dl	9.9 - 16.5	9.3	7.8	7.8	7.6	8.0
HCT, %	32.0 - 50.0	38.2	32.2	31.7	30.7	33.3
MCV, fL	51.0 - 68.0	59.1	56.8	60.1	57.6	60.2
MCH, pg	17.0 - 22.0	14.3	13.7	14.7	14.2	14.4
MCHC, g/ Dl	30.0 - 38.0	24.3	24.2	24.6	24.7	24.0
RDW_CV, %	14.0 - 19.0	14.4	15.0	13.4	14.8	14.1

Tabel 19. Compararea parametrilor sangvini din grupul al doilea dintr-un focar confirmat de PPA în județul Constanța, reprezentat de 5 porci domestici ce manifestau semne clinice precum lipsa poftei de mâncare, ataxie, iar parametrii sangvini sunt moderat modificați.

În infecția cu virusul PPA WBC pot depăși valorile normale imediat după infecția cu virusul PPA (0-1dpv) (Oh et al., 2022) fapt întâlnit și la porcii numărul 12,13 și 14 din al treilea tabel 3. Trombocitopenie la porcii numărul 11,12,13 și 14 este o modificare hematologică frecvent observată în perioada de viremie (Blome et al., 2013) (Ramiro-Ibáñez et al., 1997). Hemoglobina scăzută la porcii 11 și 13 MCH, MCHC scăzut la porcii 11,12,13 și 14. Valori scăzute ale RDW_CV doar la porcul numărul 12.

Parametrii analizați ¹	Valori de referință	Porc 11	Porc 12	Porc 13	Porc 14
WBC conta, x10 ⁹ /L	11.0 - 22.0	21.9	23.6	23.6	22.8
Trombocite, x10 ⁹ /L	200 – 700	191	37	57	52
MPV, fL	6.0 - 12.0	7.1	8.8	6.8	7.9
RBC x10 ¹² /L	5.00 - 9.50	5.15	7.53	6.98	5.20
HGB, g/dl	9.9 - 16.5	7.9	12.6	9.7	11.6
HCT, %	32.0 - 50.0	32.0	48.6	39.2	47.8
MCV, fL	51.0 - 68.0	62.3	64.6	56.3	62.9
MCH, pg	17.0 - 22.0	15.3	16.7	13.8	15.9
MCHC, g/ Dl	30.0 - 38.0	24.6	25.9	24.7	24.1
RDW_CV, %	14.0 - 19.0	15.1	13.9	15.1	14.1

Tabel 20. Compararea parametrilor sangvini din grupul al treilea, dintr-un focar confirmat de PPA în județul Constanța, reprezentat de 4 porci domestici, și care nu prezentau semne clinice, în schimb numărul WBC are valori peste limitele normale.

Trombocitopenie în cazul porcului numărul 9 și MCH, MCHC cu valori scăzute la porcul numărul 8,9 și 10.

Parametrii analizați ¹	Valori de referință	Porc 8	Porc 9	Porc 10
Numărul WBC, x10 ⁹ /L	11.0 - 22.0	13.4	15.8	18.1
Trombocite, x10 ⁹ /L	200 – 700	210	86	241
MPV, fL	6.0 - 12.0	7.8	8.1	7.6
RBC x10 ¹² /L	5.00 - 9.50	6.69	6.95	6.87
HGB, g/dl	9.9 - 16.5	9.4	11.2	9.9
HCT, %	32.0 - 50.0	38.9	44.3	40.4
MCV, FL	51.0 - 68.0	58.2	63.8	58.9
MCH, pg	17.0 - 22.0	14.0	16.1	14.4
MCHC, g/ Dl	30.0 - 38.0	24.1	25.2	24.5
RDW_CV, %	14.0 - 19.0	15.4	16.2	15.2

Tabel 21. Compararea parametrilor sangvini din grupul al patrulea, dintr-un focar confirmat de PPA în județul Constanța, reprezentat de 3 porci domestici care nu prezentau semne de boală, iar numărul WBC se află în limite normale.

Mediile valorilor s-au încadrat în valorile de referință ale analizorului automatic, cu excepția MCH, MCHC, RDW_CV care depășesc valorile de referință pusă pe seama unei diete cu o concentrație mărită de Fe (Deng et al., 2021).

