

INSTITUTUL DE CERCETARE - DEZVOLTARE
PENTRU CREȘTEREA BOVINELOR BALOTEȘTI
Șos. București-Ploiești, km 21, ILFOV, 077015, BALOTEȘTI
Tel : 021 / 350 10 26; Fax: 021 / 350 10 30; E-mail:
secretariat@icdcb.ro

Nr.inreg.2556/15.12.2014

FUNDAȚIA
"PATRIMONIUL ASAS"
Data înregistrării / iesire 46/15.01.2015

SINTEZA
rezultatelor înregistrate la

Proiectul 167/2014 „ Monitorizarea apariției bolilor ereditare la bovine prin mijloace de investigație citogenetică în scopul asigurării sănătății genetice a efectivelor”

Director proiect: dr. ing. Ioana Nicolae

Faza I/2014, perioada: 15.09.2014 - 15.12.2014

Obiectivul fazei: Studii privind profilaxia bolilor ereditare la bovine prin mijloace de investigație citogenetică

Activități realizate:

Activitatea 1.1 Documentarea și elaborarea unui studiu privind profilaxia bolilor ereditare la bovine prin mijloace de investigație citogenetică.

Activitatea 1.2 Pregătirea cadrului experimental de lucru în vederea efectuării investigațiilor citogenetice la efective de taurine aparținând celor mai importante rase crescute în România

Principalele rezultate obținute în urma derulării activităților specifice etapei I/2014:

Activitatea 1.1 Documentarea și elaborarea unui studiu privind profilaxia bolilor ereditare la bovine prin mijloace de investigație citogenetică.

Dată fiind importanța patologiei cromozomale în creșterea animalelor, se impune cu necesitate identificarea purtătorilor de alterări ale materialului genetic și recomandarea măsurilor adecvate pentru a împiedica diseminarea lor în populațiile de descendenți. Acesta este, de fapt, obiectivul *profilaxiei genetice* care nu vizează tratamentul bolilor genetice ci preîntâmpinarea lor. Sub aspect profilactic ne interesează natura aberațiilor cromozomale implicate în determinarea unei stări patologice (tulburări de dezvoltare, mortalitatea embrionară, dezvoltarea sexuală anormală, diferite grade de infertilitate sau chiar sterilitate), modul de transmitere și măsurile de eradicare.

În ciuda marii lor diversități, configurațiile cromozomale anormale se pot clasifica în două mari categorii: *Anomaliile cromozomale numerice (heteroploidii) și Anomaliile cromozomale de structură.*

Cariotipul normal la taurine

Primul număr corect al cromozomilor la specia *Bos taurus L.* ($2n=60$) a fost comunicat de Krallinger în 1927. Makino (1944) a identificat, însă, pentru prima oară cromozomul sexual Y și a stabilit determinismul sexual corect la această specie. Numeroase cercetări ulterioare au confirmat următoarea configurație cromozomală :

$$2n = 58 A + XY \text{ pentru mascul;}$$

$$2n = 58 A + XX \text{ pentru femelă.}$$

Cei 58 de *autosomi*, dispuși în cariotip în ordinea descrescătoare a mărimii lor, sunt de tip *acrocentric* iar *heterosomiile* sunt de tip *submetacentric*. Datorită morfologiei lor, cromozomii sexului sunt ușor de identificat. Cromozomul X este similar ca lungime cu autosomiile din perechea 1 și reprezintă aproximativ 5% din complementul haploid. Cromozomul Y este unul din cei mai mici cromozomi, cu o lungime relativă apropiată de cele mai mici perechi autosomale.

Cariotipul anormal la taurine

Dintre speciile de fermă, cel mai mult studiate din punct de vedere citogenetic au fost și rămân taurinele. Chiar dacă numărul animalelor investigate variază considerabil de la o rasă la alta și de la o regiune geografică la alta, numărul total depășește cu mult ultimele referiri bibliografice în legătură cu acest subiect (Popescu, 1990), potrivit cărora au fost examinate peste 25000 de animale din peste 80 de rase diferite de pe întreg globul. Evident, la așa un număr mare de animale controlate citogenetic și cazuistica este pe măsură.

