

Cercetări privind bronșita infecțioasă aviară la broileri din sud-vestul României

**Research on avian infectious bronchitis in broilers from
southwestern Romania**

**RECHERCHE SUR LA BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE
CHEZ LES POULET DE CHAIR DU SUD-OUEST DE LA
ROUMANIE**

REZUMATUL TEZEI

Prezenta teză conține:

- Rezumatele în limba Română, Engleză și Franceză
- Introducerea
- Stadiul actual al cunoașterii: 36
- Cercetările proprii: 114
- Tabele: 35
- Figuri: 59
- Surse bibliografice: 329

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei se întinde pe 36 de pagini și este organizată într-un singur capitol, structurat în nouă subcapitole distincte, după cum urmează: **Istoric și importanță, Etiologie, Epidemiologie, Patogeneză, Tablou clinic, Tablou morfopatologic, Diagnostic, Tratament, Profilaxie și combatere.**

Această secțiune oferă o prezentare amplă și detaliată a bronșitei infecțioase aviare, punând accent pe aspectele esențiale care definesc boala din punct de vedere etiologic, epidemiologic și clinic, precum și pe mijloacele de diagnostic, tratament și prevenție. Fiecare subcapitol este dedicat unei componente fundamentale a bolii, oferind o perspectivă științifică actualizată, necesară pentru înțelegerea și gestionarea eficientă a acestei afecțiuni în contextul patologiei aviare moderne.

CAPITOLUL 1. BRONȘITA INFECȚIOASĂ AVIARĂ (BIA)

Primul capitol al lucrării oferă o prezentare amplă și integrată a bronșitei infecțioase aviare (BIA), cu accent pe aspectele esențiale care definesc această afecțiune virală cu impact major asupra industriei avicole. Capitolul este structurat pe nouă subcapitole care tratează: istoricul și importanța bolii, etiologia, epidemiologia, patogeneza, tabloul clinic și morfopatologic, diagnosticul, tratamentul, precum și măsurile de profilaxie și combatere.

Bronșita infecțioasă aviară este o boală virală extrem de contagioasă, cauzată de coronavirusul aviar (IBV – *Infectious Bronchitis Virus*), care afectează păsările domestice din întreaga lume, indiferent de vârstă sau categorie de producție. În ciuda utilizării pe scară largă a vaccinurilor și a măsurilor de biosecuritate, BIA continuă să fie o provocare majoră pentru sectorul avicol, în special din cauza apariției constante a variantelor virale noi, generate prin mutații și procese de recombinare genetică. Aceste tulpini emergente reduc eficiența vaccinurilor existente, întrucât imunitatea conferită de un serotip oferă o protecție încrucișată limitată față de celelalte variante circulante.

Simptomele clinice ale bolii sunt variate și includ manifestări respiratorii, afectarea aparatului reproducător și, în cazuri grave, mortalitate crescută, mai ales în prezența infecțiilor secundare. Particularitatea IBV constă în capacitatea sa de a afecta simultan mai multe sisteme ale organismului, ceea ce amplifică severitatea evoluției clinice și dificultatea diagnosticului diferențial.

II. CERCETĂRI PROPRII

Cea de-a doua parte, cuprinde cercetările proprii care au avut ca scop clarificarea patogenezii virusului și optimizarea strategiei de vaccinare cu ajutorul unor tulpini locale specifice, se extinde pe 99 pagini și este compusă din cinci capitole.

Fiecare capitol este structurat în patru subcapitole și anume:

- Scop și obiective
- Materiale și metode
- Rezultate și discuții
- Concluzii

CAPITOLUL 2. CERCETĂRI PRIVIND PREZENȚA ANTICORPILOR ANTI VIRUSUL BRONȘITEI INFECȚIOASE LA BROILERI CRESCUȚI ÎN PARTEA DE SUD-VEST A ROMÂNIEI

Scopul studiului a fost de a detecta prezența anticorpilor IBV la puii de carne vaccinați și de a determina originea post-vaccinală sau infecțiile cu tulpini sălbatice circulante.

Materiale și metode:

În perioada 2018 - 2021, au fost colectate un total de 2466 de probe de sânge de la pui broiler din rasa Ross 308, cu vârste între 35 și 45 de zile, proveniți din cinci ferme comerciale situate în sud-vestul României (județele Caraș-Severin, Hunedoara, Gorj, Vâlcea și Dolj). În fiecare județ a fost selectată câte o fermă, cu una sau mai multe hale de producție, totalizând 137 de spații de cazare (serii/hale).

Recoltările de sânge s-au efectuat în scopul detecției serologice a anticorpilor anti-IBV, toate animalele incluse în studiu fiind anterior vaccinate împotriva agenților patogeni respiratori. După recoltare, sângele a fost lăsat la temperatura camerei pentru obținerea serului, care ulterior a fost congelat până la testare. Analiza serurilor s-a realizat prin tehnica ELISA, în laboratorul Synevovet România, conform protocolului standardizat.

Rezultate și discuții:

Rezultatele au evidențiat o seroprevalență generală de 85,77% probe pozitive și 14,23% probe negative, anticorpi anti-IBV fiind identificați în toate halele studiate (137/137). Cu toate acestea, probe negative au fost înregistrate în 63% dintre hale.

Analiza titrurilor de anticorpi a arătat: 13 hale (9,48%) cu titruri medii >6000 – suspiciune de infecție cu tulpină sălbatică; 50 hale (36,49%) cu titruri maxime >9000, dintre care 56% au avut un coeficient de variație (CV%) >60%, ceea ce indică o protecție neuniformă și necesitatea ajustării schemei de vaccinare; și opt hale (16%) cu indice de vaccinare (VI) >200 – sugestiv pentru evoluția clinică a bolii.

Pe județe, seroprevalența a variat între 78,67% (Vâlcea) și 89,24% (Hunedoara). Suspiciuni de infecție cu tulpini sălbatice (titru >9000) au fost înregistrate în toate județele și în aproape fiecare an de studiu.

Analiza statistică (Fisher's exact test) a evidențiat diferențe semnificative între unele județe în ceea ce privește proporția de seruri pozitive/negative și numărul de hale cu suspiciuni de infecție activă.

Aceste rezultate subliniază necesitatea ajustării strategiilor de vaccinare în funcție de specificul epidemiologic al fiecărei ferme, în vederea reducerii riscului de infecție cu tulpini virale sălbatice și creșterii eficienței programelor de profilaxie.

CAPITOLUL 3. DETECTAREA MOLECULARĂ A VIRUSURILOR BRONȘITEI INFECȚIOASE AVIARE LA PUI BROILERI ÎN SUD VESTUL ROMÂNIEI

Virusul bronșitei infecțioase aviare (IBV) este agentul etiologic al unei boli virale extrem de contagioase, responsabilă de pierderi economice majore în industria avicolă la nivel global. Scopul acestui studiu a fost de a evalua prevalența și variantele IBV în fermele de pui de carne, în acest sens fiind realizat un program specific de supraveghere pentru a studia epidemiologia moleculară a virusului bronșitei infecțioase (IBV) la puii de carne crescuți în cinci ferme din cinci județe, aceleași care au fost prezentate în capitolul anterior, situate în sud vestul României.

Materiale și metode:

Studiul a inclus un număr de 1630 probe (tampoane oronazale, cloacale, tonsile cecale, rinichi), din 192 de hale/serii, de la puii broiler crescuți în cinci ferme din cinci județe, aceleași care au fost prezentate în capitolul anterior. Probele au fost grupate câte 10 în eșantion/pool. Acest studiu s-a desfășurat între 2018 și 2020 în ferme situate în sud vestul României.

Detectarea IBV a fost făcută prin detectarea ARN -ului viral, care ulterior a fost supus metodei de diagnostic molecular PCR, din probele din grupurile pozitive în conformitate cu rezultatele ELISA obținute în capitolul anterior.

Rezultate și discuții:

Testarea prin RT-PCR a evidențiat că 118 eșantioane (72,39%) au fost pozitive pentru IBV, iar 45 (27,61%) au fost negative. Dintre cele pozitive, au fost identificate atât tulpini vaccinale, cât și tulpini sălbatice (nevaccinale).

Tulpinile vaccinale identificate au fost:

- ✓ 4/91 – 60 cazuri (36,81%)
- ✓ Mass – 15 cazuri (9,20%)
- ✓ CR88 – 14 cazuri (8,59%)
- ✓ 1/96 – 7 cazuri (4,29%)
- ✓ IBIRD – 7 cazuri (4,29%)

Tulpinile sălbatice identificate au inclus:

- Qx – 4 cazuri (2,45%)
- D274 – 2 cazuri (1,23%)
- Variant 2 – 2 cazuri (1,23%)
- Arkansas – 1 caz (0,61%)
- 6 cazuri (3,68%) au fost pozitive, dar nesecvențiable.

