

Anexă
la Ordinul Agenției Naționale
pentru Siguranța Alimentelor
nr. 581 din 29.10.2018



Republica Moldova

GVERNUL REPUBLICII MOLDOVA

AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR

**I.P. CENTRUL REPUBLICAN DE DIAGNOSTICĂ VETERINARĂ
SECȚIA VIRUSOLOGIE**

MANUAL DE DIAGNOSTIC

pentru

BOALA DE NEWCASTLE

CHIȘINĂU 2018

CUPRINS

Capitolul I - Introducere, obiective și definiții	3
Capitolul II: Descrierea bolii de Newcastle și diagnosticul diferențial.....	3
1. Etiologie și virulență	3
2. Semne clinice la păsările infectate.....	5
3. Modificări anatomopatologice la păsările infectate.....	5
4. Diagnostic diferențial	6
Capitolul III: Criterii care conduc la suspiciunea de boala de Newcastle într-o exploatație de păsări - diagrama flux.....	6
Capitolul IV	8
1. Proceduri generale pentru prelevarea și transportul probelor	8
2. Proceduri care trebuie aplicate în conformitate cu Directiva Consiliului 66/1992/EEC transpusă în Norma sanitară veterinară privind măsurile de combatere a bolii de Newcastle (pseudopesta aviară) aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 1085 din 14.12.2017.....	10
Capitolul V- Diagnosticul prin examen virusologic și evaluarea rezultatelor	10
Capitolul VI - Identificare și caracterizare a genomului specific virusului pseudopestei aviare	12
Capitolul VII - Teste de patogenitate și evaluarea rezultatelor	19
Capitolul VIII - Examene serologice și evaluarea rezultatelor	20
Capitolul IX - Sisteme de monitorizare asociate cu vaccinarea	22
Capitolul X – Cerințe minime de protecție pentru transportul probelor.....	22
Capitolul XI - Expedierea tulpinilor de virus și probelor către Laboratorul Internațional de Referință	23
Capitolul XII – Cerințe de biosecuritate în laboratoarele de diagnostic a Bolii de Newcastle	24
Bibliografie selectivă	26

CAPITOLUL I

Introducere, obiective și definiții

1. Scop : asigurarea de proceduri de diagnostic uniforme pentru boala de Newcastle (BN)

2. Obiective:

- asigură orientarea și cerințele pentru proceduri de diagnostic, proceduri de recoltare a probelor și criteriile de evaluare a rezultatelor examenelor clinice, necropsice și a testelor de laborator pentru un diagnostic corespunzător al bolii de Newcastle;
- stabilește cerințe minime de biosecuritate și standarde de calitate pentru transportul de probe la Laboratorul Național de Referință pentru Influența Aviară și BN;
- stabilește testele de laborator ce pot fi aplicate pentru diagnosticul bolii de Newcastle și tipizarea izolatelor de virus;
- “proba pentru diagnostic” reprezintă orice material inclusiv carcasa întregă transportată la laborator, dar nu animale vii infectate;
- confirmarea bolii de Newcastle la păsările domestice trebuie realizată în acord cu aceste proceduri, cu metodele de prelevare a probelor și criteriile pentru evaluarea rezultatelor de laborator din acest manual de diagnostic pe baza unuia sau mai multor criterii:
 - a. izolarea de virus, detecția de material genetic în probele (țesuturi, organe, sânge sau excreții) prelevate de la păsări domestice;
 - b. prezenta semnelor clinice și modificărilor anatomopatologice la păsările afectate;
 - c. detecția anticorpilor specifici în probele de sânge de la păsările bolnave;
 - d. detecția anticorpilor specifici în scopul testării imunității postvaccinale;
- procedurile de diagnostic, metodele de prelevare a probelor și criteriile de evaluare a rezultatelor de laborator trebuie să fie:
 - a. în acord cu manualul de diagnostic;
 - b. aprobate de către autoritatea competentă cu condiția ca:
 - ▶ sensibilitatea și specificitatea testelor de laborator autorizate să fie confirmate prin teste comparative organizate de către Laboratorul internațional de referință pentru BN;
 - ▶ acolo unde evaluarea de laborator nu a fost organizată de către Laboratorul internațional de referință pentru un anumit test, sensibilitatea și specificitatea sa fie validate de către laboratorul național de referință, astfel încât testul de laborator să corespundă cu scopul pentru care este utilizat ; rezultatele acestei validări trebuie trimise la Laboratorul internațional de referință pentru evaluare.

CAPITOLUL II

Descrierea bolii de Newcastle și diagnosticul diferențial

1. Etiologie și virulență

Boala de Newcastle (ND) este produsă de paramyxovirus tip I (APMV-1), care face parte din genul *Avulavirus*, familia *Paramyxoviridae*. Paramyxovirusurile izolate de la speciile aviare au fost clasificate prin testare serologică în 9 serotipuri de la APMV 1 la APMV 9. Virusul bolii de Newcastle este APMV-1. Principalele paramyxovirusuri aviare și apartenența lor sunt redată în tabelul de mai jos:

Tulpina de virus	Gazde	Boala produsă la păsările domestice infectate pe cale naturală
APMV-1/Virusul bolii de Newcastle	numeroase	Foarte răspândită în toată lumea, evoluează de la boală gravă la inaparentă, depinzând de tulpină și gazdă
APMV 2/pui/California/Yucaipa/56	Curci, vrăbii	Răspândită, probabil în toată lumea, semne clinice respiratorii ușoare sau scăderi ale producției de ouă

APMV-3Acurcă/Wisconsin/68	Curci	Numai la curci, în America de N și Europa, semne clinice respiratorii ușoare, dar probleme grave ale producției de ouă agravate de exacerbarea microorganismelor sau a factorilor de mediu
APMV-3A/papagal cu coadă lungă/Olanda/449/75	Psitacine, vrăbii	Nu este raportată infecția la păsările domestice
APMV-4/rață/Hong Kong/D3/75	Rațe	Nu este cunoscută infecția
APMV-5/papagal pitic/Japonia/Kunitachi/74	Papagal pitic lori	Nu este raportată infecția la păsările domestice
APMV-6/rață/HongKong/199/77	Rațe	Semne clinice respiratorii ușoare și mortalitate oarecum crescută la curci; infecția nu este raportată la rațe sau găște
APMV-7/turturică/Tennessee/4/75	Porumbei, turturele	Infecția naturală la curci și struți cu semne clinice respiratorii
APMV-8/gâscă/Delaware/1053/76	Rațe, găște	Nu s-au raportat infecții la păsările domestice
APMV-9/rață/New York/22/78	Rațe	Nu este cunoscută infecția

Tulpinile de virus ale bolii de Newcastle diferă mult în raport cu gravitatea bolii pe care o pot produce la păsări. Tulpinile mai puțin patogene pot produce boală severă când sunt prezente alte microorganisme sau datorită condițiilor de mediu necorespunzătoare. Metoda de diagnostic recomandată este izolarea virusului, urmată de caracterizare și identificare.

De la prima menționare în 1926, boala de Newcastle este considerată endemică în multe țări. Vaccinările profilactice s-au practicat în toate țările, îndeosebi în cele care practică comerț.

Una din caracteristicile specifice diferitelor tulpini de virus ale bolii de Newcastle a fost marea variabilitate a patogenității la puii de găină. Tulpinile de virus ale bolii de Newcastle au fost grupate în 5 patotipuri pe baza semnelor clinice observate la puii infectați astfel:

a) Velogene viscerotrope - cu mare patogenitate, producând forme de boală cu leziuni intestinale hemoragice, frecvent observate.

b) Velogene neurotrope - produc mortalitate mare, de obicei cu manifestări respiratorii și nervoase.

c) Mezogene - produc forme de boală cu semne respiratorii, ocazional nervoase, dar cu mortalitate redusă.

d) Lentogene sau respiratorii - produc forme de boală cu infecție respiratorie medie sau subclinică.

e) Asimptomatice enterice – de obicei cu manifestări enterice subclinice.

Datorită faptului că semnele clinice sunt variabile și diagnosticul poate fi complicat ca urmare a răspunsurilor diferite la infecție a diferitelor gazde, numai semnele clinice nu pot reprezenta o bază sigură pentru diagnosticul bolii de Newcastle. Totuși, semnele clinice caracteristice și leziunile asociate patotipurilor virulente vor da siguranță în suspiciunea de boală.

În condiții naturale, boala de Newcastle afectează în primul rând găinile și bibilicile, urmând în ordinea scăderii sensibilității, fazanii, curcile și păunii. Rațele, găștele și lebedele nu sunt receptive în mod natural. Porumbeii domestici și sălbatici se îmbolnăvesc sporadic, cu tulburări predominant nervoase.

Sursa principală de infecție o reprezintă păsările bolnave care elimină virusul prin secrețiile respiratorii, fecale, ouă și chiar prin foliculii penelor, precum și carcasele păsărilor bolnave. Păsările trecute prin boală, ca și cele rezistente și care fac forme oculute, pot fi purtătoare și excretoare de virus timp îndelungat. Pătrunderea virusului în organism se face de obicei, pe cale respiratorie și digestivă. Transmiterea verticală este limitată de acțiunea letală a virusului asupra embrionilor.

Boala de Newcastle este o boală foarte contagioasă, evoluează sub formă de epizootii. Când apare în efective neimunizate și este produsă de tulpini velogene evoluează exploziv, cu morbiditate ridicată (80-90%) și mortalitate mare (90%), având tendința de extindere teritorială. Fără a fi sezoniere, focarele sunt mai frecvente toamna-primăvara, datorită acțiunii conservante a frigului asupra virusului și completării efectivelor în micile gospodării cu tineret neimunizat. Boala de Newcastle poate apărea și în efectivele supuse imunizărilor. În aceste cazuri boala poate evolua, ca și în focarele vechi, cu procentul de morbiditate și mortalitate neînsemnat și cu o evoluție atipică în salturi, caracterizată printr-un număr mai mare sau mai mic de cazuri mortale, la intervale de 4-5 sau mai multe zile. Boala capătă adeseori caracter staționar și persistă un timp îndelungat. Boala de Newcastle poate să evolueze atipic și inaparent, nu numai în efectivele vaccinate, dar și în unități unde nu s-au făcut vaccinări în urma unei infecții cu tulpini slab virulente.

Virusul se replică la poarta de intrare și se răspândește în toate organele vascularizate, determinând hemoragii și necroze în tubul digestiv, congestii, edem și infiltrații limfocitare în pulmon și degenerescență neuronală, focare gliale și infiltrații limfocitare perivasculare în sistemul nervos.

2. Semne clinice la păsările bolnave

Perioada de incubație este de 4-6 zile.

- ✓ *Forma supraacută* evoluează foarte repede, cu tulburări generale grave, agonie și moarte în câteva ore (4-20 ore);
- ✓ *Forma acută sau tipică* cea mai frecventă evoluează cu febră (43-44°C), horiplumație, cianoza crestei și bărbițelor, indigestie ingluvială, diaree apoasă de culoare verzuie, cu sau fără strii de sânge, deshidratare.

Tulburările respiratorii constau în dispnee și respirație horcăitoare. Pentru a se elibera de mucusul care obstruează căile respiratorii anterioare, păsările scot un zgomot asemănător strănutului.

Tulburările nervoase se manifestă prin pareze, monoplegii sau paraplegii, opistotonus sau emprostotonus, tulburări vestibulare, contracții spasmodice ale capului sau membrilor, torticolis.

La păsările ouătoare scade producția de ouă, iar ouăle au coaja depigmentată, moale sau sunt fără coajă; albusul este mai fluid și camera de aer mai mare.

Procentul de mortalitate poate depăși 90% în efectivele receptive.

- ✓ *Forma subacută* evoluează cu o simptomatologie asemănătoare, însă cu predominarea tulburărilor nervoase. Mortalitatea este de 50%;
- ✓ *Forma cronică* se întâlnește la păsările rezistente, unele se vindecă complet, altele rămân cu tare nervoase.

La celelalte galinacee (fazani, bibilici, curci etc.) se întâlnesc manifestări clinice, bine exprimate.