Dintre anomaliile cromozomale, cea mai frecvent întâlnită la taurine este **translocția prin fuziune centrică sau Robertsoniană**. Au fost raportate 42 de tipuri diferite (tab.3), din care majoritatea detectate prin metode de bandare. Interesant este că, din cele 29 de perechi de autosomi ai speciei taurine, numai perechea 17 nu a

fost implicată în translocația de tip Robertsonian. Cea mai importantă dintre toate este, indiscutabil, translocația 1/29, devenită emblematică pentru specia taurine.

O altă anomalie cromozomală frecvent întâlnită este **freemartinismul**. În 90% din cazurile de fătări gemelare heterosexuale rezultă femele cu chimerism leucocitar XX/XY. Este vorba de *sindromul freemartin*, ceea ce înseamnă o gravă afectare a tractusului genital, în sensul masculinizării lui și, implicit, sterilitatea definitivă a femelei.

La bovine, alte anomalii autozomale de structură se referă la translocațiile reciproce sau în tandem și inversiile pericentrice, totdeauna asociate cu o reducere a fertilității.

Translocația reciprocă este destul de rar întâlnită la taurine. Au fost identificate doar câteva cazuri: t rcp 10/14 și 8/15 la rasa Fleckvieh (Mayr și col.,1979;1983); t rcp 2/20 și 8/27 la rasa Friză (de Schepper și col.,1982); t rcp (1/5) la rasa Grey Alpine (Iannuzzi și col.,2001).

Translocația în tandem a fost observată prima dată la vitele de rasă Roșie daneză (Hansen,1969,1970). Al doilea caz, translocația în tandem 4/21 a fost semnalată în Brazilia de Pinheiro și col. (1995) la o junincă de rasă Holstein, rezultată dintr-o fătare gemelară heterosexuale. Al treilea caz, a fost identificat la o vacă de rasă Bălțată cu negru românească (Nicolae și Livescu,1995).

Inversia pericentrică la autosomi a fost foarte rar descrisă la taurine. La un taur Normandy, normal fenotipic, examinat din cauza fertilității lui reduse, a fost identificată o inversie pericentrică într-unul din autosomii de mărime medie (Short și col.,1968). De asemenea, Popescu (1976) a identificat o inversie pericentrică pe cromozomul 14 la o femelă cu fertilitate scăzută.

Anomalii de structură ale cromozomilor sexuali întâlnite la taurine: **Translocația X/autosom, Deleția X, Translocația Y/autosom. Inversia pericentrică.**

Anomalii cromozomale numerice. Datorită naturii lor, heteroploidiiile sunt foarte rar întâlnite după naștere, fiind eliminate în timpul vieții embrionare. La taurine, euploid-heteroploidiiile pure nu au fost observate. Doar sub formă de mozaic $2n/4n$, $2n/6n$ au fost detectate la vite cu hipertrofie musculară (Popescu, 1968) sau în linii selecționate pentru producția de carne (Zartman și Fechheimer,1967).

Având în vedere numărul mare de factori care pot provoca modificări în mediul intern, extern sau accidente în cursul diviziunii celulare, păstrarea homeostaziei cromozomale de la o generație la alta constituie un atribut fundamental al organismelor biologice. Modificări ale morfologiei sau numărului de cromozomi, în timpul mitozei sau meiozei, constituie stări anormale, cu consecințe inerente asupra exprimării normale a caracterelor.

Necesitatea aplicării măsurilor de profilaxie genetică la animale decurge, în primul rând, din faptul că unele boli pot atinge ușor frecvențe ridicate determinând, astfel, mari pierderi economice. Dar, chiar și atunci, când frecvența unor afecțiuni genetice este relativ scăzută, datorită numărului foarte mare al acestor entități morbide, ele au o pondere importantă în patologia animală, grevând asupra eficienței activității economice. Depistarea purtătorilor unor constituții cromozomale anormale și hotărârea măsurilor ce se impun, conduce la creșterea natalității, asigurarea unui ritm normal al producțiilor zootehnice, reducerea tratamentelor și intervențiilor sanitar-veterinare.

Din aceste considerente, investigația citogenetică este un instrument de diagnostic și apreciere a capacității reproductive a animalelor de fermă, demn de luat în seamă. Controlul citogenetic sistematic este în măsură să scoată la lumină o serie de defecte ereditare sau neereditare care, odată cunoscute și eliminate, contribuie la îmbunătățirea eficienței reproductive în populația analizată.