Rezultatele evidențiază circulația concomitentă a tulpinilor vaccinale și sălbatice în teren, confirmând persistența riscului epidemiologic și subliniind necesitatea adaptării schemelor de vaccinare la realitățile locale, în scopul prevenirii infecțiilor clinice și subclinice cu tulpini virale sălbatice.

CAPITOLUL 4. CONTRIBUȚII LA CUNOAȘTEREA PREZENȚEI INFESTAȚIEI CU *EIMERIA* SPP. LA BROILERI ÎN FERME CU EVOLUȚIE IBV

Coccidioza este una dintre cele mai semnificative și costisitoare afecțiuni care influențează industria avicolă la scară globală. Scopul studiului a fost de a determina prevalența parazitismului cu *Eimeria* spp. la puii broiler din fermele din vestul României și de a identifica speciile detectate prin tehnici de biologie moleculară.

Materiale și metode:

Studiul a constat în prelevarea randomică a 10 probe de fecale, individualizate, ambalate, refrigerate, din hale de pui broiler din cinci ferme avicole, câte una din fiecare județ, localizate în sud-vestul României (Caraș-Severin, Hunedoara, Gorj, Vâlcea și Dolj). Au fost înregistrate date despre păsările studiate și despre tehnologiile utilizate în spațiile de unde provin acestea. Fermele au fost dotate cu sisteme moderne de ventilație, climatizare (inclusiv răcire tip "Pad-Cooling") și încălzire cu gaze. Adăparea s-a realizat prin linii automate cu picurătoare și medicatoare, iar furajarea prin silozuri exterioare și linii suspendate acționate cu senzori. Iluminatul și microclimatul au fost automatizate, iar fiecare hală a fost echipată cu sistem de alarmare și generator electric de rezervă. Între cicluri s-au aplicat proceduri riguroase de igienizare: curățare mecanică, spălare cu apă sub presiune, dezinfecție și văruire, urmate de vid sanitar (15 - 20 zile). După aplicarea așternutului proaspăt, halele au fost pregătite pentru populare cu pui de o zi. Toate activitățile s-au desfășurat exclusiv în interiorul halelor, cu respectarea strictă a măsurilor de biosecuritate.

Analiza probelor de fecale pentru detectarea oochisturilor de *Eimeria* spp. a fost realizată prin metoda flotației. Analiza ADN - ului și caracterizarea moleculară a fost efectuată după protocolul descris de Györke și col., 2013. Secvențierea a fost efectuată la laboratoarele MacroGen, Olanda, după curățarea produsilor PCR în laboratorul PCR – parazitologie al FMVT.

Rezultate și discuții:

Analiza coproparazitologică prin metoda flotației, efectuată pe 10 probe de la broileri, a evidențiat prezența oochisturilor de *Eimeria* în toate fermele studiate. Dimensiunile oochisturilor au variat între 6.7 - 23.8 μm lungime și 4.57–13.8 μm lățime.

Specia *Eimeria acervulina* se localizează în principal în jumătatea anterioară a intestinului subțire, în special în duoden. Oochisturile acesteia au pereți elipsoidali, fără capac micropilar, cu o granula polară proeminentă și dimensiuni medii de aproximativ 20 x 17 μm. Sporochisturile sunt alungite, cu un corp Stieda prezent la vârful anterior.

Eimeria tenella, una dintre cele mai patogene specii, afectează cecumul, provocând hemoragii și, în forme severe, anemie și mortalitate prin șoc hipovolemic. Oochisturile sale sunt largi și ovoidale, cu pereți dubli, fără capac micropilar, având dimensiuni de aproximativ 21 x 17 μm, iar sporochisturile sunt late și ușor conice.

Analizele moleculare PCR au confirmat prezența speciilor *E. acervulina* și *E. tenella* în toate probele supuse testării, confirmare susținută și de secvențierea și analiza Blastn.

CAPITOLUL 5. TESTAREA EFICACITĂȚII TERAPEUTICE A UNOR PRODUSE ÎN INFESTAȚIA EXPERIMENTALĂ CU *EIMERIA* SPP. LA BROILER

În condițiile creșterii intensive a puilor de găină, unde există posibilitatea unei infestări naturale cu eimerii, eficiența chimioprofilaxiei rămâne un subiect intens studiat. În acest context, scopul studiului de față a fost de a evalua eficiența chimioprofilaxiei în condiții experimentale, prin testarea eficacității terapeutice a unor produse împotriva infestației experimentale cu *Eimeria* spp. la broileri.

Materiale și metode:

Studiul a inclus un număr de 60 pui broiler ROS 308 achiziționați și întreținuți împreună până la vârsta de 5 zile pentru acomodare cu condițiile experimentale. În a cincea zi de viață s-au format randomic șase loturi (1, 2, 3, 4, 5, 6) de câte 10 de pui pe lot.

Toate păsările au fost vaccinate împotriva bolii de Newcastle și bursitei infecțioase, iar furajele și apa au fost administrate la discreție.

După adaptarea păsărilor în noile boxe, grupurile 1, 4, 5 și 6 au fost infestate oral cu $5,39 \times 10^4$ oochisturi de *Eimeria tenella* (56%), *Eimeria acervulina* (36%) și *E. maxima* (8%). Începând cu a șaptea zi experimentală, respectiv a doua zi după infestare, grupurile 3, 4, 5 și 6 au fost supuse chimioprofilaxiei cu ZAC3, Monenzin, ZAC3 și, respectiv, TAC3. Tratamentul a fost administrat zilnic până la finalul experimentului.

Rezultate și discuții:

Eliminarea oochisturilor a fost mai intensă la puii din lotul 1 (infestat și hrănit cu furaj neaditivat), decât la puii din loturile hrănite cu furaj aditivat, cu excepția lotului 3 (neinfestat experimental) hrănit cu furaj aditivat cu ZAC3, lot care a avut o eliminare semnificativă de elemente parazitare în prima fază. Dintre loturile hrănite cu furaj aditivat, monenzinul (lotul 4) a avut o acțiune mai puțin eficientă asupra eliminării oochisturilor comparativ cu lotul hrănit cu furaj aditivat TAC3 (lotul 6), dar a fost mai eficient decât ZAC3 (lotul 5).

Loturile neinfestate (lotul 2 și lotul 3) au înregistrat cel mai mare consum de furaje, urmate de cele infestate și hrănite cu furaje aditivate, în timp ce lotul infestat și hrănit cu furaj neaditivat () a consumat cantitatea cea mai mică de furaje.

Sporul mediu zilnic cel mai mare a fost observat la puii broiler infestați cu eimerii și hrăniți cu furaj aditivat cu ZAC3 și TAC3, urmat de puii hrăniți cu furaj aditivat cu Monenzin și lotul martor negativ, iar cel mai mic spor mediu zilnic a fost înregistrat la puii broiler infestați și netratați. Evoluția greutateii corporale a fost cea mai lentă la grupul infestat și netratat, în timp ce grupul infestat și tratat cu Monenzin a înregistrat cele mai semnificative creșteri în greutate, urmat de grupurile hrănite cu furaj aditivat ZAC3 și TAC3.

Nu au existat diferențe semnificative între grupul neinfestat și cele infestate și tratate cu ZAC3 și TAC3, ceea ce sugerează că ambele substanțe au avut un efect pozitiv asupra greutateii grupurilor infestate.

III. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Studiul serologic realizat prin testul ELISA a evidențiat o prevalență ridicată a anticorpilor împotriva virusului bronșitei infecțioase aviare (IBV) în fermele de broileri analizate din sud-vestul României, sugerând o expunere semnificativă la agentul patogen.

Nivelul crescut al titrului de anticorpi în peste o treime dintre halele investigate indică o posibilă circulație a tulpinilor virale sălbatice de IBV, evidențiind necesitatea unei monitorizări continue a statusului de sănătate a efectivelor.

Coeficientul de variație ridicat în mai mult de jumătate dintre halele suspecte sugerează deficiențe în actuala schemă de vaccinare, impunând reevaluarea și optimizarea acesteia pentru o protecție mai eficientă împotriva infecției cu IBV.

Indicele de vaccinare înregistrat în cadrul studiului a arătat că un procent semnificativ de hale prezintă valori sugestive pentru o posibilă evoluție clinică a bolii, ceea ce subliniază necesitatea unei abordări mai riguroase în gestionarea imunizării efectivelor.