Parametrii analizați ¹	Valori de referință	Porc 1	Porc 2	Porc 3	Porc 4	Porc 5
WBC conta, x10 ⁹ /L	11.0 - 22.0	11.9	11.8	12.1	11.9	11.8
Trombocite, x10 ⁹ /L	200 – 700	236	240	235	236	246
MPV, fL	6.0 - 12.0	7.5	7.4	7.5	7.4	7.4
RBC x10 ¹² /L	5.00 - 9.50	5.59	5.64	5.61	5.60	5.58
HGB, g/dl	9.9 - 16.5	15.2	15.3	15.4	15.4	15.4
HCT, %	32.0 - 50.0	36.5	36.9	36.9	36.8	36.8
MCV, FL	51.0 - 68.0	65.4	65.6	65.8	65.8	66.0
MCH, pg	17.0 - 22.0	27.1	27.1	27.4	27.5	27.5
MCHC, g/ Dl	30.0 - 38.0	41.6	41.1	41.7	41.8	41.8
RDW_CV, %	14.0 - 19.0	26.8	25.2	25.1	25.8	25.0

¹WBC = celule albe din sânge; MPV = volumul mediu al trombocitelor; RBC = celule roșii din sânge; HGB = Concentrația hemoglobinei; HCT = hematocrit (volum relativ de eritrocite); MCV = volumul corpuscular mediu; MCH = hemoglobina medie corpusculară; MCHC = concentrația medie de hemoglobină corpusculară; RDW_CV = distribuție a celulelor roșii din sânge .

Tabel 22. Compararea parametrilor sangvini din grupul control negativ reprezentat de 5 porci domestici, care nu sunt cunoscuți cu patologii și la care parametrii sangvini nu au prezentat diferențe semnificative față de valorile normale de referință.

Studiul efectuat pe probe de sânge ale porcilor din primul țarc a arătat o perioadă viremică de lungă durată pentru a dezvolta procese patologice care să determine un nivel scăzut de WBC, trombocitopenie asociată cu un nivel scăzut al valorilor MPV. Valorile foarte scăzute ale parametrilor RBC, HGB, HTC, MCH, MCHC

întâlnite mai ales la scroafă dar și la porcul numărul 1 și 2 denotă instalarea anemiei ceea ce explică și reticența la deplasare. Datorită faptului că porcii examinați nu prezentau sindrom hemoragic (cum ar fi cianoza sau hemoragii la nivelul pielii, urechilor sau diaree sangvinolentă) nu au fost observate în timpul acestui experiment modificări ale valorilor RBC care sunt marginal scăzute sau în limite normale, rezultate susținute și de cercetările lui Blome și colaboratorii (Blome et al., 2013). Din acest motiv, parametrii RBC nu sunt fiabili pentru a diagnostica pesta porcină africană în stadiul de viremie, în schimb ne putem baza pe numărul WBC. Interacțiunea dintre gazdă și agentul patogen viral cât și difuzarea virusului PPA la alte gazde poate fi urmărită prin analizarea acestui parametru comparând parametrii obținuți la hemoleucogramă de la progresia infecției în organism corelată cu valori ce depășesc limitele normale ale WBC, urmată de replicarea și apoi eliminarea virusului PPA prin secreție, excreție urmată de transmiterea la alți porci sensibili, corelată cu scăderea valorii sub normală a WBC. În funcție de cât de sensibilă este gazda și de virulența tulpinii virale am concluzionat că parametrii sanguini obținuți de la toți porcii din primul țarc dar și porcii numărul 3, 4 și 5 din al doilea țarc prezentau un stadiu avansat de infecție, probabil la 12-14 dpi, comparativ cu porcii numărul 11, 12, 13, 14 unde parametrii sanguini au arătat că se află în stadiul inițial al perioadei de viremie datorită valorilor ce depășesc limita normală a WBC.

Rezultatele au arătat o corelație semnificativă între semnele clinice și valorile obținute în determinarea parametrilor hematologici ale porcilor afectați în comparație cu porcii sănătoși testați și care nu se aflau sub incidența unor boli cunoscute și la care se poate observa că nu au avut modificări semnificative ale parametrilor analizați în hemoleucogramă.

CAPITOLUL 7

CONCLUZII GENERALE

Analizând rezultatele obținute prin studiile noastre prin excelența experimentale și originale, din aceasta teză de doctorat, intitulată **PESTA PORCINĂ AFRICANĂ LA PORCII DOMESTICI ȘI MISTREȚI PRIN PRISMA INVESTIGAȚIILOR FOLOSITE ÎN CADRUL LABORATORULUI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ CE PERMIT PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A GENOMULUI VIRAL PRIN TEHNICA REAL TIME PCR ȘI ELISA**, putem formula, următoarele, aprecieri, comentarii și concluzii.