Activitatea 1.2 Pregătirea cadrului experimental de lucru în vederea efectuării investigațiilor citogenetice la efective de taurine aparținând celor mai importante rase crescute în România

Cadrul experimental de lucru al proiectului are următoarele coordonate tehnice:

1. Stabilirea fermelor de unde se va alege efectivul de taurine ce va fi investigat;
2. Identificarea materialului biologic din rasele de taurine luate în studiu și completarea datelor de origine necesare pentru buletinele de analiza citogenetică ce vor fi eliberate pentru fiecare individ în parte;
3. Stabilirea tehnicilor de lucru și identificarea de noi mijloace și metode moderne, dezvoltarea și implementarea acestora în expertiza analizei citogenet

Toate activitățile din această etapă au fost realizate în conformitate cu planul de realizare al proiectului.

DIRECTOR ICDCB BALOTESTI,

Dr.ing. Igana NICOLAE

DIRECTOR DE PROIECT,

Dr.ing. Igana NICOLAE



INSTITUTUL DE CERCETARE DEZVOLTARE
PENTRU CREȘTEREA BOVINELOR BALOTEȘTI
Șos. București-Ploiești, km 21, ILFOV, 077015, BALOTEȘTI
Tel : 350.10.26 Fax: 350.10.30 E-mail: secretariat@icdcb.ro

Nr.2467/31.08.2015

FUNDATIA
"PATRIMONIUL ASAS"
nr. intrare / iesire 472/1.08.2016

SINTEZA

rezultatelor înregistrate la Proiectul 167/2014 „Monitorizarea apariției bolilor ereditare la bovine prin mijloace de investigație citogenetică în scopul asigurării sănătății genetice a efectivelor”

Director proiect: dr.ing.Ioana NICOLAE

Faza II/2015, perioada: 15.12.2014 - 31.08.2015

Obiectivul fazei: Efectuarea investigației citogenetice la taurine de rasă Bălțată cu Negru Românească (BNR) și stabilirea măsurilor adecvate de profilaxie a bolilor ereditare identificate.

Activități realizate:

Activitatea 2.1: Identificarea loturilor de taurine din rasa Bălțată cu Negru Românească ce vor fi investigate citogenetic și completarea datelor de origine. Recoltarea probelor de sânge, montarea culturilor de leucocite, prelucrarea acestora și examinarea preparatelor mitotice

Activitatea 2.2: Utilizarea tehnicilor de marcaj cromozomal pentru aprofundarea cercetărilor și stabilirea diagnosticului citogenetic pentru fiecare individ din efectivul luat în studiu. Întocmirea buletinului de analiză citogenetică și recomandarea măsurilor de profilaxie genetică adecvate.

Activitatea 2.3: Perfecționare resurse umane implicate în proiect; participare la simpozioane interne și internaționale; parteneriat internațional.

Principalele rezultate obținute în urma derulării activităților specifice etapei II/2015:

Activitatea 2.1: Identificarea loturilor de taurine din rasa Bălțată cu Negru Românească ce vor fi investigate citogenetic și completarea datelor de origine. Recoltarea probelor de sânge, montarea culturilor de leucocite, prelucrarea acestora și examinarea preparatelor mitotice

În această etapă, studiul nostru s-a concentrat pe efectuarea controlului de cariotip și stabilirea diagnosticului citogenetic la taurine de rasă Bălțată cu Negru Românească (BNR). Astfel, au fost examinate 30 de femele de reproducție, de rasă Bălțată cu Negru Românească, din ferma I.C.D.C.B. Balotești și 20 femele de rasă BNR, aparținând fermei S.C.D.A. Brăila.

După identificarea animalelor și completarea datelor de origine, au fost recoltate aseptice probele de sânge și au fost montate culturile de leucocite în primele 24 de ore de la recoltare în Laboratorul de Citogenetică Animală al I.C.D.C.B. Balotești.

Pentru fiecare individ investigat s-au montat trei tipuri de culturi: culturi normale, necesare pentru examinarea în lumină directă și tratamente de bandare CBA, culturi cu adaos de BrdU și Hoechst necesare tratamentelor de bandare RBA și culturi cu adaos de BrdU necesare tratamentelor de bandare SCEs, pe baza protocoalelor specifice. S-au realizat câte 10 preparate mitotice/individ. În funcție de destinația preparatelor, acestea au fost colorate convențional (cu soluție Acridine Orange sau Giemsa) sau diferențial pentru marcajul cromozomal.