Rezultatele obținute subliniază importanța extinderii investigațiilor serologice și a implementării analizelor moleculare pentru diferențierea precisă între tulpinile vaccinale și cele sălbatice, contribuind astfel la o mai bună înțelegere și control al bolii în fermele de broileri.

Studiul de față oferă o imagine clară asupra prevalenței virusului bronșitei infecțioase aviare (IBV) în industria avicolă din sud-vestul României, utilizând atât metode serologice, cât și moleculare pentru o evaluare complexă a situației epidemiologice.

Analiza RT-PCR a evidențiat prezența atât a tulpinilor vaccinale (793B – 4/91, CR88, 1/96, IBIRD și MASS), cât și a celor sălbatice (D274, Variant 2, Arkansas și Qx), subliniind diversitatea genetică a virusului și necesitatea diferențierii precise a acestora în scopul optimizării strategiilor de control.

Rezultatele obținute demonstrează importanța supravegherii continue a IBV, având în vedere apariția unor noi variante și modificarea dinamicii prevalenței virusului, ceea ce impune o atenție sporită asupra evoluției epidemiologice.

Având în vedere patogenitatea serotipurilor emergente de IBV, informațiile epidemiologice furnizate prin acest studiu sunt esențiale pentru ajustarea și îmbunătățirea strategiilor de vaccinare în fermele de broileri, contribuind astfel la reducerea impactului economic și sanitar al bolii.

Studiul subliniază necesitatea unor măsuri prompte și eficiente de control, bazate pe date serologice și moleculare, pentru a proteja efectivele de broileri și a preveni răspândirea tulpinilor virale sălbatice în fermele avicole.

Studiul evidențiază prezența speciilor *Eimeria acervulina* și *Eimeria tenella* în fermele intensive de creștere a puilor de carne din vestul României, subliniind impactul acestora asupra sănătății efectivelor și a productivității.

Diagnosticul corect al infestațiilor cu *Eimeria* spp. necesită o abordare complexă, bazată pe corelarea datelor clinice, necropsice, morfometrice și a timpului mediu de sporulare, confirmarea finală realizându-se prin tehnici moleculare, cum ar fi PCR.

Infecțiile mixte cu mai multe specii de *Eimeria* complică semnificativ tabloul clinic și morfologic, ceea ce face necesară utilizarea unor metode de diagnostic avansate pentru identificarea precisă a agenților patogeni implicați.

Studiul subliniază necesitatea implementării unor programe de supraveghere și diagnostic îmbunătățite în sectorul avicol, pentru a facilita identificarea timpurie și controlul eficient al infestațiilor cu *Eimeria* spp..

Rezultatele obținute pun în evidență importanța adoptării unor măsuri de biosecuritate și a strategiilor terapeutice și profilactice adecvate, menite să reducă impactul economic și sanitar al coccidiozei în fermele avicole.

Rezultatele studiului indică faptul că eliminarea oochisturilor a fost semnificativ mai mare în lotul infestat și netratat comparativ cu loturile tratate, evidențiind eficacitatea tratamentelor utilizate. Lotul tratat cu ZAC3 a prezentat inițial o eliminare masivă de elemente parazitare, ceea ce sugerează o posibilă reacție inițială la tratament.

Comparativ între loturile tratate, Monenzin a demonstrat o eficacitate moderată în reducerea eliminării oochisturilor, fiind mai eficient decât ZAC3, dar inferior față de TAC3, ceea ce evidențiază variațiile de eficacitate între produsele testate.

Consumul de furaj a fost cel mai ridicat în loturile neinfestate, în timp ce loturile infestate și hrănite cu furaje aditivate au prezentat un consum intermediar. Cel mai scăzut consum a fost înregistrat în lotul infestat și netratat, reflectând impactul negativ al infestației asupra apetitului și sănătății generale a efectivelor.

Sporul mediu zilnic cel mai mare a fost observat la broilerii infestați și hrăniți cu ZAC3 și TAC3, demonstrând efectul benefic al acestor tratamente asupra creșterii în condiții de infestație. Cel mai mic spor

mediu zilnic a fost înregistrat la lotul infestat și netratat, subliniind impactul negativ al infecției netratate asupra performanței de creștere.

Evoluția greutateii corporale a fost cea mai slabă la lotul infestat și netratat, în timp ce lotul tratat cu Monenzin a înregistrat cea mai mare creștere ponderală, urmat de loturile hrănite cu ZAC3 și TAC3, ceea ce sugerează o eficacitate variabilă a diferitelor tratamente utilizate.

Diferențele nesemnificative de greutate între lotul neinfestat și loturile infestate hrănite cu ZAC3 și TAC3 indică faptul că aceste tratamente au avut un efect pozitiv asupra greutateii corporale, contribuind la reducerea impactului infestației asupra performanței de creștere.

IV. ELEMENTE DE ORIGINALITATE

Teza de față se distinge printr-o abordare integrativă, combinând metode serologice, moleculare și experimentale pentru evaluarea statusului sanitar veterinar al efectivelor de broileri din sud-vestul României. Prin evidențierea simultană a circulației tulpinilor vaccinale și sălbatice de IBV, alături de testarea comparativă a eficienței tratamentelor anticoccidiene, cercetarea aduce contribuții originale la cunoașterea epidemiologiei acestor afecțiuni. Lipsa unor studii anterioare similare în regiune conferă cercetării un caracter de pionierat, iar rezultatele obținute pot contribui semnificativ la optimizarea strategiilor de vaccinare și control în sectorul avicol românesc.

Caracterul de noutate

✓ Studiu regional inedit asupra IBV - Evaluarea serologică și moleculară a virusului bronșitei infecțioase aviare (IBV) în fermele de broileri din sud-vestul României oferă date epidemiologice noi pentru această regiune, care nu a fost suficient documentată anterior. Noutatea constă în Identificarea simultană a tulpinilor vaccinale și sălbatice (prin RT-PCR) și Corelarea acestora cu parametri serologici și indicii de vaccinare în ferme comerciale reale.

✓ Detectarea diversității genetice virale în teren - Studiul aduce date noi privind circulația concomitentă a mai multor genotipuri virale (inclusiv D274, Variant 2, Arkansas, Qx), subliniind complexitatea ecologică actuală a virusului în România.

✓ Integrarea metodelor serologice și moleculare - Utilizarea concomitentă a ELISA și RT-PCR pentru diagnostic și diferențiere între tulpini vaccinale și sălbatice reprezintă o abordare multimodală complexă, rar aplicată în studiile regionale de acest tip.

✓ Evaluarea eficacității comparative a tratamentelor anticoccidiene - Compararea eficienței produselor ZAC3, TAC3 și Monenzin în condiții experimentale de infecție cu *Eimeria* spp., corelată cu date clinice, parazitologice și zootehnice (greutate, spor mediu zilnic, consum de furaje), reprezintă un experiment complex, cu relevanță practică ridicată.

✓ Abordare integrată a coccidiozei aviare în ferme comerciale - Combinarea evaluării infecțiilor naturale cu *Eimeria* și a infecțiilor experimentale controlate, împreună cu metode morfometrice, clinice, PCR și performanță de creștere, este un demers metodologic avansat și rar întâlnit în literatura autohtonă.

Gradul de originalitate

✓ Originalitate în designul studiului - Structura cercetării, care integrează aspecte epidemiologice, imunologice, genetice, terapeutice și zootehnice, denotă o viziune sistemică și originală asupra problematicei bolilor infecțioase și parazitare în avicultură.

- ✓ Analiza critică a schemelor de vaccinare - Studiul aduce o contribuție originală prin identificarea ineficienței vaccinării curente și propune o reevaluare a strategiilor de imunizare, bazată pe date concrete din teren.
- ✓ Utilizarea comparativă a produselor anticoccidiene mai puțin studiate (ZAC3 și TAC3) - Originalitatea constă în testarea unor soluții alternative la tratamentele clasice, cu implicații directe în practica veterinară și în optimizarea managementului sanitar în ferme.
- ✓ Context național subdocumentat - Lipsa datelor publicate anterior privind prevalența și tipologia infecțiilor cu IBV și *Eimeria* în zonele vizate conferă studiului un caracter original și pionierat la nivel local și regional.

THESIS SUMMARY

This thesis includes:

- Abstracts in Romanian, English, and French
- Introduction
- Current State of Knowledge: 36 pages
- Original Research: 99 pages
- Tables: 35
- Figures: 59
- Bibliographic Sources: 329

I. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The first part of the thesis spans 36 pages and is organized into a single chapter, structured into nine distinct subchapters, as follows: **History and Significance, Etiology, Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Presentation, Morphopathological Features, Diagnosis, Treatment, and Prevention and Control**. This section provides a comprehensive and detailed overview of avian infectious bronchitis, emphasizing the key aspects that define the disease from an etiological, epidemiological, and clinical standpoint, as well as diagnostic, therapeutic, and preventive approaches. Each subchapter is dedicated to a fundamental component of the disease, offering an up-to-date scientific perspective necessary for the effective understanding and management of this condition within the context of modern avian pathology.