În acest studiu, am evaluat incidența PPA la porcii domestici și mistreți pe o perioadă de șase ani (între 2018 și 2023) în județul Constanța, o a doua zonă cheie de origine a focarului din România, unde PPA a fost confirmată în iulie 2018. Acest județ are o importanță deosebită pentru înțelegerea evoluției și răspândirii focarului de PPA în România, datorită vecinătății sale apropiate de zonele umede din Delta Dunării și fluviul Dunării, ambele foarte populate cu mistreți. Aceste zone umede, împreună cu cele mai mari terenuri agricole cultivate cu culturi, joacă un rol important pentru ecologia mistreților și creșterea porcilor. O populație importantă de porci este crescută în gospodării private mici sau în aer liber în zona Deltei Dunării, favorizând un contact strâns cu mistreții. Mai mult, datorită poziției sale geografice, Delta Dunării este o rută cheie de migrație a mistreților prin Ucraina din țările din est în cele din vest, unde au fost raportate inițial focare de PPA: Georgia (Rowlands et al., 2008) Rusia (Kolbasov et al., 2018), Armenia (Sargsyan et al., 2018).

De la primele cazuri identificate la porcine în România în iulie 2017 în județul Satu-Mare (Ardelean et al., 2021) și iulie 2018 în județul Constanța, ambele zone afectate au fost plasate sub supraveghere oficială de către Autoritatea Națională Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor din România, conform măsurilor de control stabilite de manualul de diagnostic al Comisiei Comunităților Europene (Decision – 2003/422- EN-EUR-Lex, n.d.). În ciuda eforturilor inițiale de a controla răspândirea bolii, până la sfârșitul anului 2023 au fost notificate 164 de focare de PPA în județul Constanța. Cea mai mare proporție a cazurilor confirmate de PPA în județul Constanța a apărut la porcii crescuți în ferme tradiționale, probabil din cauza nivelurilor scăzute de securitate, care au favorizat contactul strâns al porcilor cu mistreții și/sau probabil din cauza hrănirii porcilor cu deșeuri de catering. La nivel național, conform comunicării Autorității Naționale Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor în perioada 2017-2023, au fost identificate un număr de 7141 de cazuri pozitive PPA la mistreți în 5979 de zone declarate focare, afectând toate cele 41 de județe din România (Actualizarea situației privind evoluția Pestei Porcine Africane (PPA) – A.N.S.V.S.A, 23 martie 2023).

Am observat, în baza analizei statistice efectuate, o dinamică sezonieră a bolii în județul Constanța, prin confirmarea celor mai multe focare de PPA la porcii domestici în luna august (54 focare), iulie (26) datorită temperaturilor ridicate și datorită condițiilor reduse de hrană, mistreții devin dependenți de zonele cu apă (râuri, iazuri) și de zonele cu umbră (păduri, prerie). În luna septembrie au fost confirmate 22 de focare de PPA la porcii domestici, când hrana mistreților devine mai abundentă fiind deseori atrași de câmpurile agricole unde se pot hrăni cu cereale.

Numărul de cazuri la porci și mistreți din țară a scăzut semnificativ în această perioadă datorită procedurilor de eradicare implementate de Autoritatea Națională Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor din România. Acestea au constatat în implementarea procedurilor de diagnostic molecular și a măsurilor de carantină:

restricționarea mișcărilor animalelor, dezinfectarea grajdurilor, vehiculelor și echipamentelor agricole, hrănirea animalelor exclusiv cu cereale și sacrificarea tuturor animalelor din zonele de focare. În plus, stabilirea unor zone de protecție la 3 km și a unei zone de supraveghere la 10 km în jurul locului focarului s-a dovedit a fi un mare succes în controlul răspândirii bolii.

Mai multe studii au investigat epidemiologia moleculară a PPA, pentru a stabili dinamica transmiterii PPA între diferite țări și au relevat o dinamică similară a focarelor de PPA cu rezultatele noastre. În septembrie 2018, tulpina II de PPA a fost detectată la mistreți din Belgia (Garigliany et al., 2019). Gallardo și colaboratorii (C. Gallardo et al., 2023) au analizat regiunea variabilei centrale a 382 de izolate colectate din 2007 până în 2022 și au împărțit genotipurile europene II-ASFV în 24 de grupuri diferite. Autorii au observat că tulpina care a provocat focarul din 2022 din Macedonia de Nord este similară cu tulpina care evoluează în România, Bulgaria, Serbia și Grecia. În România, genotipul II al PPA a fost detectat pentru prima dată în ianuarie 2019 într-o fermă de porci domestici din vestul României (C. Gallardo et al., 2023). Această tulpină a provocat focare ulterioare în restul țării și în județul Constanța. Tulpinile românești din 2017, 2018 și 2021 au fost identificate ca varianta I (C. Gallardo et al., 2023). Studiul nostru demonstrează că probele pozitive pentru PPA din România analizate din județul Constanța, au 100% asemănări cu tulpina II a PPA. Un arbore filogenetic construit folosind secvențe de referință GenBank din Europa, Asia și Africa a confirmat aceste constatări.