Preparatele cromozomale obținute din cele trei culturi au fost examinate la microscopul Nikon Optiphot-2, dotat cu cameră video. Imaginile microscopice au fost achiziționate și prelucrate cu un program specific de analiză a imaginii.

Au fost examinate și achiziționate între 30 și 50 de metafaze pe preparat și s-a stabilit diagnosticul citogenetic.

Activitatea 2.2: Utilizarea tehnicilor de marcaj cromozomal pentru aprofundarea cercetărilor și stabilirea diagnosticului citogenetic pentru fiecare individ din efectivul luat în studiu. Întocmirea buletinului de analiză citogenetică și recomandarea măsurilor de profilaxie genetică adecvate.

Investigația citogenetică a unui efectiv de 50 femele taurine s-a realizat prin studiul preparatelor cromozomale în contrast de fază, în lumină directă și fluorescență. Prin aplicarea tratamentelor de bandare SCEs, pe baza protocolului specific, au fost analizate preparatele obținute din culturi tratate cu BrdU. S-au evidențiat atât configurații cromozomale normale dar și prezența anomaliilor cromozomale structurale de tipul rupturilor cromozomale (breaks, gaps, fragmente, etc.), precum și numărul schimburilor intercromatidice (SCEs) în celule, în funcție de efectul factorilor modificali asupra integrității complementului cromozomal.

Rezultatele investigației citogenetice au fost următoarele:

În efectivul de 30 de femele de rasă Bălțată cu Negru Românească aparținând fermei I.C.D.C.B. Balotești, 27 de femele au fost diagnosticate cu cariotip normal (CN) $2n=60,XX$ iar 3 femele (cod 4950, cod 4201, cod 1184) au evidențiat configurații cromozomale anormale, diagnosticul citogenetic fiind instabilitate cariotipică. Atât în cazul configurațiilor normale cât și a celor anormale s-au eliberat buletinele de analiză citogenetică

Din investigația citogenetică a lotului de 20 femele de reproducție de rasă Bălțată cu Negru Românească aparținând fermei S.C.D.A.Braila 19 femele au prezentat cariotip normal, $2n=60,XX$ iar o femelă a prezentat instabilitate cariotipică. Pentru fiecare dintre ele au fost completate buletinele de analiza citogenetică.

Analizând situația de reproducție a femelelor cu instabilitate cariotipică s-a constatat că acestea au înregistrat tulburări de reproducție caracterizate prin monte repetate și lipsa gestațiilor.

În urma analizei preparatelor cromozomale supuse testului SCEs s-a observat, atât la cele 3 femele de la ICDCB cât și la femela de la SCDB prezența unui număr foarte mare de schimburi intercromatidice/celulă (11-15 SCEs/celulă), comparativ cu cel observat (6-7 SCEs/celulă) în situații normale. Având în vedere aceste rezultate, fragilitatea cromozomală identificată la taurinele anormale, caracterizată de o rată crescută a SCEs/celulă ar putea fi legată de prezența agenților toxici în mediul înconjurător.

În toate cele 4 cazuri, se poate spune că există o corelație între tulburările de reproducție și prezența complementului cromozomal anormal.

Activitatea 2.3. Perfecționare resurse umane implicate în proiect; participare la simpozioane interne și internaționale; parteneriat internațional.

În această etapă am participat la a 10-a Conferință Europeană de Citogenetică (10th European Cytogenetics Conference) ce a avut loc la Strasbourg, Franța, în perioada 4-7 iulie 2015. Cu această ocazie a fost prezentată lucrarea "The monitoring of the environmental pollution in Romanian bovine farms by cytogenetic investigations", care a fost inclusă în programul conferinței la secțiunea *Animal and Plant Cytogenetics*. Lucrarea a fost publicată în revista „Chromosome Research”, jurnal consacrat, de largă circulație internațională și cotație ISI.

Concluzii: Obiectivul propus a fost atins în totalitate, iar activitățile asumate pentru această etapă au fost efectuate conform planului de realizare prevăzut în contractul de finanțare. Din analiza efectuată rezultă că 10% din efectivul de rasă BNR de la ICDCB Balotești și 5% din efectivul de rasă BNR de la SCDA Brăila a fost diagnosticat cu instabilitate cariotipică. Atât în cazul configurațiilor normale cât și a celor anormale s-au eliberat buletinele de analiză citogenetică.