CHAPTER 1. AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS (IB)

The first chapter of the thesis provides a comprehensive and integrated overview of avian infectious bronchitis (IB), with a focus on the key aspects that define this viral disease, which has a significant impact on the poultry industry. The chapter is structured into nine subchapters addressing the following topics: the history and significance of the disease, etiology, epidemiology, pathogenesis, clinical and morphopathological presentation, diagnosis, treatment, and prevention and control measures.

Avian infectious bronchitis is a highly contagious viral disease caused by the avian coronavirus (IBV – Infectious Bronchitis Virus), affecting domestic poultry worldwide, regardless of age or production category. Despite the widespread use of vaccines and biosecurity measures, IB remains a major challenge for the poultry sector, mainly due to the constant emergence of new viral variants generated through mutations and genetic recombination. These emerging strains reduce the efficacy of existing vaccines, as the immunity induced by one serotype offers limited cross-protection against other circulating variants.

The clinical signs of the disease are diverse and include respiratory symptoms, reproductive tract impairment, and, in severe cases, high mortality - especially in the presence of secondary infections. A distinctive feature of IBV is its ability to simultaneously affect multiple organ systems, which increases the severity of the clinical course and complicates differential diagnosis.

II. ORIGINAL RESEARCH

The second part of the thesis, comprising original research aimed at clarifying the pathogenesis of the virus and optimizing the vaccination strategy using specific local strains, spans 99 pages and is divided into five chapters. Each chapter is structured into four subchapters, as follows:

- Aim and Objectives
- Materials and Methods
- Results and Discussion
- Conclusions

CHAPTER 2. RESEARCH ON THE PRESENCE OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) ANTIBODIES IN BROILER CHICKENS RAISED IN THE SOUTH-WESTERN REGION OF ROMANIA

Aim of the Study:

The objective of this study was to detect the presence of IBV antibodies in vaccinated broiler chickens and to determine whether they originated from post-vaccination responses or infections with circulating wild-type strains.

Materials and Methods:

Between 2018 and 2021, a total of 2,466 blood samples were collected from Ross 308 broiler chickens, aged between 35 and 45 days, originating from five commercial farms located in the south-western region of Romania (Caraș-Severin, Hunedoara, Gorj, Vâlcea, and Dolj counties). One farm was selected in each county, each comprising one or more production houses, totaling 137 broiler houses (flocks). Blood was collected for the serological detection of anti-IBV antibodies, and all animals included in the study had been previously vaccinated against respiratory pathogens. After collection, the blood samples were left at room temperature to allow serum separation, which was subsequently frozen until testing. Serum samples were analyzed using the ELISA method at the Synevovet Romania laboratory, following a standardized protocol.

Results and Discussion:

The results revealed an overall seroprevalence of 85.77% positive samples and 14.23% negative samples. Anti-IBV antibodies were identified in all 137 broiler poultry houses studied. However, negative samples were recorded in 63% of the houses.

The analysis of antibody titers showed the following: 13 poultry houses (9.48%) with average titers >6000 – suggestive of infection with wild-type strains; 50 poultry houses (36.49%) with peak titers >9000, of which 56% had a coefficient of variation (CV%) >60%, indicating uneven protection and the need for vaccination protocol adjustments; 8 poultry houses (16%) had a vaccination index (VI) >200 – indicative of clinical evolution of the disease.

By county, seroprevalence ranged from 78.67% in Vâlcea to 89.24% in Hunedoara. Suspected infections with wild-type strains (titers >9000) were recorded in all counties and in nearly every year of the study.

Statistical analysis (Fisher's exact test) revealed significant differences between some counties in terms of the proportion of positive/negative sera and the number of poultry houses with suspected active infections.

These findings highlight the need to adjust vaccination strategies according to the epidemiological profile of each farm in order to reduce the risk of wild-type viral infections and increase the effectiveness of prophylactic programs.

CHAPTER 3. MOLECULAR DETECTION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN BROILER CHICKENS IN SOUTH-WESTERN ROMANIA

The avian infectious bronchitis virus (IBV) is the etiological agent of a highly contagious viral disease responsible for significant economic losses in the global poultry industry. The aim of this study was

to assess the prevalence and variants of IBV in broiler farms. To this end, a specific surveillance program was implemented to investigate the molecular epidemiology of IBV in broiler chickens raised on five farms located in five counties in south-western Romania - the same farms presented in the previous chapter.

Materials and Methods:

The study included 1,630 samples (oronasal swabs, cloacal swabs, cecal tonsils, kidneys) collected from 192 poultry houses/flocks from the same five farms across five counties. Samples were pooled in groups of 10 per sample/pool. The study was conducted between 2018 and 2020 in farms located in the south-western region of Romania. IBV detection was performed through the identification of viral RNA, which was subsequently subjected to PCR-based molecular diagnostic methods. Testing was carried out on pooled samples that had shown positive ELISA results, as detailed in the previous chapter.

Results and Discussion:

RT-PCR testing revealed that 118 samples (72.39%) were positive for IBV, while 45 samples (27.61%) were negative. Among the positive samples, both vaccine and wild-type (non-vaccine) strains were identified.

Identified vaccine strains included:

- 4/91 – 60 cases (36.81%)
- Mass – 15 cases (9.20%)
- CR88 – 14 cases (8.59%)
- 1/96 – 7 cases (4.29%)
- IBIRD – 7 cases (4.29%)

Identified wild-type strains included:

- Qx – 4 cases (2.45%)
- D274 – 2 cases (1.23%)
- Variant 2 – 2 cases (1.23%)
- Arkansas – 1 case (0.61%)
- 6 cases (3.68%) were positive but unsequenced.

The results confirm the concurrent circulation of both vaccine and wild-type strains in the field, emphasizing the ongoing epidemiological risk and highlighting the need to adapt vaccination protocols to local conditions in order to prevent both clinical and subclinical infections caused by wild-type viral strains.

CHAPTER 4. CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF *EIMERIA* SPP. INFESTATION IN BROILERS FROM FARMS WITH ONGOING IBV CIRCULATION

Coccidiosis is one of the most significant and costly diseases affecting the poultry industry on a global scale. The aim of this study was to determine the prevalence of *Eimeria* spp. parasitism in broiler chickens from farms located in western Romania and to identify the detected species using molecular biology techniques.

Materials and Methods:

The study involved the random collection of 10 individual, packaged, refrigerated fecal samples from poultry houses on five commercial broiler farms, one in each county located in south-western Romania (Caraș-Severin, Hunedoara, Gorj, Vâlcea, and Dolj). Data were recorded on the birds and the technologies used in the poultry houses from which the samples were collected. The farms were equipped with modern ventilation systems, climate control (including "pad-cooling" systems), and diesel-based heating. Water was supplied via automated nipple drinker lines with dosing systems, and feed was distributed through exterior silos and suspended feeding lines operated by sensors. Lighting and microclimate conditions were automated, and each poultry house was equipped with an alarm system and backup power generator.

Between production cycles, rigorous sanitation procedures were applied: mechanical cleaning, high-pressure water washing, disinfection, and whitewashing, followed by a sanitary vacancy period (15–20 days). After the application of fresh bedding, the poultry houses were prepared for restocking with day-old chicks. All production activities took place exclusively inside the poultry houses, in strict compliance with biosecurity measures.

The fecal samples were analyzed for the detection of *Eimeria* spp. oocysts using the flotation method. DNA analysis and molecular characterization were performed following the protocol described by Györke et al., 2013. Sequencing was carried out at MacroGen Laboratories, Netherlands, after PCR product purification in the Parasitology PCR Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine in Timișoara (FMVT).

Results and Discussion:

Coprological analysis using the flotation method, performed on 10 samples from broiler chickens, revealed the presence of *Eimeria* oocysts in all farms examined. The oocyst dimensions ranged from 6.7–23.8 μm in length and 4.57–13.8 μm in width.

Eimeria acervulina primarily localizes in the anterior half of the small intestine, especially in the duodenum. Its oocysts are ellipsoidal, lacking a micropyle cap, with a prominent polar granule and average dimensions of approximately $20 \times 17 \mu\text{m}$. The sporocysts are elongated, with a distinct Stieda body at the anterior tip.

Eimeria tenella, one of the most pathogenic species, affects the cecum, causing hemorrhages and, in severe cases, anemia and death due to hypovolemic shock. Its oocysts are large and ovoid, with double walls and no micropyle cap, measuring approximately $21 \times 17 \mu\text{m}$. The sporocysts are broad and slightly conical.