Lucrarea aduce perspective noi în ce privește examenele de laborator efectuate pentru diagnosticarea bolii PPA utilizând tehnologii de laborator ce au dus la dezvoltarea unor metode de testare mai sensibile și specifice. Aceste îmbunătățiri facilitează detectarea mai rapidă și mai precisă a bolii, ceea ce este crucial pentru confirmarea focarelor de PPA. Metodele de analiză utilizate sunt inovative și îmbunătățesc modul de colectare a probelor, analiză și interpretarea datelor ce au implicații practice fiind aplicabile ulterior în teren de către medicii veterinari și vânători. Metoda Real Time PCR utilizată în laboratorul de biologie moleculară din cadrul D.S.V.S.A Constanța este o tehnică de testare moleculară ce vizează secvențe unice ADN viral PPA și permite amplificarea unor cantități mici de ADN viral PPA, această constatare a fost făcută prin compararea valorilor CT obținute din probe de organe în comparație cu probe de sânge pe EDTA, de la mistreți și porci domestici, colectate pe o perioadă de 3 ani (2019-2021). În urma comparației făcute între valorile CT obținute între cele două matrici am concluzionat că matricea sânge pe EDTA oferă o specificitate mai mare pentru detectarea genomului viral PPA față de matricea organ. Medici veterinari pot acorda prioritate testelor de sânge în cazurile suspectate de PPA. Acest lucru poate facilita intervențiile în timp util, reducând potențial răspândirea virusului în rândul porcilor domestici și mistreților.

Lucrarea aduce perspective noi prin comparația rezultatelor obținute în diagnosticul virusului PPA la porcii domestici și mistreți pe perioada 2019 – 2023, aducând mai multe contribuții semnificative la înțelegerea și gestionarea bolii PPA în județul Constanța, printr-o evaluare cuprinzătoare a două metode de diagnostic PCR și ELISA, evidențiind modul în care aceste metode pot fi utilizate în mod eficient împreună pentru a monitoriza infecțiile PPA atât la mistreți, cât și la porcii domestici, oferind un cadru pertinent pentru diagnosticare.

Studiul privind rezultatele obținute prin folosirea testul ELISA, pe perioada 2019-2023 ca măsură de supraveghere a bolii PPA în județul Constanța, au arătat că testele ELISA sunt mai utile în monitorizarea progresului boli sau a eficacității planului de combatere PPA. De exemplu, prin măsurarea periodică a nivelurilor anticorpilor anti-PPA, medicii veterinari pot verifica dacă planul de combatere aplicat a funcționat sau dacă sunt necesare ajustări. Nu numai că ajută la confirmarea unui diagnostic, dar ajută și la adaptarea planurilor de monitorizare a progresiei bolii PPA.

Din dorința de a ajuta și mai mult medicii veterinari din teren pentru a diagnostica cât mai rapid și cât mai precis a bolii PPA am corelat detectarea cât mai rapidă a semnelor clinice asociate cu stadiul de viremie PPA, bazându-ne pe interpretarea valorilor asociate compuşilor din sânge în special a valorilor obținute pentru parametrul WBC la care am constatat o corelare între creșterea valorii acestui parametru peste limitele normale în stadiul inițial al perioadei de viremie și scăderea valorii acestui parametru sub limitele normale în perioada de replicare virală și eliminare a virusului.

Impactul PPA asupra industriei globale a porcilor este semnificativ. Un vaccin eficient și sigur ar putea fi un instrument valoros pentru țările în care PPA este endemică și ar putea ajuta la eradicarea virusului la populațiile de porci și mistreți.

BIBLIOGRAFIE

1. Actualizarea situației privind evoluția Pestei Porcine Africane (PPA) – A.N.S.V.S.A. (2023, March 23).
2. Bao, J., Zhang, Y., Shi, C., Wang, Q., Wang, S., Wu, X., Cao, S., Xu, F., Wang, Z. Genome-Wide Diversity Analysis of African Swine Fever Virus Based on a Curated Dataset. *Animals*, 12(18), 18, (2022).
3. Blome, S., Gabriel, C., Beer, M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Research*, 173(1), 122–130, (2013).