La *curcă* tabloul clinic este asemănător celui descris la găină, dar boala evoluează mai lent (1-2 săptămâni), cu procent de mortalitate mai mare (50-80%). Puii de curcă prezintă semne clinice digestive și stare de abatere, uneori semne respiratorii și rareori semne nervoase. La curcile adulte ouătoare, producția de ouă scade treptat iar fecunditatea este redusă. Semnele nervoase apar după câteva zile de la debut.

La *păsările sălbatice* (ciori, vrăbii) tabloul clinic este dominat de semnele nervoase.

3. Modificări anatomopatogice la păsările bolnave

- ✓ *Forma supraacută*, fulgerătoare, cu leziuni cataral-hemoragice ale aparatului respirator și digestive. Frecvent, nu se constată nici o modificare macroscopică (necropsie albă).
- ✓ *Forma acută* : creasta și bărbițele cianozate, hemoragii punctiforme pe pielea capului și leziuni de conjunctivită catarală sau de cheratoconjunctivită. Penele din jurul orificiului cloacal sunt murdare de fecale diareice. În cavitatea bucală și nazală se găsesc cantități de mucus filant, gros, gușa este destinsă cu un conținut lichid fermentat. La deschiderea cadavrului, în țesutul conjunctiv subcutanat și intramuscular din regiunea capului și gâtului, se pot găsi infiltrații seroase, cu aspect gelatinos, de culoare gălbuie. Mucoasa bucală și esofagiană sunt hiperemiate, acoperite cu mucus abundent, gros, aderent și amestecat cu particule alimentare. Adeseori se constată hemoragii punctiforme și focare

miliare de necroză acoperite cu o masă cenușie-gălbuie, care se detașează ușor. La nivelul stomacului glandular, la trecerea dintre esofag și proventricul sau dintre proventricul și stomacul muscular, în 70-85% din cazuri se constată pe fond de inflamație catarală, hemoragii punctiforme (proventriculita hemoragică). În stomacul muscular, sub cuticulă, pot fi observate hemoragii de dimensiuni diferite. De asemenea se pot întâlni tiflita și proctita hemoragică. Ficatul este distrofic, de culoare cenușie-gălbuie și cu zone congestive. Foliculii ovarieni sunt hemoragici. Deseori se întâlnesc hemoragii la baza cordului, fața internă a sternului și pe mezenter.

- ✓ *Forma subacută* : aceleași leziuni însă cu caracter hemoragico-necrotic. La nivelul mucoasei intestinale, între cecum și cloacă se întâlnește inflamația hemoragico-necrotică sau difteroidă, sub formă de plăci, constituind *butoni difteroiți pseudopestoși, caracteristici*.

Aceste leziuni tipice pentru pseudopesta aviară pot fi mult mai atenuate în formele ușoare de boală sau sunt absente la pui.

În *formele atipice*, leziunile tubului digestiv pot lipsi sau sunt neînsemnate. Se întâlnesc leziuni de pneumonie exsudativă, laringotraheită catarală sau necrotică și aerosaculită serofibrinoasă.

4. Diagnostic diferențial

Clinic, BN poate fi confundată cu alte afecțiuni respiratorii ale păsărilor, cum sunt :

- *influența aviară* are o contagiozitate ridicată caracterizată clinic prin tulburări generale grave, respiratorii, digestive și nervoase, însoțite de o infiltrație edematoasă a țesutului conjunctiv subcutanat din regiunea capului și gâtului, iar morfopatologic prin diateză hemoragică accentuată și proventriculită hemoragică;

- *bronșita infecțioasă aviară* afectează numai puii în vârstă de 3-5 săptămâni, evoluează enzootic cu semne clinice respiratorii , leziuni la nivelul traheei cu prezența fibrinei în traheea inferioară și bronhii și zone de pneumonie în jurul marilor bronhii, mortalitate mică și cu lipsa leziunilor de la nivelul tubului digestiv;

- *laringotraheita infecțioasă aviară* evoluează enzootic, cu o difuzibilitate mai lentă în efectiv și cu predominarea fenomenelor respiratorii iar leziunile sunt reprezentate de rinită și laringotraheita hemoragică, chiagurile de sânge putând oblitera traheea ;

- *micoplasmoza respiratorie aviară* evoluează enzootic, fără tendință de a difuza în afara focarului. Sunt prezente coriza, laringotraheita și aerosaculita fibrinoasă;

- *pasteureloza aviară* afectează galinaceele și palmipelele, peste vârsta de 2 luni și rareori sub această vârstă. Evoluează enzootic fără tendință de a difuza în afara focarului și cu prezența leziunii de hepatită necrotică miliară;

- *encefalomielita infecțioasă aviară* afectează numai puii în vârstă de până la 2-3 luni, evoluează enzootic cu tulburări nervoase, ca ataxie, incoordonare în mers, paralizie, tremur rapid al capului și gâtului; lipsesc leziunile mucoasei tubului digestiv;

- *boala lui Marek* apare sporadic, evoluează cronic cu tulburări nervoase manifestate prin pierderea echilibrului, contracții spastice ale degetelor, flexarea picioarelor, pierderea echilibrului, extensia exagerată înainte sau lateral a unuia sau ambelor membre (pas de defilare, pas de balerină), paralizii ale aripilor și picioarelor și leziuni la nivelul nervilor (ischiatric și brachial) care sunt îngroșați, cenușii gălbui iar pe secțiuni au aspect sarcomatos, tumoral;

- *tifopuloroza* afectează puii mici , cu tulburări digestive și mortalitate mare iar la adulte cu stare tifică, anemie și ficatul cu aspect bronzat;

- *coriza infecțioasă* evoluează benign, cu semne de coriză, sinuzită și edemul capului, urmate de vindecare spontană.

CAPITOLUL III

Criteria care conduc la suspiciunea de boala de Newcastle într-o exploatație de păsări

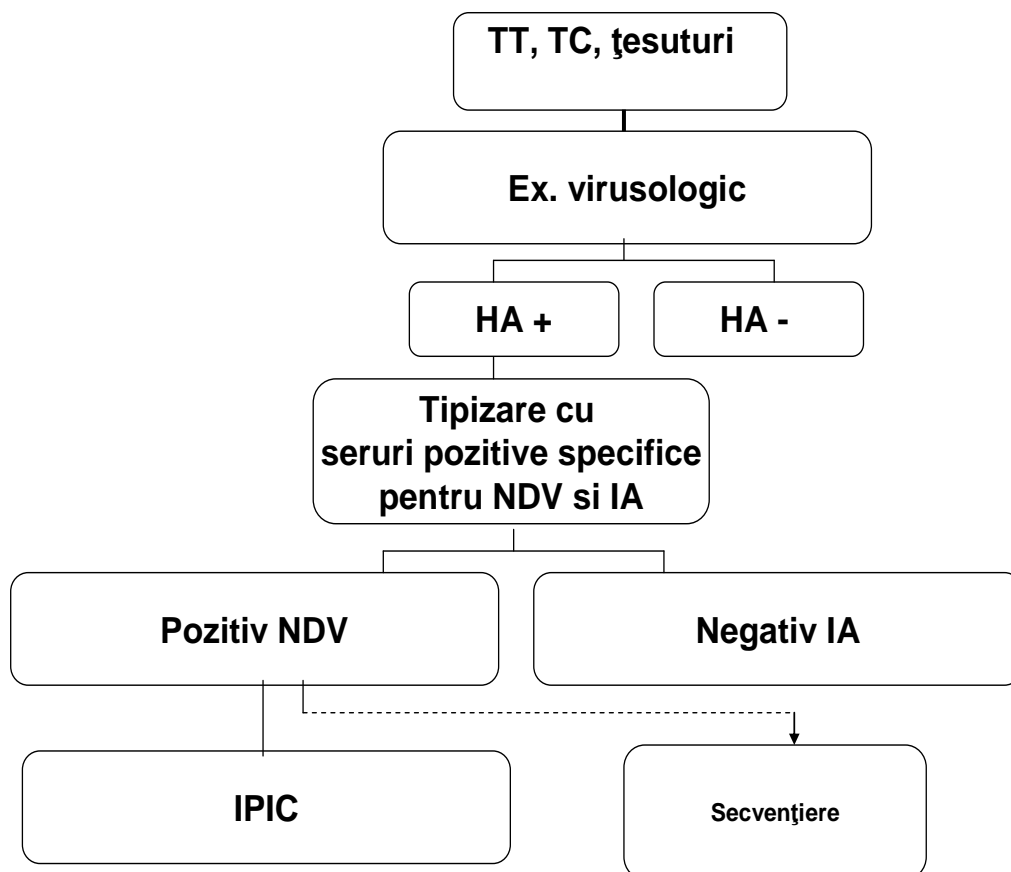
- morbiditate 80-90%;
- mortalitate 90%;
- febră asociată cu indigestie, diaree apoasă de culoare verzuie, cu sau fără strii de sânge;

- tulburări respiratorii;
- tulburări nervoase ;
- infiltrații seroase cu aspect gelatinos în țesutul conjunctiv subcutanat și intramuscular din regiunea capului și gâtului;
- hemoragii punctiforme și focare miliare de necroză pe pielea capului și leziuni de conjunctivită catarală sau de cheratoconjunctivită;
- proventriculită hemoragică - a nivelului stomacului glandular, la trecerea dintre esofag și proventricul sau dintre proventricul și stomacul muscular;
- tiflita și proctita hemoragica - penele din jurul orificiului cloacal sunt murdare de fecale diareice;
- butoni difteroizi (pseudopestoși) - inflamația hemoragico-necrotică sau difteroidă, sub formă de plăci la nivelul mucoasei intestinale, între cecum și cloacă;
- păsările au avut contact direct sau indirect cu o exploatație de păsări care s-a dovedit infectată cu virusul bolii de Newcastle ;
- exploatația a primit păsări transportate cu mijloace de transport care anterior au transportat păsări din sau la o altă exploatație ce ulterior s-a dovedit a fi infectată cu virusul BN;
- au existat contacte cu păsări sălbatice infectate cu virusul bolii de Newcastle;
- există suspiciunea unei posibile expunerii datorită intrării în unitate a unor persoane sau mijloace de transport

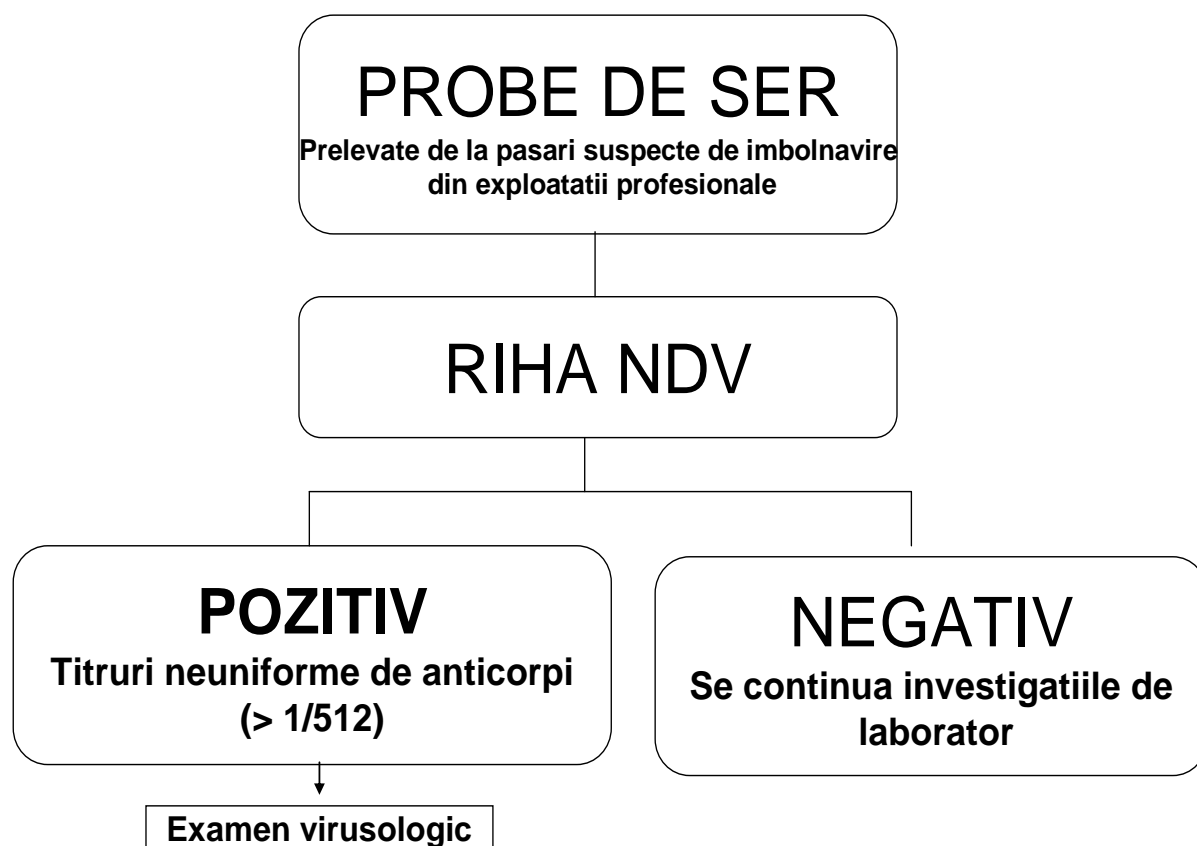
În caz de suspiciune, obligatoriu sunt prelevate probe pentru investigații de laborator.