PCR-based molecular analyses confirmed the presence of both *E. acervulina* and *E. tenella* in all tested samples, a finding further supported by sequencing and Blastn analysis.

CHAPTER 5. TESTING THE THERAPEUTIC EFFICACY OF SELECTED PRODUCTS IN EXPERIMENTAL *EIMERIA* SPP. INFESTATION IN BROILER CHICKENS

Under intensive broiler production conditions, where natural *Eimeria* infestation is likely, the effectiveness of chemoprophylaxis remains a highly studied subject. In this context, the aim of the present study was to evaluate the efficacy of chemoprophylactic strategies under experimental conditions by testing the therapeutic performance of several products against experimental *Eimeria* spp. infestation in broiler chickens.

Materials and Methods:

The study included 60 Ross 308 broiler chicks, purchased and housed together until 5 days of age for acclimatization to experimental conditions. On day 5, the birds were randomly divided into six groups (1, 2, 3, 4, 5, and 6), each consisting of 10 birds. All birds were vaccinated against Newcastle disease and infectious bursal disease. Feed and water were provided *ad libitum* throughout the trial. After acclimatization, groups 1, 4, 5, and 6 were orally inoculated with 5.39×10^4 oocysts composed of *Eimeria tenella* (56%), *Eimeria acervulina* (36%), and *E. maxima* (8%). Starting from experimental day 7 (i.e., two days post-infestation), groups 3, 4, 5, and 6 received chemoprophylaxis with the following products: ZAC3, Monensin, ZAC3, and TAC3, respectively. Treatment was administered daily until the end of the experiment.

Results and Discussion:

Oocyst shedding was higher in the infested and untreated group compared to the treated groups, with the exception of the ZAC3-treated group, which showed a significant level of oocyst elimination

during the initial phase. Among the treated groups, Monensin showed less efficacy in reducing oocyst excretion compared to TAC3 but performed better than ZAC3.

The highest feed intake was recorded in the non-infested control group, followed by the infested groups treated with supplemented feed, while the infested and untreated group had the lowest feed consumption. The highest average daily weight gain was observed in broilers infected with *Eimeria* spp. and treated with ZAC3 and TAC3, followed by those treated with Monensin and the uninfected control group. The lowest weight gain was recorded in the infected and untreated group.

Body weight evolution was slowest in the infested and untreated group, whereas the group treated with Monensin showed the most significant weight increase, followed by the ZAC3- and TAC3-treated groups.

There were no significant differences between the uninfested control group and the infested groups treated with ZAC3 and TAC3, suggesting that both substances had a positive effect on weight gain in infested broilers.

III. GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

The serological study conducted using the ELISA test revealed a high prevalence of antibodies against Infectious Bronchitis Virus (IBV) in broiler farms located in south-western Romania, suggesting significant exposure to the pathogen.

The elevated antibody titers observed in over one-third of the investigated poultry houses indicate a potential circulation of wild-type IBV strains, highlighting the need for ongoing health monitoring of flocks.

The high coefficient of variation (CV%) recorded in more than half of the suspected poultry houses suggests deficiencies in the current vaccination scheme, underscoring the need for its reassessment and optimization to ensure more effective protection against IBV infection.

The vaccination index (VI) recorded during the study showed that a significant proportion of poultry houses had values indicative of possible clinical evolution of the disease, underlining the need for a more rigorous approach to flock immunization management. The findings emphasize the

importance of extending serological investigations and implementing molecular analyses to precisely differentiate between vaccine and wild-type strains, thereby contributing to a better understanding and control of the disease in broiler farms.

This study provides a clear overview of the prevalence of Infectious Bronchitis Virus (IBV) within the poultry industry in south-western Romania, employing both serological and molecular methods for a comprehensive epidemiological assessment.

RT-PCR analysis revealed the presence of both vaccine strains (793B – 4/91, CR88, 1/96, IBIRD, and MASS) and wild-type strains (D274, Variant 2, Arkansas, and Qx), highlighting the genetic diversity of the virus and the necessity of precise strain differentiation for optimized control strategies.

The results demonstrate the importance of continuous IBV surveillance, given the emergence of new variants and changes in virus prevalence dynamics, which demand increased attention to its evolving epidemiology.

Considering the pathogenicity of emerging IBV serotypes, the epidemiological data provided by this study are essential for refining and improving vaccination strategies in broiler farms, thereby reducing the economic and health impact of the disease.

The study stresses the need for prompt and effective control measures, based on both serological and molecular data, to protect broiler flocks and prevent the spread of wild-type IBV strains in poultry operations.

The research also highlights the presence of *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* species in intensive broiler production systems in western Romania, emphasizing their impact on flock health and productivity.

Accurate diagnosis of *Eimeria* spp. infestations requires a complex approach, involving the correlation of clinical, necropsy, morphometric data, and mean sporulation time, with final confirmation achieved through molecular techniques such as PCR.

Mixed infections with multiple *Eimeria* species significantly complicate the clinical and pathological presentation, necessitating the use of advanced diagnostic methods for precise pathogen identification.

The study emphasizes the need for improved surveillance and diagnostic programs within the poultry sector to enable early detection and effective control of *Eimeria* spp. infestations.

The results underline the importance of adopting strict biosecurity measures, as well as appropriate therapeutic and prophylactic strategies, aimed at reducing the economic and health-related impact of coccidiosis in poultry farms.

The findings show that oocyst shedding was significantly higher in the infested and untreated group compared to the treated groups, highlighting the effectiveness of the treatments applied. The group treated with ZAC3 initially showed a high level of oocyst elimination, suggesting a possible initial treatment response.

Among the treated groups, Monensin showed moderate efficacy in reducing oocyst shedding - more effective than ZAC3 but less effective than TAC3 - demonstrating variability in the efficacy of the tested products.

Feed intake was highest in the uninfested groups, followed by the infested groups fed supplemented diets, while the lowest feed intake was observed in the infested and untreated group, reflecting the negative impact of infestation on appetite and overall flock health.

The highest average daily weight gain was recorded in broilers infested and fed with ZAC3 and TAC3, demonstrating the beneficial effect of these treatments on growth performance under infestation conditions. The lowest average daily gain was recorded in the infested and untreated group, emphasizing the detrimental effects of untreated infection on growth performance.

Body weight evolution was weakest in the infested and untreated group, whereas the group treated with Monensin showed the greatest weight gain, followed by those treated with ZAC3 and TAC3, indicating varying levels of efficacy among the treatments.

The non-significant weight differences between the uninfested control group and the infested groups treated with ZAC3 and TAC3 suggest that these treatments had a positive impact on body weight, helping to mitigate the effects of infestation on growth performance.

IV. ELEMENTS OF ORIGINALITY

This thesis stands out through an integrative approach that combines serological, molecular, and experimental methods to assess the veterinary health status of broiler flocks in south-western Romania. By simultaneously highlighting the circulation of both vaccine and wild-type strains of Infectious Bronchitis Virus (IBV), alongside the comparative testing of anticoccidial treatment efficacy, this research makes original contributions to the understanding of the epidemiology of these conditions. The lack of previous similar studies in the region gives this research a pioneering character, and the results obtained can significantly contribute to optimizing vaccination and disease control strategies in the Romanian poultry sector.

Innovative Aspects

- ✓ Novel regional study on IBV – The serological and molecular evaluation of IBV in broiler farms in south-western Romania provides new epidemiological data for a region previously insufficiently documented. The novelty lies in the simultaneous identification of both vaccine and wild-type strains (via RT-PCR) and their correlation with serological parameters and vaccination indices in commercial poultry houses.
- ✓ Detection of viral genetic diversity in the field – The study brings new insights into the concurrent circulation of multiple viral genotypes (including D274, Variant 2, Arkansas, Qx), underlining the current ecological complexity of the virus in Romania.
- ✓ Integration of serological and molecular methods – The concurrent use of ELISA and RT-PCR for diagnosis and differentiation between vaccine and wild-type strains represents a complex multimodal approach, rarely applied in regional studies of this kind.
- ✓ Comparative evaluation of anticoccidial treatments – The efficacy of ZAC3, TAC3, and Monensin was tested under controlled experimental infection with *Eimeria* spp., and the results were correlated with clinical, parasitological, and zootechnical data (weight gain, average daily gain, feed intake), resulting in a complex experiment with high practical relevance.
- ✓ Integrated approach to avian coccidiosis in commercial farms – The combination of natural infection assessment with controlled experimental infestation, along with morphometric, clinical, PCR, and performance indicators, represents an advanced methodological approach, rarely found in the national literature.