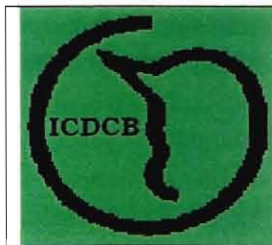
DIRECTOR GENERAL,

Dr.ing. Ioana NICOLAE



DIRECTOR DE PROIECT,

Dr.ing. Ioana NICOLAE



INSTITUTUL DE CERCETARE DEZVOLTARE
PENTRU CREȘTEREA BOVINELOR BALOTESTI
Șos. București-Ploiești, km 21, ILFOV, 077015, BALOTEȘTI
Tel : 350.10.26 Fax: 350.10.30 E-mail: secretariat@icdcb.ro

Nr.3400/27.11.2015

FUNDAȚIA
"PATRIMONIUL ASAS"

Nr. intrare / ieșire 473/10.8.2016

SINTEZA

rezultatelor înregistrate la Proiectul 167/2014 „Monitorizarea apariției bolilor ereditare la bovine prin mijloace de investigație citogenetică în scopul asigurării sănătății genetice a efectivelor”

Director proiect: dr.ing.Ioana NICOLAE

Faza III/2015, perioada: 01.09.2015 - 30.11.2015

Obiectivul fazei: Efectuarea investigației citogenetice la bubaline și stabilirea măsurilor adecvate de profilaxie a bolilor ereditare identificate.

Activități realizate:

Activitatea 3.1 : Identificarea loturilor de bubaline ce vor fi investigate citogenetic și completarea datelor de origine. Recoltarea probelor de sânge, montarea culturilor de leucocite și prelucrarea acestora, examinarea preparatelor mitotice.

Activitatea 3.2: Utilizarea tehnicilor de marcaj cromozomal pentru aprofundarea cercetărilor și stabilirea diagnosticului citogenetic pentru fiecare individ din efectivul luat în studiu. Întocmirea buletinului de analiză citogenetică și recomandarea măsurilor de profilaxie genetică adecvate.

Activitatea 3.3: Perfecționare resurse umane implicate în proiect; participare la simpozioane interne și internaționale; parteneriat internațional.

Principalele rezultate obținute în urma derulării activităților specifice etapei III/2015:

Activitatea 3.1 : Identificarea loturilor de bubaline ce vor fi investigate citogenetic și completarea datelor de origine. Recoltarea probelor de sânge, montarea culturilor de leucocite și prelucrarea acestora, examinarea preparatelor mitotice.

În această etapă, cercetarea noastră a vizat efectuarea controlului de cariotip și stabilirea diagnosticului citogenetic la bubaline pe un eșantion de 31 femele de bivoli aparținând S.C.D.C.B. Sercaia. S-a urmărit nucleul de reproducție și, în special, femelele cu tulburări de reproducție pentru a vedea dacă este vorba de o etiologie cromozomală a tulburărilor semnalate.

Problema cunoașterii frecvenței anomaliilor cromozomale și a efectelor acestora este foarte bine motivată, mai ales în condițiile în care, și la bubaline s-a început, deja, și se dorește extinderea înșămânțărilor artificiale. Dacă luăm în considerare doar efectele anomaliilor cromozomale structurale care, potrivit datelor din literatura de specialitate, pot provoca o reducere a fertilității cu 5-10%, iar pentru creșterea fertilității cu 1% este nevoie de 10 ani de selecție, interesul pentru acest domeniu este justificat.

O rată mare a reproducției permite o mai mare intensitate a selecției, un interval mai scurt între generații și implicit un mai mare progres genetic.

Depistarea purtătorilor, normali fenotipic, ai unor constituții cromozomale anormale și hotărârea măsurilor ce se impun, conduce la creșterea natalității, asigurarea unui ritm normal al producțiilor zootehnice, reducerea tratamentelor și intervențiilor sanitar-veterinare.

Pornind de la aceste premise teoretice, după identificarea animalelor și completarea datelor de origine, au fost recoltate aseptice probele de sânge necesare pentru examenul de cariotip.