Diagrama flux

Teste virusologice pentru A 160



Teste serologice pentru A 160



CAPITOLUL IV

1. Proceduri generale pentru prelevarea și transportul probelor

Set standard de probe pentru examene virusologice si serologice

a. Prelevarea probelor de sânge

Pentru examenul serologic este necesară recoltarea de sânge dintr-un vas superficial după care probele vor fi menținute la temperatura camerei până la coagulare. Coagulul va fi decolat cu o baghetă și tuburile vor fi menținute la temperatura camerei până se exprimă serul. Serul este separat, decantat și centrifugat după care poate fi congelat.

Pentru investigația unei **exploatații suspecte sau deja infectate**:

- în cazul **păsărilor nevaccinate**
- setul standard de probe de sange pentru examenul serologic este de minim 20 probe. Eșantioanele de sânge trebuie prelevate de la toate păsările pentru efectivele formate din mai puțin de 20 de păsări și de la 20 de păsări în cazul efectivelor mai numeroase (există astfel o probabilitate de 99 % de a depista măcar un ser pozitiv dacă cel puțin 25 % dintre păsările din efectiv sânt pozitive, indiferent de numărul total al păsărilor din efectiv). În vederea efectuării testului, sângele se lasă să se coaguleze și se extrage serul. Păsările aparent sănătoase sau care aparent s-au refăcut trebuie considerate ținta pentru prelevarea de probe.

b. Prelevarea probelor de tamponare oro-faringeale și traheale

Pentru recoltarea probelor de secreții oro-faringeale și traheale în **scopul izolării de virus** se utilizează tamponare sterile care se introduc în cavitatea executându-se mișcări de rotație cu o presiune moderată, evitându-se lezarea mucoasei.

- setul standard de probe pentru examenul virusologic: 5 păsări bolnave/moarte și/sau cel puțin 20 de tamponare traheale/orofaringeale de la păsările din exploatarea suspectă de infecția cu virusul bolii de Newcastle dacă numărul păsărilor este de 20 sau de la toate pasarile dacă numărul pasarilor este mai mic de 20. Pasarile cu semne clinice sunt considerate ținta pentru prelevarea de probe.

După prelevare, tamponarele se introduc în tuburi cu mediu de transport se mențin la 4⁰C și se expediază rapid la laborator.

c. Prelevarea probelor de tamponare cloacale

Pentru recoltarea probelor de fecale în scopul izolării de virus se utilizează tamponare sterile care se introduc în cloacă executându-se mișcări de rotație cu o presiune moderată, evitându-se lezarea mucoasei.

- setul standard de probe pentru examenul virusologic: 5 pasari bolnave/moarte si/sau cel puțin 20 de tamponare cloacale de la toate pasarile din exploatarea suspecta de infectia cu virusul bolii de Newcastle daca numărul pasarilor este de 20 sau de la toate pasarile daca numărul pasarilor este mai mic de 20. Pasarile cu semne clinice sunt considerate ținta pentru prelevarea de probe.

Tamponarele cloacale vor avea cel puțin 1 g de fecale sau se recoltează fecale proaspete.

După prelevare, tamponarele se introduc în tuburi cu mediu de transport se mențin la 4⁰C și se expediază rapid la laborator.

Autoritatea competentă poate decide asupra probelor standard, însă un subset de probe standard va fi prelevat obligatoriu.

d. Recoltarea de probe de la cadavre

- Se pot expedia: cadavrul întreg (cel puțin 5), organe sau fragmente de organe (creier, pulmon, splină, ficat, cord, intestin, rinichi) recoltate cât mai aseptice. Probele trebuie ambalate separat în recipiente etanșe sau saci dubli de plastic între care se introduce vată îmbibată cu soluție decontaminantă. Este necesară menținerea la temperatura de refrigerare. La exterior pachetul trebuie etichetat vizibil cu adresa laboratorului și cu următorul mesaj: material patologic, perisabil, fragil, nu deschideți în afara LNR pentru boala de Newcastle .

e. Transportul probelor

Imediat după prelevare, probele se vor menține la rece, precum și pe timpul transportului (4⁰C). Dacă transportul la laborator nu se realizează în 24 ore, probele trebuie congelate la și apoi transportate pe gheață.

Tamponarele trebuie plasate în antibiotic sau mediu de transport specific virusurilor.

Probele de țesut pot fi congelate imediat fără mediu de transport și mai târziu vor fi mărunțite și plasate în mediu de transport.

Păstrarea probelor de organe și tamponare pentru o perioadă mai lungă de timp se face la – 80⁰C.

f. Mediu cu antibiotic:

La 100 ml tampon fosfat salin steril pH 7,0 - 7,4 se adaugă:

- penicilină: 1.000.000 UI
- streptomycină: 1 g
- gentamicină: 25 mg
- micostatin (nistatin) : 500.000 UI (sau 4ml nistatin)

Se corectează pH-ul soluției după adăugarea antibioticelor la: 7,0-7,4

Aseptizarea probelor:

- pentru probele de organe: 1g țesut cu 9 ml TFS cu antibiotice (1/10 w/v)
- pentru probele de fecale: 0,5g fecale cu 9,5 ml soluție de antibiotice sau 1 g cu 19 ml soluție de antibiotice (1/20 w/v)
- pentru tamponanele traheale: 1 tampon traheal cu 1ml de soluție de antibiotice (5 TT cu 5 ml soluție de antibiotice)
- pentru tamponanele cloacale: 1 tampon cloacal cu 2 ml de soluție de antibiotice (5 TC cu 10 ml soluție de antibiotice).

2. Proceduri care trebuie aplicate în conformitate cu Directiva Consiliului 66/1992/EEC sânt transpuse în Norma sanitară veterinară privind măsurile de combatere a bolii de Newcastle (pseudopesta aviară) aprobată prin Hotărîrea Guvernului nr. 1085 din 14.12.2017.

CAPITOLUL V

Diagnostic prin examene virusologice și evaluarea rezultatelor

Examene virusologice

Metoda de diagnostic a bolii de Newcastle prin izolarea de virus pe oua embrionate SPF

Principiul metodei

Metoda se bazează pe inocularea suspensiilor în soluții de antibiotice a materialelor patologice reprezentate de tamponane traheale, tamponane cloacale, organe și probe de fecale prelevate de la păsări bolnave și cadavre, în cavitatea alantoică a ouălor embrionate de găina în vârstă de 9-11 zile. Lichidele alantoamniotice ale embrionilor morți sunt testate pentru activitatea hemaglutinantă.

Prezența virusului din familia *Paramyxoviridae* se confirmă prin identificare cu ser pozitiv specific față de cele 9 serotipuri de virus: APMV-1 până la APMV-9.

Materialul supus examinării

Probele de tamponane traheale, tamponane cloacale trebuie prelevate pe mediu cu antibiotice, probele de organe și fecale trebuie să fie cât mai proaspete, conservate și transportate la 4°C.

Tehnica de lucru

Prepararea soluției de antibiotice: în TFS pH 7,0-7,4 se adaugă 2000 UI/ml penicilină, 2 mg/ml streptomycină, 50 μg/ml gentamicină, 5000 UI/ml micostatin. Se corectează pH-ul soluției după adăugarea antibioticelor la: 7,0-7,4.

Aseptizarea probelor:

Probele de tamponane cloacale se plasează în tampon fosfat salin pH 7.0-7,4 cu antibiotice și se spală foarte bine în acest mediu. Aseptizarea se realizează timp de 1-2 ore la temperatura camerei. Pentru tamponane cloacale concentrația de antibiotice este de cinci ori mai mare.

Probele de organe: 1g de țesut mojarat în 9 ml soluție de antibiotice (1/10/w/v) timp de 1-2 ore la temperatura camerei.

Probele de fecale: 0,5 g fecale în 9,5 ml soluție de antibiotice sau 1 g în 19 ml soluție de antibiotice timp de 1-2 ore la temperatura camerei. Pentru probele de fecale concentrația de antibiotice este de cinci ori mai mare.

Centrifugarea probelor:

Probele de creier se vor procesa separat.

Probele de fecale și de organe se centrifughează separat la 1000 r.p.m. timp de 30 minute.

Pregătirea ouălor embrionate pentru inoculare:

Se efectuează mirajul ouălor embrionate pentru delimitarea camerei de aer și poziția embrionului, într-o cameră întunecată cu ajutorul unui ovoscop.

Ouăle embrionate se identifică cu numărul probei ce urmează să fie inoculată.

Se vor inocula câte 5 ouă embrionate pentru fiecare probă.

Inocularea ouălor embrionate cu material patologic:

Aseptizarea locului de inoculare a oului cu tinctură de iod.

Perforarea cojii oului.

Inocularea de material patologic în cavitatea alantoamniotică a unei cantități de 0,2 ml cu ajutorul unei seringi.

Aseptizarea locului de inoculare a oului cu tinctură de iod.

Închiderea orificiului de inoculare cu parafină sau alt material.

Introducerea ouălor inoculate la incubator cu temperatura de 37 °C

Ouăle se vor ține sub observație timp de 4-7 zile și se va efectua mirajul zilnic de 2 ori pe zi.

Ouăle cu embrioni morți sau muribunzi se păstrează la rece până la examinare, iar ouăle cu embrioni vii rămase până la sfârșitul perioadei de observație trebuie introduse la 4°C, pentru sacrificare.

Prepararea de soluții și suspensii necesare procesării probelor:

Prepararea soluției Alsever pentru recoltarea de sânge: dextroza 0,8 mg, acid citric 0,055 mg, clorura de sodiu 0,42 mg, apa distilată 100 ml.

Se autoclavează sau se filtrează steril (filtru de 0,22 μm). Se păstrează la 4°C.

Recoltarea sângelui se face în soluție Alsever în proporție de 1/1, de la minim trei păsări SPF (dacă nu este posibil se recoltează de la păsări care sunt monitorizate regulat, fiind libere de anticorpi pentru influența aviară și boala de Newcastle).

Prepararea suspensiei de eritrocite 1%.

- Sângele se centrifughează în tampon fosfat salin pH 7.0-7.4 timp de 10 minute la 1000-1500 r.p.m. de trei ori.
- Se prepară o suspensie de eritrocite 1% în tampon fosfat salin pH 7,0-7,4.
- Eritrocitele se pot păstra la 4°C, timp de 4-5 zile în soluție Alsever.