4. Chapman, D. A. G., Tcherepanov, V., Upton, C., Dixon, L. K. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. The Journal of General Virology, 89(2), 397–408, (2008).
5. Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D. U., Dixon, L. K. African swine fever: How can global spread be prevented? Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 364(1530), 2683–2696, (2009).
6. Davies, K., Goatley, L. C., Guinat, C., Netherton, C. L., Gubbins, S., Dixon, L. K., Reis, A. L. Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate. Transboundary and Emerging Diseases, 64(2), 425–431, (2017).
7. de Carvalho Ferreira, H. C., Weesendorp, E., Elbers, A. R. W., Bouma, A., Quak, S., Stegeman, J. A., Loeffen, W. L. A. African swine fever virus excretion patterns in persistently infected animals: A quantitative approach. Veterinary Microbiology, 160(3), 327–340, (2012).
8. Decision—2003/422—EN - EUR-Lex. (n.d.). Retrieved April 29, (2025).
9. Deng, Q., Wang, Y., Wang, X., Wang, Q., Yi, Z., Xia, J., Hu, Y., Zhang, Y., Wang, J., Wang, L., Jiang, S., Li, R., Wan, D., Yang, H., Yin, Y. Effects of dietary iron level on growth performance, hematological status, and intestinal function in growing-finishing pigs. Journal of Animal Science, 99(1), 2, (2021).
10. Domelevo Entfellner, J.-B., Okoth, E. A., Onzere, C. K., Upton, C., Njau, E. P., Höper, D., Henson, S. P., Oyola, S. O., Bochere, E., Machuka, E. M., Bishop, R. P. Complete Genome Sequencing and Comparative Phylogenomics of Nine African Swine Fever Virus (ASFV) Isolates of the Virulent East African p72 Genotype IX without Viral Sequence Enrichment. Viruses, 16(9), 1466, (2024).
11. Gallardo, C., Casado, N., Soler, A., Djadjovski, I., Krivko, L., Madueño, E., Nieto, R., Perez, C., Simon, A., Ivanova, E., Donescu, D., Milicevik, V., Chondrokouki, E., Nurmoja, I., Frant, M., Feliziani, F., Václavěk, P., Pileviciene, S., Marisa, A. A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. Frontiers in Veterinary Science, 10, 1112850, (2023).
12. Garigliany, M., Desmecht, D., Tignon, M., Cassart, D., Lesenfant, C., Paternostre, J., Volpe, R., Cay, A. B., van den Berg, T., Linden, A. Phylogeographic Analysis of African Swine Fever Virus, Western Europe, 2018. Emerging Infectious Diseases, 25(1), 184–186, (2019).
13. Gaudreault, N. N., Madden, D. W., Wilson, W. C., Trujillo, J. D., Richt, J. A. African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. Frontiers in Veterinary Science, 7, (2020).
14. Guidelines | Community Reference Laboratory for African Swine Fever. (n.d.). Retrieved April 28, (2025).
15. Guinat, C., Reis, A. L., Netherton, C. L., Goatley, L., Pfeiffer, D. U., Dixon, L. Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission. Veterinary Research, 45(1), 93, (2014).
16. Karalyan, Z., Zakaryan, H., Arzumanyan, H., Sargsyan, K., Voskanyan, H., Hakobyan, L., Abroyan, L., Avetisyan, A., Karalova, E. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. BMC Veterinary Research, 8, 18, (2012).
17. Kolbasov, D., Titov, I., Tsybanov, S., Gogin, A., Malogolovkin, A. African Swine Fever Virus, Siberia, Russia, 2017. Emerging Infectious Diseases, 24(4), 796–798, (2018).
18. Manual Operational Pentru Intervenția în Focarele De Pestă Porcină Africană – Editia 4 – 2019 – A.N.S.V.S.A. (2019, August 20).
19. Mur, L., Atzeni, M., Martínez-López, B., Feliziani, F., Rolesu, S., Sanchez-Vizcaino, J. M. Thirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance. Transboundary and Emerging Diseases, 63(2), 165–177, (2016).
20. Negrin, R., Frías Lepoureau, M. T. Eradication of African Swine Fever in Cuba (1971 and 1980) WILEY (pp. 125–132), (2002).
21. Neilan, J. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Zsak, L., Burrage, T. G., Borca, M. V., Carrillo, C., Rock, D. L. A BIR Motif Containing Gene of African Swine Fever Virus, 4CL, Is Nonessential for Growth in Vitro and Viral Virulence. Virology, 230(2), 252–264, (1997).
22. Oh, S.-I., Nguyen, T. T. H., Yang, M.-S., Nga, B. T. T., Bui, V. N., Le, V. P., Yi, S.-W., Kim, E., Hur, T.-Y., Lee, H. S., Kim, B. Blood parameters and pathological lesions in pigs experimentally infected with Vietnam's first isolated African swine fever virus. Frontiers in Veterinary Science, 9, 978398, (2022).
23. Oh, S.-I., Nguyen, T. T. H., Yang, M.-S., Nga, B. T. T., Bui, V. N., Le, V. P., Yi, S.-W., Kim, E., Hur, T.-Y., Lee, H. S., Kim, B. Blood parameters and pathological lesions in pigs experimentally infected with Vietnam's first isolated African swine fever virus. Frontiers in Veterinary Science, 9, 978398, (2022).
24. Ramiro-Ibáñez, F., Ortega, A., Ruiz-Gonzalvo, F., Escribano, J. M., Alonso, C. Modulation of immune cell populations and activation markers in the pathogenesis of African swine fever virus infection. Virus Research, 47(1), 31–40, (1997).
25. Regulament—2016/429—RO - EUR-Lex. (n.d.). 26 Aprilie, (2025).