Pentru fiecare individ investigat s-au montat trei tipuri de culturi: culturi normale, necesare pentru examinarea în lumină directă și tratamente de bandare CBA, culturi cu adaos de BrdU și Hoechst necesare tratamentelor de bandare RBA și culturi cu adaos de BrdU necesare tratamentelor de bandare SCEs, pe baza

protocoalelor specifice. S-au realizat câte 10 preparate mitotice/individ. În funcție de destinația preparatelor, acestea au fost colorate convențional (cu soluție Acridine Orange sau Giemsa) sau diferențial pentru marcajul cromozomal.

Preparatele cromozomale obținute din cele trei culturi au fost observate la microscopul Nikon Optiphot-2, dotat cu cameră video color. Imaginile microscopice au fost achiziționate și prelucrate cu un program specific de analiză a imaginii.

Au fost examinate și achiziționate între 30 și 50 de metafaze pe preparat și s-a stabilit diagnosticul citogenetic.

Activitatea 3.2: Utilizarea tehnicilor de marcaj cromozomal pentru aprofundarea cercetărilor și stabilirea diagnosticului citogenetic pentru fiecare individ din efectivul luat în studiu. Întocmirea buletinelui de analiză citogenetică și recomandarea măsurilor de profilaxie genetică adecvate.

Investigația citogenetică a unui efectiv de 31 femele bubaline s-a realizat prin studiul preparatelor cromozomale în contrast de fază, în lumină directă și fluorescență. Prin aplicarea tratamentelor de bandare SCEs, pe baza protocolului specific, au fost analizate preparatele obținute din culturi tratate cu BrdU. S-au evidențiat atât configurații cromozomale normale dar și prezența anomaliilor cromozomale structurale de tipul rupturilor cromozomale (breaks, gaps, fragmente, etc.), precum și numărul schimburilor intercromatidice (SCEs) în celule, în funcție de efectul factorilor modificali asupra integrității complementului cromozomal. Stabilirea diagnosticului citogenetic s-a făcut în raport cu cariotipul și idiograma normală de specie.

În efectivul de 31 de femele de bivoli aparținând S.C.D.C.B. Șercaia, **26 de femele** au fost diagnosticate cu **cariotip normal** (CN=50,XX) iar **5 femele** (matricol RO082000080002, matricol RO085000091963, matricol RO086000140001, matricol RO089000140141, matricol RO088001047062) au evidențiat configurații cromozomale anormale, diagnosticul citogenetic fiind **instabilitate cariotipică**.

Din dorința de a elucidă cauzele apariției constituțiilor cromozomale anormale am efectuat o anchetă, urmărind istoricul activității de reproducție al fiecăreia dintre cele 5 femele cu instabilitate cromozomală. Aceste femele au înregistrat tulburări ale activității de reproducție caracterizate prin multe monte repetate (MR). Este cât se poate de elocvent că există o relație de cauzalitate între instabilitatea cariotipică identificată la cele 5 femele și tulburările de reproducție înregistrate.

În acest moment însă, întrucât prezența, localizarea și frecvența rupturilor cromatidice este un test al instabilității cromozomale, care **limitează activitatea de reproducție** se recomandă continuarea investigației pe următoarele coordonate:

- controlul clinic la nivelul tractusului genital;
- ancheta genetică în cadrul familiei;
- o analiză chimică riguroasă a solului a furajelor și apei utilizate în hrana animalelor pentru a vedea care sunt agenții toxici implicați în inducerea instabilității cromozomale identificate.

CONCLUZII

1. Investigația citogenetică a lotului de 31 de femele de bivoli aparținând S.C.D.C.B. Șercaia, a evidențiat un procent de 16 % instabilitate cariotipică în efectivul studiat.

2. Toate acestea demonstrează încă o dată rolul etiologic al bolilor cromozomale în exprimarea caracterelor de reproducție și evidențiază că singura posibilitate de intervenție a citogeneticii în menținerea sănătății genetice a efectivelor este aceea de a identifica genotipurile anormale și de a le elimina din populație, înlăturând astfel riscul de diseminare în descendență.

3. Pentru fiecare dintre femelele examinate citogenetic în această etapă s-au eliberat **buletinele de testare citogenetică** (anexate). Acestea au fost trimise beneficiarului - S.C.D.C.B. Șercaia care, pe baza diagnosticului stabilit va lua măsurile ce se impun.

DIRECTOR GENERAL,
Dr.ing. Ioana NICOLAE



DIRECTOR DE PROIECT,
Dr.ing. Ioana NICOLAE