Deschiderea ouălor și verificarea activității hemaglutinante a lichidelor alantoamniotice:

- Se prelevează într-un tub lichidele alantoamniotice din ouale cu embrioni morți.
- O cantitate de aproximativ 1 ml lichid alantoamniotic se distribuie pe o placă Petri sterilă și se adaugă o cantitate egală de suspensie de eritrocite 1%
- Hemaglutinarea confirmă prezența unui virus cu activitate hemaglutinantă (virusul influenței aviare, virusul bolii de Newcastle)

Identificarea virusului izolat și interpretarea rezultatelor:

Se efectuează prin reacția de hemaglutinare pentru stabilirea titrului virusului izolat. Titrul hemaglutinant al antigenului este cea mai mare diluție de virus care produce hemaglutinarea completă (fără curgerea eritrocitelor); aceasta reprezintă o unitate hemaglutinanta (UHA); în reacția de inhibare a hemaglutinării se folosesc 4 UHA (ex.: titrul 128, rezultă că, soluția de lucru este 1/32). Identificarea se realizează cu seruri pozitive de mare specificitate pentru cele 9 serotipuri de paramyxovirus prin reacția de inhibare a hemaglutinării.

Titrurile inhihoemaglutinante sunt considerate pozitive daca se produce inhibarea față de 4 unitati hemaglutinante.

Diagnostic diferențial

a) Diferențierea preliminară

Este important sa se aplice masurile de control cat mai repede pentru a preveni raspandirea virusului bolii de Newcastle, de aceea Laboratorul Național de Referință care a izolat un virus hemaglutinant trebuie sa identifice virusul bolii de Newcastle. Lichidele hemaglutinante trebuie testate prin reactia de inhibare a hemaglutinarii descrisa in Capitolul VIII. Titruri pozitive, de exemplu 2-3 log₂ a martorului pozitiv, obtinute cu ser pozitiv specific pentru cele 9 serotipuri de paramyxovirus ale virusului bolii de Newcastle, pot servi ca identificare primara și implicit la aplicarea masurilor de control.

Cele mai frecvente reacții încrucișate sunt între APMV-1 și APMV-3 (APMV-3 izolat de la psitacine), dar aceste serotipuri pot fi diferențiate cu ajutorul anticorpilor monoclonali.

b) Identificarea virusului

Exista 9 serotipuri de paramyxovirus ale virusului bolii de Newcastle și de aceea Laboratorul Național de Referință trebuie sa dețina toate aceste seruri pozitive care sa permita identificarea virusurilor izolate. Laboratorul Național de Referință trebuie sa:

- stabilească serotipul de paramyxovirus si sa implementeze masurile de control pentru APMV-1
- expedieze tulpinile virale la Laboratorul Internațional de Referința pentru caracterizare completa antigenică și genetică in ce priveste epidemiologia bolii conform cu functiile si indatoririle din Anexa V.
- utilizeze RT-PCR pentru demonstrarea rapidă a prezenței virusului și chiar a virulenței acestuia prin determinarea secvenței de aminoacizi de la situsul de clivare a hemaglutininei;
- să efectueze indexul de patogenitate intracerebrală pe pui SPF în varsta de 24 ore și nu mai mult de 40 ore, descris in Capitolul VII, IPIC mai mare de 0,7 confirma virulenta tulpinii izolate.

CAPITOLUL VI

Identificare și caracterizare a genomului specific virusului pseudopestei aviare

Obiect: Amplificarea și caracterizarea situsului de clivare al genei F, cu stabilirea patogenității virale, utilizând tehnicile RT-PCR și secvențiere.

Domeniul de aplicare: Tehnica se aplică în domeniul biologiei moleculare.

Scop: Utilizarea metodei pentru supravegherea sanitar veterinara, diagnostic în pseudopesta aviara, caracterizare patogenitate.

Principiul metodei

Identificarea acidului nucleic viral prin tehnicile RT-PCR convențional și secvențiere.

Materiale necesare

Reactivi:

- Kit pentru extracție acizi nucleici „High Pure RNA Isolation Kit” (Roche, Germania);
- Kit amplificare acizi nucleici „OneStep RT-PCR” (Qiagen, Germania);
- Kit amplificare produși PCR pentru secvențiere "Big Dye Terminator Cycle sequencing Kit" - versiunile 3.1 și 1.1 (Applied Biosystems, Marea Britanie);
- Kit purificare ampliconi PCR "MinElute Gel Extraction Kit" (Qiagen, Germania);
- Kit purificare ampliconi PCR secvențiere "CentriSep Spin Columns" (Princeton Separations, SUA);
- Primer sens „NDH F” (20μM) gena F a genomului viral.
5' - TAC ACC TCA TCC CAG ACA GG - 3';
- Primer antisens „NDH R” (20μM) gena F a genomului viral.
5' – AGT CGG AGG ATG TTG GCA GC - 3'.

Echipament și consumabile

- pipetă automată monocanal 0,5-10 μ l;
- pipetă automată monocanal 10 -100 μ l;
- pipetă automată monocanal 100-1000 μ l;
- tuburi tip Eppendorf de 0,2 ml, 0,5 ml și 1,5 ml.;
- markere rezistente la temperaturi scăzute, prosoape de hârtie;
- tipsuri sterile cu filtru de 10, 100, 1000 μ l;
- cutii depozitare reagenți;
- vortex;
- thermocycler iCycler (Bio Rad, SUA), GeneAmp 2400 (Perkin Elmer, SUA);
- incinte de lucru pentru PCR;
- centrifugi de masă de mare viteză (până la 14.000 rpm);
- hote laminare de diferite dimensiuni prevăzute cu lămpi ultraviolete;
- celule de electroforeză;
- tăvițe pentru turnarea gelului;
- piepteni pentru godeuri;
- aparat de video documentare Versa - Doc sau Gel - Doc (Bio-Rad);
- sursă de curent pentru electroforeză (Bio-Rad);
- balanță tehnică;
- cuptor cu microunde;
- pahare Erlenmeyer, spatule, tăvițe cântărire;
- congelatoare - 20°C și - 80°C, frigidere;
- dezinfectant - Virkon.
- mașină de gheață;
- ochelari protecție ultraviolete

Materialul supus examinării - suspensie virală obținută prin cultivarea virusului pe ouă embrionate SPF.

Recoltarea și transportul probelor biologice lizate din incinta nivel biosecuritate nivel III în serviciul Biologie Moleculară:

Materiale necesare:

- proba biologică
- hota flux laminar clasa IIA;
- mănuși de latex de unică folosință;
- saci de biohazard, autoclavabili, pentru colectarea deșeurilor;
- soluție 1% virkon;
- hârtie prosop;
- tampon lizare din Kit-ul folosit pentru extracție.

Tehnica de lucru:

Tuburile Eppendorf ce conțin proba biologică în tamponul de lizare al kitului de extracție folosit sunt preluate prin "Pass-Box" din incinta de biosecuritate nivel III.

Acestea sunt transportate în camera de extracție acizi nucleici în cutia specială, unde se spală de hidroxidul de sodiu din "Pass-Box" sub jet de apă, după care se îndepărtează folia protectoare de parafilm.

Se lucrează în hota cu flux laminar clasa a IIA.

Pregătirea probelor pentru extracție acizi nucleici

Materiale necesare:

- Probe biologice;
- Tipsuri de diferite volume;
- Pipete automate de diferite volume;

Tehnica de lucru:

Se centrifughează 1 minut la 10.000 rpm pentru exprimarea supernatantului.

Extracție acizi nucleici:**Extracția ARN din probe biologice utilizând Kitul „High Pure RNA Isolation kit”**

Reagentul	$\mu\text{l/probă}$	Nr. probe	Cantitatea totală
Probă biologică în tampon de lizare	600 μl		
Centrifugare 1 minut la 13000 rpm; Pipetarea supernatantului în Centrifugare 15 sec la 10000 rpm ;		combinarea filtrului rezervorului superior îndepărtare eluat din	cu tubul de colectare fiecare tub.
Tampon incubare DNază	90 μl		
DNază	10 μl		
Amestecare și pipetare în Incubare 15 minute		rezervorul superior la temperatura cam.	
Tampon I de spălare	500 μl		
Centrifugare 15 sec la 10000 rpm;		îndepărtare eluat din	fiecare tub.
Tampon II spălare	500 μl		
Centrifugare 15 sec la 10000 rpm;		îndepărtare eluat din	fiecare tub.
Tampon II spălare	200 μl		
Centrifugare 2 min. la 13000 rpm; se inserează filtrul		îndepărtează tubul într-un tub steril de	de colectare și se 1,5 ml.
Tampon de eluare ARN	50 μl		
	Centrifugare 1 min	la 10000 rpm	

Reacția one - step RT-PCR**Prepararea mixului de reacție:**

Se realizează în incinta de lucru pentru PCR din laboratorul Pre-PCR ("camera curată"):

1. Se utilizează kitul „OneStep RT-PCR” și primerii specifici;
2. Reagenții necesari pregătirii mixului sunt alicotați și sunt depozitați în congelatorul din camera curată;
3. Toți reagenții - excepție enzimele de lucru - se scot din congelator și se depozitează pe gheață până la utilizare;
4. Toți reagenții sunt vortexați apoi centrifugați tip spin la 10.000rot/min- excepție enzimele de lucru;
5. Enzimele se scot din congelator numai în momentul utilizării, perioadă în care se vor depozita pe gheață;
6. Reagenții astfel pregătiți se vor utiliza pentru prepararea pe gheață a mixului conform protocolului, cu respectarea succesiunii din tabel:

MIX OneStep RT-PCR (kit OneStep RT-PCR, Qiagen)			
Reagenți	$\mu\text{l/proba}$	X probe	Volum total
Apa (RNase free) (Qiagen)	22.5		
Tampon OneStep RT-PCR 5x (Qiagen)	10		
dNTP 10 mM (Qiagen)	2		
Primer NDH-F 20 pmol/ μl	1.5		
Primer NDH-R 20 pmol/ μl	1.5		
RNasin (Promega) 40 U/ μl	0.5		
Mix enzime OneStep RT-PCR (Qiagen)	2		
Volum Total	40		
Se omogenizează mixul obținut prin pipetare			

Pregătirea ARN extras pentru PCR:

ARN-ul obținut se incubează 1 min la 90°C pentru denaturare/linearizare, după care se depune imediat pe gheață până la utilizare.

Cuplarea mixului cu ARN viral

Mix-ul preparat se transmite pe gheață în „camera de cuplare” prin intermediul ferestrei de tip pass-box dintre cele două încăperi („camera curată” și „camera de cuplare”).

În incinta de lucru PCR din „camera de cuplare” se realizează, în tuburi de 0,2 ml, cuplarea mixului, în cantitate de 40μl, cu proba de ARN, în cantitate de 10μl, adusă din laboratorul „Extracție acizi nucleici”. Cuplarea se realizează pe gheață, amestecul obținut fiind omogenizat prin pipetare. Se va evita generarea de bule de aer consecutivă pipetării.

Realizarea amplificării în thermocycler:

Se setează parametrii de amplificare la următoarele valori:

Programul	Număr cicluri	Temperatură	Durată
Reacția de revers-transcripție	1	50°C	30 minute
Denaturare/activare polimerază	1	95°C	15 minute
Reacție PCR	40	94°C	45 secunde
		58°C	1 minut
		72°	1 minut
Răcire	1	4°C	∞

Electroforeza in gel de agaroză:

Prepararea gelului de agaroză

- Intr-un pahar Erlenmayer se cântăresc 0,9g agaroză și se amestecă cu 60ml tampon TBE1x;
- Se acoperă paharul (fără etanșare) și se introduce în cuptorul cu microunde unde are loc dizolvarea agarozei, la fierbere, timp de aproximativ 2 minute;
- Se răcește soluția astfel obținută sub jet de apă, până la aproximativ 60°C, se adaugă 4 μl EtBr 10mg/ml, turnându-se imediat în tăvița de electroforeză, pregătită în prealabil (inserată în suportul „*casting gel*” și cu pieptenul fixat, în funcție de numărul de probe de analizat);
 - Se elimină eventualele bule de aer cu ajutorul unui tips;
 - Se lasă gelul să se solidifice (aproximativ 20minute);
 - După solidificare, se scoate tăvița din suportul „*casting gel*”, se îndepărtează pieptenul fixat și se încarcă probele în tancul de electroforeză ce conține tampon migrare TBE1x;

Încărcarea probelor

- Pe o folie de Parafilm se pipetează câte 4 μl tampon de încărcare (loading buffer) peste care se adaugă câte 10 μl de probă;
- Se încarcă 10 μl din amestecul omogenizat în godeurile gelului de agaroză;

Electroforeza

- Se fixează capacul celulei de electroforeză astfel încât catodul (firul negru) să fie la „-” iar anodul (firul roșu) să fie la „+” (migrarea acizilor nucleici se face de la „-” la „+”);
- Se fixează parametrii de separare la 100 V, 500 mA, pentru o durată de 40 min.