26. Rowlands, R. J., Michaud, V., Heath, L., Hutchings, G., Oura, C., Vosloo, W., Dwarka, R., Onashvili, T., Albina, E., Dixon, L. K. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. Emerging Infectious Diseases, 14(12), 1870–1874, (2008).
27. Sargsyan, M. A., Voskanyan, H. E., Karalova, E. M., Hakobyan, L. H., Karalyan, Z. A. Third wave of African swine fever infection in Armenia: Virus demonstrates the reduction of pathogenicity. Veterinary World, 11(1), 5–9, (2018).
28. Self-declared Disease Status—World Organisation for Animal Health. (n.d.). WOA - World Organisation for Animal Health. 26 Aprilie, 2025.
29. Suárez, C., Salas, M. L., Rodríguez, J. M. African Swine Fever Virus Polyprotein pp62 Is Essential for Viral Core Development. Journal of Virology, 84(1), 176–187, (2010).
30. Terrestrial Code Online Access. (n.d.). WOA - World Organisation for Animal Health. 11 Martie, 2025.
31. Tokarnia, C. H., Peixoto, P. V., Döbereiner, J., Barros, S. S., Riet-Correa, F. O surto de peste suína africana ocorrido em 1978 no município de Paracambi, Rio de Janeiro. Pesquisa Veterinária Brasileira, 24(4), (2004).
32. Vega, I. D. L., Viñuela, E., & Blasco, R. Genetic variation and multigene families in african swine fever virus. Virology, 179(1), 234–246, (1990).
33. Wang, G., Xie, M., Wu, W., Chen, Z. Structures and Functional Diversities of ASFV Proteins. Viruses, 13(11), 2124, (2021). 173.
34. Wang, L., Luo, Y., Zhao, Y., Gao, G. F., Bi, Y., Qiu, H.-J. Comparative genomic analysis reveals an “open” pan-genome of African swine fever virus. Transboundary and Emerging Diseases, 67(4), 1553–1562, (2020).
35. Wilkinson, P. J., Donaldson, A. I. Transmission studies with African swine fever virus. The early distribution of virus in pigs infected by airborne virus. Journal of Comparative Pathology, 87(3), 497–501, (1977)

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN EXTENSO ÎN CURSUL STAGIULUI DE DOCTORAT ÎN REVISTE ISI ȘI BDI

1. **Anghel (Cireasă) L.**, Tănasă (Acreței) V., Roșoiu N., African Swine Fever Virus Genome Detection Using the Real Time qPCR Polymerase Chain Reaction Method – Comparison of two Sample Specimen (Blood and Organs), Academy of Romanian Scientists Annals, Series on Biological Sciences, 11(1), 81 – 90, (2022) www.aos.ro Open Acces Journal, DOI <https://doi.org/10.56082/annalsarscibio.2022.1.81>, BDI
2. **Anghel (Cireasă) L.**, Tănasă (Acreței) V., Chifiriuc C., Roșoiu N., Comparison of blood parameters in pigs with confirmed African Swine Fever from an outbreak in Constanta County versus healthy pig, Journal of Agroalimentary Processes and Tehnologies, 28,(2), 171-174, (2022) jurnal-of-agroalimentary.ro BDI, IFIS (International Food Information Service) ; CAS (Chemical Abstracts Service)
Food Science Central from the publishers of FSTA, Food Science and Technology Abstracts; European Virtual Institute for Speciation Analysis (EVISA); Science and Engineering Journal Abbreviations; Google Scholar; EBSCO; CAB
3. **Anghel (Cireasă) L.**, Tănasă (Acreței) Virginia., Vrancianu C., Roșoiu N., The use of PCR and ELISA method to detect and monitor the infection of domestic pigs and wild boars with African Swine Fever Virus, Journal of Agroalimentary Processes and Tehnologies, 29 (1), 30-33, (2023) jurnal-of-agroalimentary.ro BDI, IFIS (International Food Information Service) ; CAS (Chemical Abstracts Service)
Food Science Central from the publishers of FSTA, Food Science and Technology Abstracts; European Virtual Institute for Speciation Analysis (EVISA); Science and Engineering Journal Abbreviations; Google Scholar; EBSCO; CAB
4. **Anghel (Cireasă) L.**, Tănasă (Acreței) V., Vrancianu C., Roșoiu N., The detection and monitorization of the African Swine Fever Virus infection in domestic pigs and wild boars, Journal of Agroalimentary Processes and Tehnologies, 29(2), 107-110, (2023) jurnal-of-agroalimentary.ro BDI, IFIS (International Food Information Service) ; CAS (Chemical Abstracts Service) Food Science Central from the publishers of FSTA, Food Science and Technology Abstracts; European Virtual Institute for Speciation Analysis (EVISA); Science and Engineering Journal Abbreviations; Google Scholar; EBSCO; CAB
5. Tănasă (Acreței) V., Negreanu – Pârjol T., Chifiriuc C., Popoviciu R., **Anghel (Cireasă) L.**, Roșoiu N., Preliminary data regarding polyphenols, carotenoids and flavonoids content correlated with antioxidant activity of some taraxacum sp. fluid extracts, Academy of Romanian Scientists Annals, Series on Biological Sciences, 11(1), 31 – 44, (2022) www.aos.ro Open Acces Journal, DOI <https://doi.org/10.56082/annalsarscibio.2022.1.31> BDI
6. Tănasă (Acreței) V., Negreanu-Pirjol T., Chifiriuc C., Popoviciu R., Petcu A., **Anghel (Cireasă) L.**, Roșoiu N., Carotenoids content in plant organs of Taraxacum officinale species from two romanian