Degree of Originality

- ✓ Original study design – The research structure integrates epidemiological, immunological, genetic, therapeutic, and zootechnical components, reflecting a systemic and original perspective on infectious and parasitic diseases in poultry production.
- ✓ Critical analysis of vaccination protocols – The study makes an original contribution by identifying shortcomings in current vaccination practices and proposing a reevaluation of immunization strategies, based on real-world field data.
- ✓ Comparative use of lesser-studied anticoccidial products (ZAC3 and TAC3) – The originality lies in testing alternative solutions to conventional treatments, with direct implications for veterinary practice and health management optimization in broiler farms.
- ✓ Underdocumented national context – The absence of previously published data regarding the prevalence and typology of IBV and *Eimeria* infections in the targeted regions lends this study an original and pioneering character at both local and regional levels.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

RÉSUMÉ DE LA THÈSE DE DOCTORAT INTITULÉE

RECHERCHE SUR LA BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE CHEZ LES POULET DE CHAIR DU SUD-OUEST DE LA ROUMANIE”,

Développé par le doctorant Dr. méd. vétérinaire. ORGHICI GABRIEL, sous la direction scientifique du Prof. Dr. HERMAN VIOREL

Cette thèse contient :

- Résumés en roumain, anglais et français
- Introduction
- État actuel des connaissances : 36
- Recherche personnelle : 99
- Tableaux : 35
- Figures : 59
- Sources bibliographiques : 329

III. ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

La première partie de la thèse s'étend sur 36 pages et est organisée en un seul chapitre, structuré en neuf sous-chapitres distincts, comme suit : **Histoire et importance, Étiologie, Épidémiologie, Pathogénèse, Tableau clinique, Tableau morphopathologique, Diagnostic, Traitement, Prophylaxie et contrôle.**

Cette section offre un aperçu complet et détaillé de la bronchite infectieuse aviaire, en insistant sur les aspects essentiels qui définissent la maladie d'un point de vue étiologique, épidémiologique et clinique, ainsi que sur les moyens de diagnostic, de traitement et de prévention. Chaque sous-chapitre est consacré à un élément fondamental de la maladie, offrant une perspective scientifique actualisée, nécessaire à la compréhension et à la prise en charge efficace de cette affection dans le contexte de la pathologie aviaire moderne.

Chapitre 1. Bronchite infectieuse aviaire (BIA)

Le premier chapitre de l'article propose une présentation globale et intégrée de la bronchite infectieuse aviaire (BIA), en mettant l'accent sur les aspects essentiels qui définissent cette maladie virale ayant un impact majeur sur l'industrie avicole. Il est structuré en neuf sous-chapitres traitant de l'histoire et de l'importance de la maladie, de son étiologie, de son épidémiologie, de sa pathogénèse, de son tableau clinique et morphopathologique, de son diagnostic, de son traitement, ainsi que des mesures de prophylaxie et de contrôle.

La bronchite infectieuse est une maladie virale hautement contagieuse causée par le coronavirus aviaire (IBV - *Infectious Bronchitis Virus* / *Virus de la bronchite infectieuse*) qui affecte les volailles domestiques du monde entier, quel que soit leur âge ou leur catégorie de production. Malgré l'utilisation généralisée des vaccins et des mesures de biosécurité, la bronchite infectieuse reste un défi majeur pour le secteur avicole, notamment en raison de l'émergence constante de nouveaux variants viraux générés par des mutations et des processus de recombinaison génétique. Ces souches émergentes réduisent l'efficacité des

vaccins existants, car l'immunité conférée par un sérotype offre une protection croisée limitée contre les autres variants en circulation.

Les symptômes cliniques de la maladie sont variés et incluent des manifestations respiratoires, des atteintes de l'appareil reproducteur et, dans les cas graves, une mortalité accrue, notamment en cas d'infections secondaires. La particularité de l'IBV réside dans sa capacité à affecter simultanément plusieurs systèmes de l'organisme, ce qui amplifie la gravité de l'évolution clinique et complique le diagnostic différentiel.

IV. PROPRES RECHERCHES

La deuxième partie, qui comprend les recherches menées dans le but de clarifier la pathogenèse du virus et d'optimiser la stratégie de vaccination à l'aide de souches locales spécifiques, s'étend sur 99 pages et se compose de cinq chapitres.

Chaque chapitre est structuré en quatre sous-chapitres, à savoir :

- But et objectifs
- Matériels et méthodes
- Résultats et discussion
- Conclusions

Chapitre 2. Recherche sur la présence d'anticorps contre le virus de la bronchite infectieuse chez les poulets de chair élevés dans le sud-ouest de la Roumanie

L'objectif de l'étude était de détecter la présence d'anticorps IBV chez les poulets de chair vaccinés et de déterminer l'origine post-vaccinale des infections par des souches sauvages circulantes.

Matériels et méthodes :

Entre 2018 et 2021, 2 466 échantillons sanguins ont été prélevés sur des poulets de chair Ross 308, âgés de 35 à 45 jours, dans cinq élevages commerciaux situés dans le sud-ouest de la Roumanie (comtés de Caraș-Severin, Hunedoara, Gorj, Vâlcea et Dolj). Dans chaque comté, une exploitation a été sélectionnée, disposant d'un ou plusieurs bâtiments de production, totalisant 137 logements (séries/bâtiments).

Des échantillons sanguins ont été prélevés pour la détection sérologique des anticorps anti-IBV, tous les animaux inclus dans l'étude ayant été préalablement vaccinés contre les agents pathogènes respiratoires. Après le prélèvement, le sang a été laissé à température ambiante pour obtenir du sérum, qui a ensuite été congelé jusqu'aux analyses. L'analyse du sérum a été réalisée par la technique ELISA, au laboratoire Synevovet Roumanie, selon le protocole standardisé.

Résultats et discussion :

Les résultats ont révélé une séroprévalence globale de 85,77 % d'échantillons positifs et de 14,23 % d'échantillons négatifs, des anticorps anti-IBV ayant été identifiés dans tous les élevages étudiés (137/137). Cependant, des échantillons négatifs ont été enregistrés dans 63 % des élevages.

L'analyse des titres d'anticorps a montré : 13 bâtiments (9,48 %) avec des titres moyens > 6 000 – suspicion d'infection par une souche sauvage ; 50 bâtiments (36,49 %) avec des titres maximums > 9 000, dont 56 % avaient un coefficient de variation (CV %) > 60 %, indiquant une protection inégale et la nécessité d'ajuster le schéma de vaccination ; et huit bâtiments (16 %) avec un indice de vaccination (VI) > 200 – suggérant l'évolution clinique de la maladie.

Par comtés, la séroprévalence variait entre 78,67 % (Vâlcea) et 89,24 % (Hunedoara). Des suspicions d'infection par des souches sauvages (titre > 9000) ont été enregistrées dans tous les comtés et presque chaque année de l'étude.

L'analyse statistique (test exact de Fisher) a révélé des différences significatives entre certains comtés en termes de proportion de sérums positifs/négatifs et du nombre de salles suspectées d'infection active.

Ces résultats soulignent la nécessité d'ajuster les stratégies de vaccination en fonction des spécificités épidémiologiques de chaque élevage, afin de réduire le risque d'infection par des souches virales sauvages et d'augmenter l'efficacité des programmes de prophylaxie.

Chapitre 3. Détection moléculaire des virus de la bronchite infectieuse aviaire chez les poulets de chair du sud-ouest de la Roumanie

Le virus de la bronchite infectieuse aviaire (VBI) est l'agent étiologique d'une maladie virale hautement contagieuse, responsable de pertes économiques majeures dans l'industrie avicole mondiale. L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence et les variants du VBI dans les élevages de poulets de chair. À cette fin, un programme de surveillance spécifique a été mis en œuvre pour étudier l'épidémiologie moléculaire du VBI chez les poulets de chair élevés dans cinq élevages répartis dans cinq comtés, ceux présentés dans le chapitre précédent, situés dans le sud-ouest de la Roumanie.

Matériels et méthodes :

L'étude a porté sur 1 630 échantillons (prélèvements oronasaux, cloacaux, amygdales caecales et rénaux), provenant de 192 bâtiments /séries, de poulets de chair élevés dans cinq fermes de cinq comtés, les mêmes que ceux présentés dans le chapitre précédent. Les échantillons ont été regroupés en dix groupes. Cette étude a été menée entre 2018 et 2020 dans des fermes situées dans le sud-ouest de la Roumanie.

La détection de l'IBV a été réalisée en détectant l'ARN viral, qui a ensuite été soumis à la méthode de diagnostic moléculaire PCR, à partir d'échantillons de groupes positifs conformément aux résultats ELISA obtenus dans le chapitre précédent.