Analiza electroforezei

- După terminarea electroforezei gelul se analizează în sistemul de videodocumentare, utilizând modulul „*Preparative*”. Benzile specifice obținute prin amplificarea genomului viral au o dimensiune de 300-320 pb.

Calculul rezultatelor și modul de exprimare

Rezultatele se stabilesc în urma analizei gelurilor de agaroză în sistemul de videodocumentare. Probele pozitive prezintă benzi specifice cu dimensiuni de 300-320 pb.

Testul se consideră validat dacă standardul de lucru și probele cert pozitive s-au obținut pozitive, iar mix-ul cu adaos de apă și proba standard negativ s-au obținut negative.

Validarea testului prin utilizarea martorilor pozitivi și negativi;

Prepararea martorului negativ de control al extracției acizilor nucleici:

- o probă cert negativă de produs biologic (probă ce a fost lucrată de cel puțin trei ori, iar rezultatul a fost negativ) este supusă extracției în aceleași condiții ca și probele de lucru;

Prepararea martorului pozitiv de control al extracției acizilor nucleici:

- o probă cert pozitivă de produs biologic (probă ce a fost lucrată de cel puțin trei ori, iar rezultatul a fost pozitiv) este supusă extracției în aceleași condiții ca și probele de lucru;

Prepararea martorului negativ de control:

- în tubul de reacție de 0,2 ml se pipetează 40μl amestec de reacție și respectiv 10μl apă ultrapură; acest amestec reprezintă o probă cert negativă deoarece nu conține ARN viral;

Prepararea martorului pozitiv de control:

- în tubul de reacție de 0,2 ml se pipetează 40μl amestec de reacție și respectiv 10μl standard de lucru; acest amestec reprezintă o probă cert pozitivă deoarece conține ARN viral.

Purificarea ampliconilor din gelul de electroforeză

Izolarea benzilor specifice din gelul de agaroză:

- se identifică benzile specifice din gel
- se decupează benzile cu ajutorul unei lame de bisturiu, sub protecția ochelarilor speciali; se încearcă izolarea benzilor fără exces de gel de agaroză
- se încarcă fragmentele în tuburi Eppendorf de 1,5ml
- se cântăresc tuburile la balanța tehnică; greutatea fragmentelor se calculează prin scăderea tarei (greutatea proprie a tubului Eppendorf)

Purificarea ampliconilor: Se utilizează kitul "MinElute Gel Extraction Kit".

Protocol de lucru
Se pipetează 3 volume tampon QG la 1 volum de gel (100mg ~ 100μl)
Se incubează 10 minute la 50°C (sau până la topirea totală a gelului), cu vortexare periodică (la 2-3minute)
Se pipetează 1 volum izopropanol absolut pentru 1 volum de gel (100mg ~ 100μl)
Se omogenizează prin pipetare și se transferă în colonițele de purificare.
Se centrifughează 1min la 14.000rpm; îndepărtare eluat
Se pipetează 500μl tampon QG în fiecare coloniță
Se centrifughează 1min la 14.000rpm; îndepărtare eluat
Se pipetează 750μl tampon PE de lucru în fiecare coloniță
Se incubează 2-5min la temperatura camerei. Se centrifughează 1minut la 14.000rpm; îndepărtare eluat
Se centrifughează 1minut la 14.000rpm pentru uscarea completă a membranei colonițelor

Se transferă colonițele din tuburile de colecție în tuburile Eppendorf de 1,5ml
Se pipetează 10μl tampon EB (tampon de eluare) în centrul membranei
Se incubează 1minut la temperatura camerei
Se centrifughează 1minut la 14.000rpm; eluatul obținut (ampliconul purificat) se depozitează în congelatorul din "camera de secvențiere"

Reacția PCR pentru secvențiere

Pregătirea probelor pentru secvențiere

Se realizează în incinta de lucru pentru PCR din laboratorul "camera de secvențiere":

1. Se utilizează kitul "Big Dye Terminator Cycle sequencing Kit" - versiunile 3.1 sau 1.1 și primerii specifici;
2. Reagenții necesari pregătirii mixului sunt alicotați și sunt depozitați în congelatorul din "camera de secvențiere";
3. Toți reagenții se scot din congelator și se depozitează pe gheață până la utilizare;
4. Toți reagenții sunt vortexați apoi centrifugați tip spin la 10.000rot/min- excepție Ready Reaction Mix;
5. Pentru fiecare probă de analizat se vor efectua două mixuri de reacție - unul cu primerul sens și celălalt cu primerul antisens
6. Reagenții astfel pregătiți se vor utiliza pentru prepararea pe gheață a mixului conform protocolului, cu respectarea succesiunii din tabel:

Mix secvențiere		
Reagent	Concentrație	Cantitate/probă
Big dye terminator ready reaction mix	2.5×	4 μl
Sequencing buffer	5×	2 μl
Amplicon purificat	3 – 10ng	μl
Primer	3,2 pmol	μl
Apă ultrapură	q. s. ad 20 μl	

Realizarea amplificării în thermocyclerul PE 2400:

Programul	Număr cicluri	Temperatură	Durata expoziției
Denaturare	1	96°C	1 minut
Reacție PCR	25	96°C	10 secunde
		58°C	10 secunde
		60°C	4 minute
Răcire	1	4°C	∞

Purificarea ampliconilor rezultați în urma reacției de secvențiere

Se realizează în incinta de lucru pentru PCR din "camera de secvențiere". Se utilizează colonițele de purificare "CentriSep Spin Columns"

Pregătirea coloanelor de purificare

1. Se hidratează colonițele cu 800μl apă ultrapură
2. Se omogenizează gelul obținut și se îndepărtează bulele de aer
3. Se incubează 2 ore la temperatura camerei
4. Dacă nu sunt folosite în ziua respectivă, se depozitează în frigiderul din camera de electroforeză pentru nu mai mult de 2-3 zile

Îndepărtarea lichidului interstițial

Se îndepărtează capacul superior și ulterior capacul inferior al colonițelor
Se atașează tuburile de colecție
Se permite scurgerea prin gravitație a lichidului în exces din colonițe

Se îndepărtează lichidul din tuburile de colecție - aproximativ 200-250µl
Se centrifughează colonițele 2min la 3000rpm, cu marcarea orientării acestora
Se îndepărtează tuburile de colecție și se atașează tuburi Eppendorf de 1,5ml
Probele se procesează în maxim 2 minute

Procesarea probelor

Se transferă 20µl probă pentru fiecare coloniță, prin pipetare direct în centrul gelului
Se centrifughează colonițele 2min la 3000rpm, cu aceeași orientare
Proba purificată va fi reprezentată de eluatul obținut

Precipitarea acizilor nucleici

Se realizează în incinta de lucru pentru PCR din laboratorul "camera de secvențiere"

Precipitarea alcoolică

Nr. etapă	Acțiune
1	Peste eluat se pipetează 16 µl apă ultrapură + 64 µl etanol absolut
2	Omogenizare prin pipetare
3	Incubare la temperatura camerei și întuneric 40 – 120 minute
4	Centrifugare 25min la 14.000 rpm. Se marchează orientarea tuburilor.
5	Aspirare supernatant
6	Pipetare 250 µl etanol 70%
7	Vortexare scurtă, la frecvența redusă
8	Centrifugare 15min la 14.000 rpm cu aceeași orientare
9	Aspirare supernatant

Obținerea peletelor

1. Tuburile Eppendorf se incubează pe termobloc cu capacele deschise, 1 minut la 90°C, pentru evaporarea completă a etanolului rezidual.
2. După incubare, se închid capacele tuburilor.

Resuspendarea peletelor în formamidă

Se realizează în incinta de lucru pentru PCR din laboratorul "camera de secvențiere".

Nr. etapă	Acțiune
1	Se resuspendă peletele pe gheață în 25 µl formamidă
2	Vortexare energetică
3	Denaturare 2 min la 95°C
4	Poziționarea imediată a tuburilor pe gheață
5	Spin pentru colectarea probelor
6	Transferul în tuburile aparatului; poziționarea septelor
7	Se mențin pe gheață, la întuneric, până la încărcarea în aparat

Setarea parametrilor de secvențiere - Analizor genetic AbiPrism 310

Stabilirea "DyeSet/Primer - Mobility File" pentru fișa probelor ("Sample Sheet")

Se pot selecta două categorii de parametri și anume pentru secvențierea folosind kitul versiunea 3.1 sau 1.1

1. Pentru versiunea 3.1 se selectează "DT310POP6{BDv3}v2.mob"
2. Pentru versiunea 1.1 se selectează "DT310POP6{BD}.mob" sau "DT310POP6{BD-LR}v3.mob"

Stabilirea "Run Module" pentru "Injection List"

Se selectează "Seq POP6 (1ml) E" ca modul pentru rulare

Stabilirea parametrilor pentru analiza probelor secvențiate

1. Pentru kitul versiunea 3.1:

BaseCaller	DyeSet/Primer
KB.bcp	KB_310_POP6_BDT v3.50Std.mob
POP 6.bcp	DT310POP6{BDv3}v2.mob
Matrix File	310Matrix17 BDT v3.1-POP6.mtx

2. Pentru kitul versiunea 1.1:

BaseCaller	DyeSet/Primer
KB.bcp	KB_310_POP6_BDT v1.50Std.mob
Matrix File	310Matrix17 BDT v1.1-POP6.mtx
POP 6.bcp	DT310POP6{BD}.mob
	DT310POP6{BD-LR}v3.mob

Stabilirea patogenității virale

Patogenitatea virală se stabilește pe baza secvenței de aminoacizi de la nivelul situsului de clivare al genei F.

În acest sens, o pereche de aminoacizi esențiali în pozițiile 112 și 113, respectiv 115 și 116, plus aminoacidul fenilalanină (F) în poziția 117, determină o recunoaștere a situsului de către proteazele ubiquitare, cu replicarea virală sistemică și apartenența tulpinii la categoria mezogenă/velogenă.

Aminoacizii ce se regăsesc în pozițiile 112 și 113, respectiv 115 și 116 sunt reprezentați în acest caz de lizină (K) și/sau arginină (R) în combinațiile teoretic posibile. În cazul în care în cele două poziții este prezentă doar arginina (R) se poate spune că izolatul aparține categoriei velogene.

În contrast, tulpinile lentogene prezintă în pozițiile 112 și 113, respectiv 115 și 116, pe lângă aminoacizii mai sus menționați, și aminoacidul glicină (G) în combinațiile teoretic posibile. Mai mult, în poziția 117, în locul fenilalaninei, este prezentă leucina (L).

Exemple de secvențe de aminoacizi la nivelul situsului de clivare:

- 109 SGGGRQGRLLIG 119 - CATEGORIA LENTOGENĂ
- 109 SGGR(K)RQR(K)RFIG 119 – CATEGORIA MEZOGENĂ/ VELOGENĂ .

CAPITOLUL VII

Teste de patogenitate și evaluarea rezultatelor

Virulența tulpinilor izolate trebuie evaluată prin efectuarea indicelui de patogenitate intracerebrală (IPIC)

Testul IPIC se efectuează după cum urmează:

i) Lichidul alantoamniotic infectat cu un titru $>2^4$ (1/16) este diluat 1/10 în TFS fără aditivi cum ar fi antibioticele.

ii) 0.05ml din suspensia de virus diluată se injectează intracerebral fiecărui pui dintr-un grup de 10 pui SPF. Acești pui trebuie să aibă mai mult de 24 h și sub 40 h vârstă în momentul inoculării .

iii) Puii sunt examinați la fiecare 24 h timp de 8 zile.

iv) La fiecare observație păsările sunt notate cu un scor :

0 pentru normal; 1 pentru bolnav; 2 pentru mort (puii morți trebuie să fie notați cu 2 la sfârșitul fiecărei zile de observație).

v) Indexul patogenității intracerebrale (IPIC) este media scorului per pasăre per observație după perioada de 8 zile.