regions, **Academy of Romanian Scientists Annals, Series on Biological Sciences**, 12(1), 71-81, (2023) www.aos.ro Open Acces Journal, DOI [10.56082/annalsarscibio.2023.1.71](https://doi.org/10.56082/annalsarscibio.2023.1.71), WOS, ISI Clarivate Analytics

7. Tanasă, (Acreței) V., Negreanu-Pirjol T., Olariu L., Negreanu-Pirjol B.-S., Lepadatu A.-C., **Anghel (Cireasa) L.**, Rosoiu, N., Bioactive Compounds from Vegetal Organs of Taraxacum Species (Dandelion) with Biomedical Applications, **International Journal of Molecular Sciences**, 26(2), 450, (2025) <https://www.mdpi.com/journal/ijms> MDPI, PubMed Impact Factor 4,5
8. **Anghel (Cireasa) Larisa.**, Danea, V.-G., Maria Virginia Tanasa (Acreței), Natalia Roșoiu, Statistical aspects of data collected from african swine fever virus *OUTBREAK'S* in Constanța county, **Academy of Romanian Scientists Annals, Series on Biological Sciences**, 14, (1), 57-97, (2025), www.aos.ro Open Acces Journal, DOI [10.56082/annalsarscibio.2025.1.57](https://doi.org/10.56082/annalsarscibio.2025.1.57), EBSCO, WOS, ISI Clarivate Analytics
9. **Anghel (Cireasa) Larisa.**, Vrancianu, C., Bâlțeanu, V.-A., Tanasă (Acreței), V. Roșoiu, N, The prevalence of African Swine Fever cases in pigs and wild boars in a key area of outbreak origin from Romania during a six-year period, **Jurnal of Veterinary Science**, 26 (4), 1-10, (2025). <https://vetsci.org/> PubMed PubMed Central Web of Science Scopus Google Scholar Crossref Impact Factor 1,5
10. **Anghel (Cireasa) Larisa.**, Vrancianu, C., Bâlțeanu, V.-A., Tanasă (Acreței), V. Roșoiu, N, Six-year surveillance of African Swine Fever in pigs and wild boars in an outbreak-origin region of Romania, **Jurnal of Veterinary Science**, 26 (5), 1-10, (2025). <https://vetsci.org/> PubMed PubMed Central Web of Science Scopus Google Scholar Crossref Impact Factor 1,5

LUCRĂRI SUSȚINUTE LA DIVERSE MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE ȘI PUBLICATE SUB FORMĂ DE REZUMAT

1. **Anghel (Cireasa) L.**, Chifiriuc C., Roșoiu N., African Swine Fever, Affecting Domestic Pigs and Wild Boars, Through the Investigations Used in the Molecular Biology Laboratory Allowing the Detection of the Viral Genome by Real Time PCR Technique, **Academia Oamenilor de Știință din România, Conferința Științifică de Toamnă**, 53, (2021).
2. **Anghel (Cireasa) L.**, Tanasa (Acreței) M.-V., Roșoiu N., Detectarea Genomului Virusului Pestei Porcine Africane Folosind Metoda Real Time qPCR a Polimerazei În Lanț. Comparatie între doua tipuri de matrici (sange și organe), **Conferința Științifică de Primăvară a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 20, (2021).
3. **Anghel (Cireasa) L.**, Chifiriuc C., Roșoiu N., African Swine Fever virus genome detection using Real Time q PCR method – Comparison of two sample specimen (blood and organ), **Conferința Științifică de Primăvară a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 100-101, (2022).
4. **Anghel (Cireasa) L.**, Chifiriuc C., Roșoiu N., Setting the Sole Purpose as Well as the Advantages and Disadvantages of Using PCR (Polymerase Chain Reaction) versus ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay) Laboratory Techniques Used to Confirm the Presence of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs and Wild Boars, **Conferința științifică de Toamnă a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 85-86, (2022).
5. **Anghel (Cireasa) L.**, Chifiriuc C., Roșoiu N., Epidemiological situation of African Swine Fever and measures applied to prevent, combat and control the disease in Constanța County, **Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului, Regele Mihai I al României din Timișoara, Multidisciplinary Conference on Sustainable Development, Scientific Programme, Secțiunea Postere P.10.**, (2022)
6. **Anghel (Cireasa) L.**, Tanasa (Acreței) M.-V., Mardare R., Roșoiu N., Comparison of blood parameters in pigs with confirmed African Swine Fever from an outbreak in Constanta County versus healthy pig, **Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului, Regele Mihai I al României din Timișoara, International Scientific Symposium Young researchers and scientific research in life science of Bachelor, Master and Ph.D. students , Section: Young researcher in food engineering, Secțiunea Postere P7.**, (2022).
7. **Anghel (Cireasa) L.**, Tanasa (Acreței) M.-V., Vrancianu C.-O., Roșoiu N., The use of PCR and ELISA method to detect and monitor the infection of domestic pigs and wild boars with African Swine Fever Virus, **Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului, Regele Mihai I al României din Timișoara, Multidisciplinary Conference on Sustainable Development, Secțiunea Postere P.8.**, (2023).
8. Tanasa (Acreței) M.-V., Negreanu-Pirjol T., Chifiriuc C., Popoviciu D.R., **Anghel (Cireasa) L.**, ROSOIU N., The content of carotenoids in different plant organs of *Taraxacum officinale* (L.) species