Résultats et discussion :

Les tests RT-PCR ont révélé que 118 échantillons (72,39 %) étaient positifs au virus de l'IBV et 45 (27,61 %) étaient négatifs. Parmi les échantillons positifs, des souches vaccinales et sauvages (non vaccinales) ont été identifiées.

Les souches vaccinales identifiées étaient :

- 4/91 – 60 cas (36,81 %)
- Mass – 15 cas (9,20 %)
- CR88 – 14 cas (8,59 %)
- 1/96 – 7 cas (4,29%)
- IBIRD – 7 cas (4,29 %)

Les souches sauvages identifiées comprenaient :

- Qx – 4 cas (2,45 %)
- D274 – 2 cas (1,23 %)
- Variant 2 – 2 cas (1,23 %)
- Arkansas – 1 cas (0,61 %)
- 6 cas (3,68%) étaient positifs mais non séquençables.

Les résultats mettent en évidence la circulation concomitante de souches vaccinales et sauvages sur le terrain, confirmant la persistance du risque épidémiologique et soulignant la nécessité d'adapter les schémas de vaccination aux réalités locales, afin de prévenir les infections cliniques et sous-cliniques par des souches virales sauvages.

Chapitre 4. Contributions à la connaissance de la présence d'infestation par *Eimeria* spp. chez les poulets de chair dans les élevages présentant une évolution de l'IBV

La coccidiose est l'une des maladies les plus importantes et les plus coûteuses affectant l'industrie avicole à l'échelle mondiale. L'objectif de l'étude était de déterminer la prévalence du parasitisme à *Eimeria* spp. chez les poulets de chair d'élevages de l'ouest de la Roumanie et d'identifier les espèces détectées par des techniques de biologie moléculaire.

Matériels et méthodes :

L'étude a consisté à collecter aléatoirement dix échantillons fécaux individuels, conditionnés et réfrigérés dans des poulaillers de cinq élevages de poulets de chair, un par comté, situés dans le sud-ouest de la Roumanie (Caraș-Severin, Hunedoara, Gorj, Vâlcea et Dolj). Les données ont été recueillies sur les oiseaux étudiés et sur les technologies utilisées dans leurs locaux. Les fermes étaient équipées d'une ventilation moderne, d'une climatisation (y compris un système de refroidissement par « Pad-Cooling ») et d'un chauffage au diesel. L'abreuvement était assuré par des conduites automatiques avec goutteurs et dispositifs de dosage, et l'alimentation par des silos extérieurs et des conduites suspendues commandées par capteurs. L'éclairage et le microclimat étaient automatisés, et chaque bâtiment était équipé d'un système d'alarme et d'un générateur électrique de secours. Des procédures d'assainissement rigoureuses étaient appliquées entre les cycles : nettoyage mécanique, lavage à haute pression, désinfection et chaulage, suivis d'une aspiration sanitaire (15 à 20 jours). Après avoir mis la litière toute fraîche, les bâtiments ont été préparés pour accueillir les poussins d'un jour. Toutes les activités se déroulaient exclusivement à l'intérieur des bâtiments, dans le strict respect des mesures de biosécurité.

L'analyse des échantillons fécaux pour la détection des oocystes d'*Eimeria* spp. a été réalisée par la méthode de flottation. L'analyse de l'ADN et la caractérisation moléculaire ont été réalisées selon le protocole décrit par Györke et al., 2013. Le séquençage a été réalisé dans les laboratoires MacroGen, aux Pays-Bas, après nettoyage des produits PCR dans le laboratoire de parasitologie PCR du FMVT.

Résultats et discussion :

Une analyse coproparasitologique par flottation, réalisée sur dix échantillons de poulets de chair, a révélé la présence d'oocystes d'*Eimeria* dans tous les élevages étudiés. La taille des oocystes variait de 6,7 à 23,8 μm de longueur et de 4,57 à 13,8 μm de largeur.

Eimeria acervulina se rencontre principalement dans la moitié antérieure de l'intestin grêle, notamment dans le duodénum. Ses oocystes ont des parois ellipsoïdales, sans calotte micropylaire, avec un granule polaire proéminent et des dimensions moyennes d'environ 20 x 17 μm . Les sporocystes sont allongés, avec un corps de Stieda présent à l'extrémité antérieure.

Eimeria tenella, l'une des espèces les plus pathogènes, affecte le cæcum, provoquant des hémorragies et, dans les formes sévères, une anémie et une mortalité par choc hypovolémique. Ses oocystes sont grands et ovoïdes, à double paroi, sans calotte micropylaire, mesurant environ 21 x 17 μm , et ses sporocystes sont larges et légèrement coniques.

Les analyses de PCR moléculaire ont confirmé la présence des espèces *E. acervulina* et *E. tenella* dans tous les échantillons testés, une confirmation également étayée par le séquençage et l'analyse Blastn.

Chapitre 5. Test de l'efficacité thérapeutique de certains produits lors d'infestations expérimentales par *Eimeria* spp. chez les poulets de chair

Dans les conditions d'élevage intensif de poulets, où une infestation naturelle par *Eimeria* est possible, l'efficacité de la chimioprophylaxie demeure un sujet de recherche intense. Dans ce contexte, la présente étude visait à évaluer l'efficacité de la chimioprophylaxie en conditions expérimentales, en testant

l'efficacité thérapeutique de certains produits contre une infestation expérimentale par *Eimeria* spp. chez les poulets de chair.

Matériels et méthodes :

L'étude comprenait un certain nombre de 60 poulets de chair ROSS 308 achetés et maintenus ensemble jusqu'à l'âge de 5 jours pour s'adapter aux conditions expérimentales. Au cinquième jour de vie, six groupes (1, 2, 3, 4, 5, 6) de 10 poussins par groupe ont été formés aléatoirement.

Tous les oiseaux ont été vaccinés contre la maladie de Newcastle et la bursite infectieuse, et la nourriture et l'eau ont été administrées ad libitum.

Après adaptation des oiseaux aux nouveaux enclos, les groupes 1, 4, 5 et 6 ont été infestés par voie orale avec $5,39 \times 10^4$ oocystes d'*Eimeria tenella* (56 %), d'*Eimeria acervulina* (36 %) et d'*E. maxima* (8 %). À partir du septième jour expérimental, respectivement le deuxième jour après l'infestation, les groupes 3, 4, 5 et 6 ont été soumis à une chimioprophylaxie par ZAC3, Monensin, ZAC3 et TAC3, respectivement. Le traitement a été administré quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérience.

Résultats et discussion :

L'élimination des oocystes était plus élevée dans le groupe infesté et non traité que dans le groupe traité, à l'exception du groupe traité par ZAC3, qui présentait une élimination significative des éléments parasitaires dès la première phase. Parmi les groupes traités, le Monensin avait une action moins efficace sur l'élimination des oocystes que TAC3, mais était plus efficace que ZAC3.

Les groupes non infestés ont enregistré la plus forte consommation d'aliments, suivis de ceux infestés et traités avec des aliments additionnés, tandis que le groupe infesté et non traité a consommé la plus faible quantité d'aliments.

Le gain quotidien moyen le plus élevé a été observé chez les poulets de chair infectés par *Eimeria* et nourris avec ZAC3 et TAC3, suivis des poulets traités au Monensin et du groupe témoin négatif. Le gain quotidien moyen le plus faible a été enregistré chez les poulets de chair infectés et non traités. L'évolution du poids corporel a été la plus lente dans le groupe infesté et non traité, tandis que le groupe infesté et traité au Monensin a enregistré les gains de poids les plus significatifs, suivis des groupes nourris avec ZAC3 et TAC3.

Il n'y avait pas de différences significatives entre le groupe non infesté et celui infesté et traité avec ZAC3 et TAC3, ce qui suggère que les deux substances ont eu un effet positif sur le poids des groupes infestés.

III. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES

L'étude sérologique menée par ELISA a révélé une prévalence élevée d'anticorps contre le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) dans les élevages de poulets de chair analysés dans le sud-ouest de la Roumanie, suggérant une exposition importante au pathogène.

Le niveau élevé de titre d'anticorps dans plus d'un tiers des bâtiments étudiés indique une possible circulation de souches virales IBV sauvages, soulignant la nécessité d'une surveillance continue de l'état de santé des volailles.

Le coefficient de variation élevé dans plus de la moitié des excréments suspects suggère des lacunes dans le programme de vaccination actuel, nécessitant sa réévaluation et son optimisation pour une protection plus efficace contre l'infection par le virus de l'IBV.