Tulpinile cele mai virulente vor avea indici de patogenitate ce se aproprie de scorul maxim 2.0, în timp ce tulpinile lentogene vor avea valori apropiate de 0.0

Exemplu de IPIC

Semne clinice	ZIUA DUPĂ INOCULARE								NUMĂRUL DE PĂSĂRI	
	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	SCOR
NORMAL	10	4	0	0	0	0	0	0	14 x 0	= 0
BOLNAV	0	6	10	4	0	0	0	0	20 x 1	= 20
MORT	0	0	0	6	10	10	10	10	46 x 2	= 92
Total = 112/80										
IPIC = 1,4										

Interpretarea rezultatelor

Se face prin IPIC, luând în considerare și timpul mediu de letalitate embrionara.

Patotipuri și indici de patogenitate

Patotip	Timpul mediu de letalitate	IPIC	Exemple de virusuri
Velogene viscerotrope	<60	1.5-2,0	Herts 33, N.Y.Parrot 70181, CA2089/72
Velogene neurotrope	<60	1.5-2,0	Texas GB
Mezogene	60-90	1,0-1,5	Roakin, Komarov, Mukteswar, H (tulpini vaccinale)
Lentogene	>90	0,2-0,5	Hitchner B1, La Sota, Clone 30 (tulpini vaccinale)
Asimptomatice	>90	0,0-0,2	Ulster 2C, V4, MC 110(tulpini vaccinale)

CAPITOLUL VIII

Examene serologice și evaluarea rezultatelor

Reacția de hemaglutinare și inhibare a hemaglutinării pentru detectarea anticorpilor în boala de Newcastle

Principiul metodei

Metoda se bazează pe proprietatea virusurilor bolii de Newcastle de a prezenta activitate hemaglutinanta fata de globulele rosii de pasare. Inhibarea hemaglutinarii indica prezenta anticorpilor specifici bolii de Newcastle. In diagnosticul bolii de Newcastle, testul IHA se foloseste ca metoda serologica pentru detectarea anticorpilor specifici virusului din familia *Paramyxoviridae* din serul sanguin al pasarilor receptive. Exista 9 serotipuri de virus: APMV-1 până la APMV-9.

Materialul supus examinării

Probele de ser fără hemoliza, menținute la temperatura de 4°C.

Tehnica de lucru

Probele de ser prelevate de la alte specii decât găini necesită pretratament cu suspensie de eritrocite 10%, înainte de a fi introduse în lucru.

Prepararea suspensiei de eritrocite 1% si 10%

Recoltarea sângelui se face în soluție Alsever în proporție de 1/1, de la minim trei păsări SPF (dacă nu este posibil se recoltează de la păsări care sunt monitorizate regulat, fiind libere de anticorpi pentru boala de Newcastle).

Sângele se centrifughează în tampon fosfat salin (TFS) pH 7.0-7.4 timp de 10 minute la 1000-1500 r.p.m. de trei ori. TFS se prepară astfel: soluție de 10 ori concentrată: NaCl 80 g, KCl 2 g, KH₂PO₄ 2 g, Na₂HPO₄ 11,5 g. Se completează cu apă distilată până la volumul de 1000 ml. În momentul utilizării se diluează o parte TFS 10 X cu 9 părți de apă distilată.

Se prepară o suspensie de eritrocite 1% sau 10 % în tampon fosfat salin pH 7,0-7,4.

Eritrocitele se pot păstra la 4°C, timp de 4-5 zile în soluție Alsever (dextroza 0,8 mg, acid citric 0,055 mg, clorura de sodiu 0,42 mg, apa distilată 100 ml; se autoclavează sau se filtrează steril prin filtru de 0,22 μm).

Reacția de hemaglutinare

- se distribuie 0,025 ml TFS în fiecare godeu al plăcii de microtitrare cu godeul în V;
- se repartizează 0,025 ml de suspensie de virus (lichid alantoid infectat) în primul godeu;
- se execută diluții seriatale cu volum de 0,025 ml suspensie de virus de la primul până la ultimul godeu;

- se distribuie 0,025 ml TFS în toate godeurile;
- se distribuie 0,025 ml suspensie de eritrocite 1% în fiecare godeu;
- se agită ușor placa și se lasă acoperită timp de 40 minute la temperatura de 20°C sau 60 minute la 4°C dacă temperatura ambientală este ridicată, timp în care în godeurile pentru martor de eritrocite se va forma un buton distinct;

- hemaglutinarea este constatată prin înclinarea plăcii cu observarea curgerii eritrocitelor pe peretele godeului;

- titrul hemaglutinant al antigenului este cea mai mare diluție de virus care produce hemaglutinarea completă (fără curgerea eritrocitelor); aceasta reprezintă o unitate hemaglutinantă (UHA); în reacția de inhibare a hemaglutinării se folosesc 4 UHA (ex.: titrul 128 , rezultă că, soluția de lucru este 1/32).

Pretratamentul probelor de ser cu suspensie de eritrocite 10%

- Se distribuie:
 - 50 μl TFS în primul godeu al fiecărui rând (ex.: 1-A,B,C,D,E);
 - 25 μl ser de testat în primul godeu din primul rând vertical (ex.: 1-A,B,C,D,E);
 - 25 μl suspensie de eritrocite 10% numai în godeurile cu ser de testat
 - 25 μl TFS – Serul pozitiv, rândul F-(godeurile 1->12);
 - 25 μl TFS – Serul negativ, rândul G-(godeurile 1->12);
 - 25 μl TFS - Control Virus - godeurile 2->6, rândul H;
 - 25 μl TFS Control eritrocite godeurile 7->12, rândul H;
 - 25 μl TFS din godeul nr.3->12 vert. A,B,C,D,E;
 - 25 μl ser pozitiv în primul godeu din rândul F;
 - 25 μl ser negativ în primul godeu din rândul G;
- Se menține placa la temperatura camerei (20°C) timp de 30 minute;
- Se iau 25 μl ser pretratată din primul rând de godeuri și se distribuie în al II-lea rând de godeuri verticale (valabil pentru godeurile A,B,C, D,E);
- Se iau 25 μl ser pretratată din primul rând de godeuri și se distribuie în al III-lea rând de godeuri verticale (valabil pentru godeurile A,B,C, D,E) și se fac diluții seriatale până la ultimul godeu inclusiv în godeurile cu serurile martor pozitiv și negativ;
- Se distribuie 25 μl soluție antigen în godeurile cu serurile de testat și în cele cu ser pozitiv și negativ;
- În rândul pentru control virus se distribuie câte 25 μl soluție antigen în godeul nr.1 și 2. Din godeul nr. 2 se fac diluții seriatale până la godeul nr.6; se distribuie apoi 25 μl soluție TFS din godeul 1 până la godeul 6;

- În rândul pentru control eritrocite se distribuie 25 µl soluție TFS din godeul 7 până la godeul 12. Se menține placa la temperatura camerei (20°C) timp de 30 minute;
- Se distribuie suspensie eritrocite 1% în toate godeurile. Se menține placa la temperatura camerei (20°C) timp de 30 minute;
- Citirea titrului de anticorpi-titrul inhihoemaglutinant al serului este cea mai mare diluție care a produs inhibarea completă a antigenului (4 UHA). Hemaglutinarea este inhibată în acele godeuri în care eritrocitele curg la fel ca și în godeurile martor pentru eritrocite.

Reacția de inhibare a hemaglutinării pentru galinacee

- Se distribuie 0,025 ml TFS în fiecare godeu al plăcii de microtitrare cu godeul în „V”;
- Se repartizează 0,025 ml ser de testat, în primul godeu al fiecărui rând din placă;
- Se fac diluții seriate cu un volum de 0,025 ml de ser pe un rând de godeuri;
- Se adaugă câte 0,025 ml virus/antigen cu 4 UHA în fiecare godeu și se mențin plăcile timp de 30 minute la temperatura camerei (20°C) sau 60 minute la 4°C;
- Se distribuie 0,025 ml suspensie 1% (v/v) globule roșii de pasăre în fiecare godeu și se agită ușor. Se mențin plăcile la temperatura camerei (20°C) sau 60 minute la 4°C, dacă temperatura mediului ambiant este ridicată, timp în care în godeurile martor, eritrocitele se vor depune sub forma unui buton distinct;
- Titrul inhihoemaglutinant al serului este cea mai mare diluție care a produs inhibarea completă a antigenului (4 UHA). Hemaglutinarea este inhibată în acele godeuri în care eritrocitele curg la fel ca și în godeurile martor pentru eritrocite.

Validarea rezultatelor

- validarea rezultatelor trebuie să se facă introducând în test serul negativ de control care nu trebuie să aibă un titru $>1/4$ ($>2^2$ sau $>\log 2$) și titrul serului pozitiv trebuie să corespundă cu cel determinat de producător sau cu o diluție în plus sau în minus.

- trebuie inclus în test și controlul virusului (*back titration*) pentru a verifica numărul de unități hemaglutinante.

Interpretarea rezultatelor

Un ser este considerat pozitiv dacă se produce inhibarea hemaglutinării la o diluție a serului de cel puțin 1/16 față de 4UHA de antigen.

CAPITOLUL IX

Sisteme de monitorizare asociate cu vaccinarea

Vaccinarea împotriva Bolii de Newcastle sânt expuse în capitolul V al Normei sanitare veterinare privind măsurile de combatere a bolii de Newcastle (pseudopesta aviară) aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 1085 din 14.12.2017.

CAPITOLUL X

Cerințe minime de protecție pentru transportul probelor

1. Transportul probelor în cazul când agenții patogeni sunt cunoscuți a fi prezenți sau se suspicionează prezența lor se realizează conform regulamentelor naționale și internaționale. Virusurile izolate care nu sunt clasificate ca probe de diagnostic trebuie să fie ambalate în acord cu standardele internaționale. Instrucțiunile din acest capitol se referă la transportul aerian, dar ambalare similară trebuie realizată și pentru transportul terestru și pe apă al probelor.

2. Ambalarea probelor pentru transport se efectuează conform Normelor IATA. Expeditorul și nu compania de transport este responsabilă de cantitatea de probe până la sosirea la destinatar.

3. Ambalarea primară

- recipientii să fie etanși, pe dopuri să fie aplicat parafilm sau alt material de protecție.
 - recipientii primari se ambalează individual pentru a preveni spargerea.
 - când este precizată cantitatea probelor trebuie să se țină cont de acest lucru.
 - recipientii primari nu trebuie să conțină mai mult de 500 ml sau mg de probă.
- Conținutul recipientilor primari reprezintă proba pentru diagnostic.

4. Ambalarea secundară

- se realizează într-un container secundar cu suficient material absorbant pentru întreg conținutul recipientilor primari în caz că aceștia se sparg.

- se realizează conform cerințelor IATA

În cazul probelor cu potențial infectant se aplică Instrucțiunile 602.

- când pachetul conține probe cu potențial infectant trebuie să se specifice prin marcare (UN va fi înscris într-un cerc), de exemplu:

„UN 4G/CLASS 6.2/99/GB2450”

- pachetul secundar trebuie să fie închis etanș. Trebuie respectate instrucțiunile producătorului sau al altor părți autorizate.

- pachetul secundar trebuie să aibă cel puțin dimensiunea de 100 mm la exterior.
- trebuie să fie suficient de încăpător pentru documente, cum ar fi foaia de transport aerian.

Exteriorul pachetului

- nu trebuie să cântărească mai mult decât 4 l sau 4 kg
- dacă necesită gheață carbonică sau gheață se plasează în pachetul secundar. Dacă se folosește gheață carbonică, se va permite eliminarea vaporilor și nu se vor face presiuni asupra pachetului, deoarece s-ar putea rupe. Dacă utilizăm numai gheață, pachetul nu trebuie să permită scurgerea.