from two different regions of Romania, **Conferința științifică de Primăvară a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 72-74, (2023).

9. Anghel (Cireașa) L., Chifiriuc C., Roșoiu N., Complete Blood count of pigs infected with African Swine Fever versus healthy pigs, **Conferința Științifică de Primăvară a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 83-84, (2023).
10. Tanasa (Acreței) M-V., Negreanu-Pirjol T., Chifiriuc C., Popoviciu D.R., Anghel (Cireașa) L., Roșoiu N., Polyphenols, Flavonoids and Anthocyanins Content in Hydroalcoholic Macerates of *Taraxacum Officinale* Species from Transylvania Area, **Conferința Științifică de Toamna a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 103-104, (2023).
11. Tanasa (Acreței) M-V., Negreanu-Pirjol T., Chifiriuc C., Negreanu-Pirjol B-S., Popoviciu D.R., Anghel (Cireașa) L., Roșoiu N., Total antioxidant capacity and antimicrobial activity of some fluid extracts from plant organs of *Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H. Wigg., **Universitatea Ovidius din Constanța, Facultatea de Farmacologie, Simpozion Terapii Alternative și Complementare (Homeopatie/Fitoterapie)**”, seventh edition, 27-28 octombrie 2023, Constanta, România, **Secțiunea Postere P.21**, (2023).
12. Tanasa (Acreței) M-V., Negreanu-Pirjol T., Chifiriuc C., Popoviciu D.R., Anghel (Cireașa) L., Roșoiu N., Total Polyphenols, Flavonoids and Ascorbic Acid Content in Hydroalcoholic Extracts from Plant Organs of the *Taraxacum Officinale* Species of Different Romania Areas, **Conferința Științifică de Primavara a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 95-96, (2024).
13. Anghel (Cireașa) Larisa, Tanasa M-V., Vrancianu C.O., Roșoiu N., The use of PCR and Elisa method to detect and monitor the infection of domestic pigs and wild boars with African Swine Fever Virus, **Conferința Științifică de Primavara a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 111-112, (2024).
14. Tanasa (Acreței) M-V., Negreanu-Pirjol T., Popoviciu D.R., Anghel (Cireașa) L., Marinaș I.C., Chifiriuc M.C., Roșoiu N., Antimicrobial Activity of Hydroalcoholic Extracts from Plant Organs of *Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H. Wigg., **Conferința Științifică de Toamna a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 103-104, (2024).
15. Anghel (Cireașa) L., Tanasa Acreței M-V., Vrancianu C.O., Roșoiu N., The importance of detecting the genome of the African swine fever virus as quickly as possible using the Real Time qPCR technique to prevent the transmission of the disease by applying surveillance and restriction measures, **Conferința Științifică de Toamna a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 107-108, (2024).
16. Tanasa (Acreței) M-V., Negreanu-Pirjol T., Popoviciu D.R., Anghel (Cireașa) L., Roșoiu N., Hydroalcoholic Macerates from Plant Organs of *Taraxacum officinale* Species from Southeast Area of Romania, **Conferința Științifică de Primavara a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 112-113, (2025).
17. Anghel (Cireașa) L., Danea V-S., Tanasa Acreței M-V., Roșoiu N., Statistical Aspects of Data Collected from African Swine Fever Outbreaks in Constanta County, **Conferința Științifică de Primavara a Academiei Oamenilor de Știință din România**, 114-115, (2025).