L'indice de vaccination enregistré dans l'étude a montré qu'un pourcentage significatif de poulaillers présentait des valeurs suggérant une éventuelle évolution clinique de la maladie, ce qui souligne la nécessité d'une approche plus rigoureuse dans la gestion de l'immunisation de volailles.

Les résultats obtenus soulignent l'importance d'élargir les investigations sérologiques et de mettre en œuvre des analyses moléculaires pour une différenciation précise entre les souches vaccinales et sauvages, contribuant ainsi à une meilleure compréhension et un meilleur contrôle de la maladie dans les élevages de poulets de chair.

La présente étude fournit une image claire de la prévalence du virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) dans l'industrie avicole du sud-ouest de la Roumanie, en utilisant des méthodes sérologiques et moléculaires pour une évaluation complexe de la situation épidémiologique.

L'analyse RT-PCR a révélé la présence à la fois de souches vaccinales (793B – 4/91, CR88, 1/96, IBIRD et MASS) et de souches sauvages (D274, Variant 2, Arkansas et Qx), soulignant la diversité génétique du virus et la nécessité de leur différenciation précise afin d'optimiser les stratégies de contrôle.

Les résultats obtenus démontrent l'importance d'une surveillance continue de l'IBV, compte tenu de l'émergence de nouveaux variants et de la dynamique changeante de la prévalence du virus, ce qui nécessite une attention accrue à l'évolution épidémiologique.

Compte tenu de la pathogénicité des sérotypes émergents de l'IBV, les informations épidémiologiques fournies par cette étude sont essentielles pour ajuster et améliorer les stratégies de vaccination dans les élevages de poulets de chair, contribuant ainsi à réduire l'impact économique et sanitaire de la maladie.

L'étude souligne la nécessité de mesures de contrôle rapides et efficaces, basées sur des données sérologiques et moléculaires, pour protéger les troupeaux de poulets de chair et prévenir la propagation de souches virales sauvages dans les élevages de volailles.

L'étude met en évidence la présence des espèces *Eimeria acervulina* et *Eimeria tenella* dans les élevages intensifs de poulets de chair de l'ouest de la Roumanie, soulignant leur impact sur la santé et la productivité du troupeau.

Le diagnostic correct des infestations par *Eimeria* spp. nécessite une approche complexe, basée sur la corrélation des données cliniques, nécropsiques, morphométriques et du temps moyen de sporulation, la confirmation finale étant obtenue par des techniques moléculaires, telles que la PCR.

Les infections mixtes avec plusieurs espèces d'*Eimeria* compliquent considérablement le tableau clinique et morphologique, ce qui nécessite l'utilisation de méthodes de diagnostic avancées pour l'identification précise des agents pathogènes impliqués.

L'étude souligne la nécessité de mettre en œuvre des programmes de surveillance et de diagnostic améliorés dans le secteur avicole pour faciliter l'identification précoce et le contrôle efficace des infestations d'*Eimeria* spp.

Les résultats obtenus soulignent l'importance d'adopter des mesures de biosécurité et des stratégies thérapeutiques et prophylactiques appropriées, visant à réduire l'impact économique et sanitaire de la coccidiose dans les élevages avicoles.

Les résultats de l'étude indiquent que l'élimination des oocystes était significativement plus élevée dans le groupe infesté et non traité que dans les groupes traités, soulignant l'efficacité des traitements utilisés. Le groupe traité par ZAC3 a initialement montré une élimination massive des éléments parasitaires, ce qui suggère une possible réponse initiale au traitement.

Comparé entre les lots traités, Monensin a démontré une efficacité modérée dans la réduction de l'excrétion des oocystes, étant plus efficace que ZAC3, mais inférieur à TAC3, ce qui met en évidence les variations d'efficacité entre les produits testés.

La consommation d'aliments pour animaux était la plus élevée dans les lots non infestés, tandis que les lots infestés nourris avec des additifs alimentaires présentaient une consommation intermédiaire. La

consommation la plus faible a été enregistrée dans le lot infesté et non traité, reflétant l'impact négatif de l'infestation sur l'appétit et la santé générale des volailles.

Le gain quotidien moyen le plus élevé a été observé chez les poulets de chair infestés et nourris avec ZAC3 et TAC3, démontrant l'effet bénéfique de ces traitements sur la croissance en conditions d'infestation. Le gain quotidien moyen le plus faible a été enregistré dans le groupe infesté et non traité, soulignant l'impact négatif de l'infection non traitée sur les performances de croissance.

L'évolution du poids corporel a été la plus faible dans le groupe infesté et non traité, tandis que le groupe traité avec Monensin a enregistré le gain de poids le plus élevé, suivi des groupes nourris avec ZAC3 et TAC3, ce qui suggère une efficacité variable des différents traitements utilisés.

Les différences insignifiantes de poids entre le groupe non infesté et les groupes infestés nourris avec ZAC3 et TAC3 indiquent que ces traitements ont eu un effet positif sur le poids corporel, contribuant à réduire l'impact de l'infestation sur les performances de croissance.

IV. ÉLÉMENTS D'ORIGINALITÉ

Cette thèse se distingue par une approche intégrative, combinant des méthodes sérologiques, moléculaires et expérimentales pour l'évaluation de l'état sanitaire vétérinaire des élevages de poulets de chair du sud-ouest de la Roumanie. En mettant en évidence simultanément la circulation des souches vaccinales et sauvages du virus de l'IBV, ainsi qu'en comparant l'efficacité des traitements anticoccidiens, cette recherche apporte des contributions originales à la connaissance de l'épidémiologie de ces maladies. L'absence d'études similaires antérieures dans la région confère à cette recherche un caractère pionnier, et les résultats obtenus peuvent contribuer significativement à l'optimisation des stratégies de vaccination et de contrôle dans le secteur avicole roumain.

Le facteur de nouveauté

- ✓ Une nouvelle étude régionale sur le virus de la bronchite infectieuse aviaire (VBI) – L'évaluation sérologique et moléculaire du virus de la bronchite infectieuse aviaire (VBI) dans les élevages de poulets de chair du sud-ouest de la Roumanie fournit de nouvelles données épidémiologiques pour cette région, jusqu'alors insuffisamment documentées. Cette innovation réside dans l'identification simultanée des souches vaccinales et sauvages (par RT-PCR) et leur corrélation avec les paramètres sérologiques et les indices de vaccination dans des élevages commerciaux réels.
- ✓ Détection de la diversité génétique virale sur le terrain - L'étude apporte de nouvelles données sur la circulation simultanée de plusieurs génotypes viraux (dont D274, Variant 2, Arkansas, Qx), soulignant la complexité écologique actuelle du virus en Roumanie.
- ✓ Intégration des méthodes sérologiques et moléculaires - L'utilisation simultanée d'ELISA et de RT-PCR pour le diagnostic et la différenciation entre les souches vaccinales et sauvages représente une approche multimodale complexe, rarement appliquée dans les études régionales de ce type.
- ✓ Evaluation comparative de l'efficacité des traitements anticoccidiens - La comparaison de l'efficacité des produits ZAC3, TAC3 et Monensin dans des conditions expérimentales d'infection par *Eimeria* spp., corrélées à des données cliniques, parasitologiques et zootechniques (poids, gain quotidien moyen, consommation alimentaire), représente une expérience complexe, d'une grande pertinence pratique.
- ✓ Approche intégrée de la coccidiose aviaire dans les élevages commerciaux - La combinaison de l'évaluation des infections naturelles à *Eimeria* et des infections expérimentales contrôlées, ainsi

que des méthodes morphométriques, cliniques, PCR et de performance de croissance, est une approche méthodologique avancée rarement rencontrée dans la littérature locale.

Degré d'originalité

- ✓ Originalité dans la conception de l'étude - La structure de la recherche, qui intègre les aspects épidémiologiques, immunologiques, génétiques, thérapeutiques et zootechniques, dénote une vision systémique et originale sur la problématique des maladies infectieuses et parasitaires en élevage avicole.
- ✓ Analyse critique des schémas de vaccination - L'étude apporte une contribution originale en identifiant l'inefficacité de la vaccination actuelle et propose une réévaluation des stratégies d'immunisation, basée sur des données concrètes du terrain.
- ✓ Utilisation comparée de produits anticoccidiens moins étudiés (ZAC3 et TAC3) - L'originalité consiste à tester des solutions alternatives aux traitements classiques, avec des implications directes en pratique vétérinaire et dans l'optimisation de la gestion sanitaire des élevages.
- ✓ Contexte national sous-documenté - Le manque de données précédemment publiées sur la prévalence et la typologie des infections à IBV et à *Eimeria* dans les zones ciblées confère à l'étude un caractère original et pionnier au niveau local et régional.