Fiecare pachet și foaie de transport aerian trebuie să fie incripționate cu exact următoarele cuvinte:

„UN 3373 DIAGNOSTIC SPECIMEN
PACKED IN COMPLIANCE WITH
IATA PACKING INSTRUCTION 650”

- lista cu probele trebuie inclusă între pachetul secundar și cel exterior
- pachetul exterior trebuie plasat într-un sac de plastic pentru a fi protejat de umezeală
- declarația de expediere pentru materiale periculoase nu este necesară

CAPITOLUL XI

Expedierea tulpinilor de virus și probelor către Laboratorul Internațional de Referință

Probele trimise către Laboratorul Internațional de Referință trebuie să fie în conformitate cu recomandările pentru transportul agenților patogeni periculoși și de asemenea cu regulamentele și legislația în vigoare din Marea Britanie.

- toate materialele trebuie să fie ambalate conform instrucțiunilor din acest capitol
- exteriorul pachetului trebuie să fie marcat astfel:

„ ANIMAL PATHOGEN – PACKAGE ONLY TO BE OPENED AT THE AVIAN
VIROLOGY SECTION, VLA WEYBRIDGE IMPORTATION AUTHORISED BY
LICENCE NUMBER..... *ISSUED UNDER THE IMPORTATION OF ANIMAL
PATHOGENS ORDER.”

- trebuie să fie aplicate următoarele numere de licență:

- pentru virusul pseudopestei aviare: „AHZ/2232/2002/5*”
- pentru țesuturi și alte materiale: „ AHZ/2074C/2004/3*”

Aceste numere de licență sunt modificate periodic, iar laboratoarele care trimit probe trebuie să se asigure că ele sunt în uz, înainte de trimiterea pachetului.

- pachetul trebuie să fie adresat către:

Avian Virology
VLA Weybridge,
New How, Addlestone,
Surrey, KT15 3NB
United Kingdom

- o scrisoare trebuie să însoțească pachetul în care se face referire la izolate, specie, vârstă, zona/țara/semne clinice;

- pachetele trebuie să fie trimise prin poșta aeriană sau transportul aerian de marfă;

- dacă pachetele se trimit prin transportul aerian de marfă, numărul foii de transport trebuie transmis *Laboratorului Național de Referință* prin fax, telefon sau e-mail, înainte de sosirea materialelor.

Pachetele trimise prin transportul aerian de marfă trebuie să fie inscripționate clar cu următoarele:

„CARE OF TRANSGLOBAL” pentru a se asigura o procesare rapidă în aeroport

Persoanele de contact din *Laboratorul Internațional de Referință*:

Ian H. Brown, Director of the Reference Laboratory

Direct tel. (44-1932) 35 73 39;

Direct fax (44-1932) 35 72 39;

E-mail: i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Ruth Manvell, Reference Laboratory Manager

Direct tel. (44-1932) 35 77 36 or (44-1932) 35 77 08;

Direct fax (44-1932) 35 78 56;

E-mail: r.manvell@vla.defra.gsi.gov.uk

CAPITOLUL XII

Cerințe de biosecuritate în laboratorul de diagnostic al bolii de Newcastle

- Cerințele de biosecuritate în laboratoarele de diagnostic pentru boala de Newcastle trebuie să aibă în vedere atât protecția sănătății animalelor dar și protecția personalului ce lucrează în laborator.
- În cadrul Comunității, cerințele de biosecuritate pentru laboratoare sunt redactate în câteva Directive. În plus, aspectele operaționale sunt descrise conform normelor europene. Pentru procedura de diagnostic de laborator, rezultatele sunt atașate la normele europene, cum ar fi buna practică de laborator.
- Este recomandat ca manipularea virusului bolii de Newcastle să se facă în spații diferite de cele destinate diagnosticului acestei boli iar pregătirea sticlăriei, mediilor de cultură ca și procesarea probelor de ser și examenele serologice să se facă în spații separate de cele în care se manipulează virus.
- Toate manipulările de virus viu se efectuează în hote de clasă II; hotele trebuie să fie dotate cu filtre HEPA duble la exhaustarea aerului. Toată aparatura necesară procedurilor de laborator trebuie amplasată împreună cu un mobilier adecvat acestei activități.
- În toate situațiile, stocurile de virus al bolii de Newcastle trebuie păstrate în siguranță, indiferent dacă sunt congelate sau liofilizate. Este recomandat ca frigiderul și congelatoarele în care acestea sunt păstrate să fie special repartizate pentru aceasta, toate flacoanele cu virus să fie etichetate și menținute evidențe stricte și înregistrări ale verificărilor efectuate, conform cu cerințele de menținere a calității.

- Principii de izolare biologică necesare laboratoarelor de diagnostic:

Măsurile de biosecuritate	Nivel de biosecuritate			
	1	2	3	4
Laborator corespunzător: izolare	Nu	Da	Da	Da
Laboratoare separate prin uși	Nu	Da	Da	Da
O fereastră sau o altă alternativă prezente pentru ca personalul să poată fi observat	Opțional	Opțional	Opțional	Da
Posibilități de spălare a mâinilor pentru personal	Da	Da	Da	Da
Posibilități de decontaminare a mâinilor pentru personal	Opțional	Da	Da	Da
Acces restricționat	Nu	Da	Da	Da
Măsurile specifice de control pentru aerosoli	Nu	Da Minim	Da preventiv	Da preventiv
Pictograme Biohazard pe uși	Nu	Da	Da	Da
Duș	Nu	Nu	Opțional	Da
Sistem de spălare a ochilor	Da	Da	Da	Da
Laborator: sistem de etanșizare pentru fumigare	Nu	Nu	Da	Da
Suprafețe rezistente la apă, acizi, substanțe alcaline, solvenți, decontaminante și ușor de curățat	Da (mese de lucru)	Da (mese de lucru)	Da (mese de lucru, pardoseală)	Da (mese de lucru, pardoseală)
Intrare în laborator prin filtru	Nu	Nu	Opțional	Da
Presiune negativă față de presiunea mediului	Nu	Nu	Opțional	Da
Ieșirea și intrarea aerului în și din laborator trebuie să se facă prin filtre HEPA	Nu	Nu	Da	Da
Autoclavare	Da	În cladire	Da (propriu)	În laborator, cu dublă deschidere
Echipament de protecție	Corespunzător	Corespunzător	Corespunzător (opțional încălțăminte rezistente)	Complet schimbat
Mănuși	Nu	Opțional	Da	Da
Controlul eficient al vectorilor (de ex. rozătoare, insecte)	Opțional	Da	Da	Da
Păstrarea în condiții de securitate a agenților biologici	Da	Da	Da	Da
Laboratorul să posede echipament propriu	Nu	Nu	Recomandat	Da

Bibliografie selectivă

1. ALEXANDER D.J. & ALLAN W.H. (1974). Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathol.*, 3 (4), 269–278.
2. ALEXANDER D.J., MANVELL R.J., LOWINGS J.P., FROST K. M., COLLINS M.S., RUSSELL P.H. & SMITH J.E. (1997). Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, 26 (2), 399–418.
3. ALEXANDER D. J. AND PARSONS G. (1986). Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-1985. *Avian Pathology*, 15, 487-493.
4. ALEXANDER D.J., PATTISON M. & MACPHERSON I. (1983). Avian Paramyxovirus of PMV-3 serotype in British turkeys. *Avian Pathol.*, 12, 469–482.
5. ALEXANDER D.J. & SENNE D.A. (2008a). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. *In: Diseases of Poultry, Twelfth Edition*, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 75–116.
6. ALEXANDER D.J. & SENNE D.A. (2008b), Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.
7. ALLAN W.H., LANCASTER J.E. & TOTH B. (1978). Newcastle Disease Vaccines. FAO, Rome, Italy.
- BERINSTEIN A., VAZQUEZ-ROVERE C., ASURMENDI S., GOMEZ E., ZANETTI F., ZABAL O., TOZZINI A., CONTE GRAND D., TABOGA O., CALAMANTE G., BARRIOS H., HOPP E & CARRILLO E. (2005). Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine*, 23 (48–49), 5583–5589.
- VAN BOVEN M., BOUMA A., FABRI T.H., KATSMA E., HARTOG L. & KOCH G. (2008). Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathol.*, 37 (1), 1–5.
8. BOURSNELL M.E., GREEN P.F., SAMSON A.C., CAMPBELL J.I., DEUTER A., PETERS R.W., MILLAR N.S., EMMERSON P.T. & BINNS M.M. (1990). A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. *Virology*, 178 (1), 297–300.
9. BROWN J., RESURRECCION R.S. & DICKSON T.G. (1990). The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. *Avian Dis.*, 34 (3), 585–587.
10. CATTOLI G., DE BATTISTI C., MARCIANO S., ORMELLI S., MONNE I., TERREGINO C. & CAPUA I. (2009). False-negative results of a validated real-time PCR protocol for diagnosis of Newcastle disease due to genetic variability of the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 3791–3792.
11. CATTOLI G., FUSARO A., MONNE I, MOLIA S., LE MENACH A., MAREGEYA B., NCHARE A., BANGANA I, MAINA A.G., KOFFI J.N., THIAM H., BEZEID O.E., SALVIATO A., NISI R., TERREGINO C. & CAPUA I. (2010). Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa – implications for diagnosis and control. *Vet. Microbiol.*, 142, 168–176.
12. CHANG P.W. (1981). Newcastle disease. *In: CRC Handbook Series in Zoonoses. Section B: Viral Zoonoses Volume II*, Beran G.W., ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, 261–274.
13. CHO S.H., KWON H.J., KIM T.E., KIM J.H., YOO H.S., PARK M.H., PARK Y.H. & KIM S.J. (2008). Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15 (10), 1572–1579.
14. CHOI K.S., LEE E.K., JEON W.J. & KWON J.H. (2010). Antigenic and immunogenic investigation of the virulence motif of the Newcastle disease virus fusion protein. *J. Vet. Sci.*, 11 (3), 205–211.

15. COLLINS M.S., STRONG I. & ALEXANDER D.J. (1994). Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed “pigeon PMV-1 viruses”. *Arch. Virol.*, 134 (3–4), 403–411.
16. CREELAN J.L., GRAHAM D.A. & MCCULLOUGH S.J. (2002). Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, 31 (5), 493–499.
17. CZEGLEDI A., UJVARI D., SOMOGYI E., WEHMANN E., WERNER O. & LOMNICZI B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.*, 120 (1–2), 36–48.
18. DINAPOLI J.M., YANG L., SUGUITAN A., ELANKUMARAN S., DORWARD D.W., MURPHY B.R., SAMAL S.K., COLLINS P.L. & BUKREYEV A. (2007). Immunization of primates with a Newcastle disease virus-vectored vaccine via the respiratory tract induces a high titer of serum neutralizing antibodies against highly pathogenic avian influenza virus. *J. Virol.*, 81 (21), 11560–11568.
19. DORTMANS J.C., KOCH G., ROTTIER P.J. & PEETERS B.P. (2009). Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. *J. Gen. Virol.*, 90 (Pt 11), 2746–2750.
20. DORTMANS J.C., ROTTIER P.J., KOCH G. & PEETERS B.P. (2010). The viral replication complex is associated with virulence of Newcastle disease virus (NDV). *J. Virol.*, 84 (19), 10113–10120.
21. EUROPEAN COMMISSION (1993). Commission Decision of 8 February 1993 laying down the criteria for vaccines to be used against Newcastle disease in the context of routine vaccination programmes (93/152/EEC): *Official Journal of the European Communities* L 59, 35 (Decision as amended by Decision 2010/633/EC: *Official Journal of the European Union*, L 279, 33).
22. FUKANOKI S., IWAKURA T., IWAKI, S, MATSUMOTO K., TAKEDA R., IKEDA K., SHI Z. & MORI H. (2001). Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase m glycoprotein. *Avian Pathol.*, 30 (5), 509–516.
23. FULLER C.M., BRODD L., IRVINE R.M., ALEXANDER D.J. & ALDOUS E.W. (2010). Development of an L gene real-time reverse-transcription PCR assay for the detection of avian paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples. *Arch. Virol.*, 155, 817–823.
24. GOEBEL S.J., TAYLOR J., BARR B.C., KIEHN T.E., CASTRO-MALASPINA H.R., HEDVAT C.V., RUSH-WILSON K.A., KELLY C.D., DAVIS S.W., SAMSONOFF W.A., HURST K.R., BEHR M.J. & MASTERS P.S. (2007). Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. *J. Virol.*, 81 (22), 12709–12714.
25. GOULD A.R., KATTENBELT J.A., SELLECK P., HANSSON E., LA-PORTA A. & WESTBURY H.A. (2001). Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998–2000. *Virus Res.*, 77 (1), 51–60.
26. HECKERT R.A., RIVA J., COOK S., MCMILLEN J. & SCHWARTZ R.D. (1996). Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. *Avian Dis.*, 40 (4), 770–777.
27. HU S., MA H., WU Y., LIU W., WANG X., LIU Y. & LIU X. (2009). A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine*, 27 (6), 904–910.
28. KAPCZYNSKI D.R. & KING D.J. (2005). Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*, 23 (26), 3424–3433.
29. KARACA K., SHARMA J.M., WINSLOW B.J., JUNKER D.E., REDDY S., COCHRAN M. & MCMILLEN J. (1998). Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral

- responses of chickens following *in ovo* or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine*, 16 (16), 1496–1503.
30. KHAN T.A., RUE C.A., REHMANI S.F., AHMED A., WASILENKO J.L., MILLER P.J. & AFONSO C.L. (2010). Phylogenetic and biological characterization of Newcastle disease virus isolates from Pakistan. *J. Clin. Microbiol.*, 48 (5), 1892–1894.
 31. KIM L.M., KING D.J., CURRY P.E., SUAREZ D.L., SWAYNE D.E., STALLKNECHT D.E., SLEMONS R.D., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., WINKER K. & AFONSO C.L. (2007). Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to poultry-origin isolates. *J. Virol.*, 81 (22), 12641–12653.
 32. KIM L.M., KING D.J., GUZMAN H., TESH R.B., TRAVASSOS DA ROSSA A.P.A., BUENO R., DENNET J.A. & AFONSO C.L. (2008a). Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves. *J. Clin. Microbiol.*, 46 (10), 3303–3310.
 33. KIM L.M., SUAREZ D.L. & AFONSO C.L. (2008b). Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20 (4), 414–425.
 34. KOUWENHOVEN B. (1993). Newcastle Disease *In: Virus Infection of Birds*, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, 341–4361.
 35. LEE Y.J., SUNG H.W., CHOI J.G., LEE E.K., YOON H., KIM J.H. & SONG C.S. (2008). Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutininneuraminidase proteins. *J. Vet. Sci.*, 9 (3), 301–308.
 36. LENSING H.H. (1974). Newcastle disease – live vaccine testing. *Dev. Biol. Stand.*, 25, 189–194.
 37. LETELLIER C., BURNY A. & MEULEMANS G. (1991). Construction of a pigeonpox virus recombinant: expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge. *Arch. Virol.*, 118 (1–2), 43–56.
 38. LIU H., ZHAO Y., ZHENG D., LV Y., ZHANG W., XU T., LI J. & WANG Z. (2011). Multiplex RT-PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses. *J. Virol. Methods*, 171 (1), 149–155. Epub 27 Oct. 2010.
 39. LOKE C.F., OMAR A.R., RAHA A.R., & YUSOFF K. (2005). Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 106 (3–4), 259–267.
 40. MAAS R.A., OEI H.L., KEMPER S., KOCH G. & VISSER L. (1998). The use of homologous virus in the haemagglutination-inhibition assay after vaccination with Newcastle disease virus strain La Sota or Clone30 leads to an over estimation of protective serum antibody titres. *Avian Pathol.*, 27 (6), 625–631.
 41. MEBATSION T., KOOLEN M. J., DE VAAN L. T., DE HAAS N., BRABER M., ROMER-OBERDORFER A., VAN DEN ELZEN, P. & VAN DER MARCEL P. (2002). Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. *J. Virol.*, 76 (20), 10138–10146.
 42. MEULEMANS G. (1988). Newcastle disease virus F glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. *Avian Pathol.*, 17, 821–827.
 43. MEULEMANS G., VAN DEN BERG T.P., DECAESSTECKER M. & BOSCHMANS M. (2002). Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathol.*, 31 (5), 515–519.
 44. MILLER P.J., AFONSO C.L., SPACKMAN E., SCOTT M.A., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., BROWN J.D., FULLER C.M., UHART M.M., KARESH W.B., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & SWAYNE D.E. (2010a). Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*, 84 (21), 11496–11504.
 45. MILLER P.J., DECANINI E.L. & AFONSO C.L. (2010b). Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect. Genet. Evol.*, 10 (1), 26–35.

46. MILLER P.J., KING D.J., AFONSO C.L. & SUAREZ D.L. (2007). Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine*, 25 (41), 7238–7246
47. MORGAN R.W., GELB J., SCHREURS C.S., LUTTICKEN D., ROSENBERGER J.K. & SONDERMEIJER P.J. (1992). Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis.*, 36 (4), 858–870.
48. MORI H., TAWARA H., NAKAZAWA H., SUMIDA M., MATSUBARA F., AOYAMA S., IRANTI Y., HAYASHI Y. & KAMOGAWA K. (1994). Expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus. *Avian Dis.*, 38 (4), 772–777.
49. NAGY E., HUBER P., KRELL P.J. & DERBYSHIRE J.B. (1991). Synthesis of Newcastle disease virus (NDV)-like envelopes in insect cells infected with a recombinant baculovirus expressing the haemagglutinin-neuraminidase of NDV. *J. Gen. Virol.*, 72 (Pt 3), 753–756.
50. NAKAYA T., CROS J., PARK M.S., NAKAYA Y., ZHENG H., SAGRERA A., VILLAR E., GARCIA-SASTRE A. & PALESE P. (2001). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J. Virol.*, 75 (23), 11868–11873.
51. NAYAK B., KUMAR S., DINAPOLI J.M., PALDURAI A., PEREZ D.R., COLLINS P.L. & SAMAL S.K. (2010). Contributions of the avian influenza virus HA, NA, and M2 surface proteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *J. Virol.*, 84 (5), 2408–2420.
52. NANTHAKUMAR T., KATARIA R.S., TIWARI A.K., BUTCHAIH G. & KATARIA J.M. (2000). Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet. Res. Commun.*, 24, 275–286.
53. OLABODE A.O., NDAKO J.A., ECHEONWU G.O., NWANKITI O.O. & CHUKWUEDO A.A. (2010). Use of cracked maize as a carrier for NDV4 vaccine in experimental vaccination of chickens. *Virol. J.*, 7, 67.
54. PEETERS B.P., DE LEEUW O.S., KOCH G. & GIELKENS A.L. (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.*, 73 (6), 5001–5009.
55. PEETERS B.P., DE LEEUW O.S., VERSTEGEN I., KOCH G. & GIELKENS A.L. (2001). Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine*, 19 (13–14), 1616–1627.
56. PEROZO F., VILLEGAS P., ESTEVEZ C., ALVARADO I.R., PURVIS L.B. & SAUME E. (2008). Avian adeno-associated virus based expression of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein for poultry vaccination. *Avian Dis.*, 52 (2), 253–259.
57. RAJAWAT Y.S., SUNDARESAN N.R., RAVINDRA P.V., KANTARAJA C., RATTA B., SUDHAGAR M., RAI A., SAXENA V.K., PALIA S.K. & TIWARI A.K. (2008). Immune responses induced by DNA vaccines encoding Newcastle virus haemagglutinin and/or fusion proteins in maternal antibody-positive commercial broiler chicken. *Br. Poult. Sci.*, 49 (2), 111–117.
58. REDDY S. K., SHARMA J. M., AHMAD J., REDDY D.N., MCMILLEN J.K., COOK S.M., WILD M.A. & SCHWARTZ R.D. (1996). Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, 14 (6), 469–477.
59. ROMER-OBERDORFER A., MUNDT E., MEBATSION T., BUCHHOLZ U.J. & METTENLEITER T.C. (1999). Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J. Gen. Virol.*, 80 (Pt 11), 2987–2995.
60. SAKAGUCHI M., NAKAMURA H., SONODA K., OKAMURA H., YOKOGAWA K., MATSUO K. & HIRA K. (1998). Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1. *Vaccine*, 16 (5), 472–479.
61. SCHROER D., VEITS J., GRUND C., DAUBER M., KEIL G., GRANZOW H., METTENLEITER T.C. & ROMER-OBERDORFER A. (2009). Vaccination with Newcastle

- disease virus vectored vaccine protects chickens against highly pathogenic H7 avian influenza virus. *Avian Dis.*, 53 (2), 190–197.
62. SHENGQING Y., KISHIDA N., ITO H., KIDA H., OTSUKI K., KAWAOKA Y. & ITO T. (2002). Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. *Virology*, 301 (2), 206–211.
63. STEEL J., BURMAKINA S.V., THOMAS C., SPACKMAN E., GARCIA-SASTRE A., SWAYNE D.E. & PALESE P. (2008). A combination *in-ovo* vaccine for avian influenza virus and Newcastle disease virus. *Vaccine*, 26 (4), 522–531.
64. STONE H.D., BONEY W.A. JR, CORIA M.F. & GILLETTE K.G. (1975). Viscerotropic velogenic Newcastle disease in turkeys: vaccination against loss of egg production. *Avian Dis.*, 19 (1), 47–51
65. SWAYNE D.E. & KING D.J. (2003). Avian influenza and Newcastle disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 222 (11), 1534–1540.
66. TERREGINO C. & CAPUA I. (2009). Clinical traits and pathology of Newcastle disease infection and guidelines for farm visit and differential diagnosis. *In: Avian Influenza and Newcastle Disease*, Capua I., ed. AD Springer Milan, Italy.
67. THAYER S.G. & BEARD C.W. (2008). Serologic Procedures. *In: A Laboratory Manual for the Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Fifth Edition, Dufour-Zavala L., ed. American Association of Avian Pathologists, USA, pp. 222–229.
68. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2009). United States Department of Agriculture, Code of Federal Regulations, Title 9, Parts 1–199. Washington, DC, USA.
69. WAMBURA P.N. (2011). Formulation of novel nano-encapsulated Newcastle disease vaccine tablets for vaccination of village chickens. *Trop. Anim Health Prod.*, 43 (1), 165–169.
70. WISE M.G., SUAREZ D.L., SEAL B.S., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., KING D.J., KAPCZYNSKI D. & SPACKMAN E. (2004). Development of a real -time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 329–338.
71. YANG Z.Q., LIU Q.Q., PAN Z.M., YU H.X. & JIAO X.A. (2007). Expression of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 25 (4), 591–598.
72. Brown C. & Torres A., Eds. (2008). - USAHA Foreign Animal Diseases, Seventh Edition. Committee of Foreign and Emerging Diseases of the US Animal Health Association. Boca Publications Group, Inc.
73. Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. Eds. (2004). - Infectious Diseases of Livestock, 2nd Edition. Oxford University Press.
74. Fauquet C., Fauquet M. & Mayo M.A. (2005). - Virus Taxonomy: VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
75. Kahn C.M., Ed. (2005). - Merck Veterinary Manual. Merck & Co. Inc. and Merial Ltd.
76. Spickler A.R. & Roth J.A. Iowa State University, College of Veterinary Medicine
77. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.htm>
78. World Organisation for Animal Health (2009). - Terrestrial Animal Health Code. OIE, Paris.
79. World Organisation for Animal Health (2008). - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris.
80. "Influența aviară și boala Newcastle" – Ghid și manual de laborator de Ilaria Capua și Denis J. Alexander, editura Springer-Verlag Italia 2009.
81. Manual de teste de diagnosticare și vaccinuri pentru animale terestre 2017, Capitolul 2.3.14. Boala Newcastle (infecție cu virusul bolii Newcastle) (NB: versiunea adoptată în mai 2012)
82. Hotărârea Guvernului nr. 1085 din 14.12.2016 pentru aprobarea Normei sanitar-veterinare privind măsurile de combatere a bolii de Newcastle (pseudopesta aviară), Publicat : 22.12.2017 în Monitorul Oficial Nr. 441-450 art Nr : 1217