

REZUMAT

**AL TEZEI DE DOCTORAT “STUDII ANATOMOCLINICE ȘI DE
LABORATOR ÎN FOCARELE DE BLUETONGUE DIN ROMÂNIA”**

DOCTORAND: DR. MIHAIL CLAUDIU DIACONU

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC: PROF. UNIV. DR. GABRIEL PREDOI

Cuvinte cheie: Bluetongue, serotip 4, România

În domeniul medicinei umane și veterinare, aplicarea metodelor de profilaxie și combatere pe plan mondial a permis obținerea unor succese importante în lupta contra bolilor infecțioase contagioase – eradicarea variolei umane în 1979, ultimul caz de pestă bovină în 2008 și declararea eradicării bolii în 2011, precum și campaniile de eradicare a poliomielitei și rujelei prin programe de imunizare în masă. În schimb, evoluția arbovirusurilor a manifestat tendințe opuse, multe arbovirusuri înregistrând emergența din rezervoarele silvatici “tradiționale” și răspândirea globală, datorită unor factori evolutivi de tip antropic – creșterea animalelor, comerțul, modificarea habitatelor umane.

O boală a rumegătoarelor denumită “boala limbii albastre” și transmisă de insecte din genul *Culicoides* era menționată până în anul 1940 doar în Africa de Sud dar ulterior s-a extins accentuat, astfel încât după numai 66 de ani a ajuns până la latitudinea nordică de 53⁰, în condiții climatice care nu permiteau supraviețuirea de la un sezon la altul a insectelor vectoare.

Bluetongue este produsă de virusuri încadrate în genul *Orbivirus*, familia *Reoviridae* și afectează rumegătoarele domestice și sălbatice, cu manifestări clinice și lezionale determinate de leziunile vasculare produse de către virus - infarctizarea țesuturilor, hemoragii, edem și șoc hipovolemic. Teza de doctorat intitulată “Studii anatomoclinice și de laborator în focarele de bluetongue din România”, este structurată conform cerințelor în două părți, studiu bibliografic și respectiv, cercetări personale.

Partea I “Studiu bibliografic” cuprinde 4 capitole, în care sunt prezentate principalele aspecte bibliografice despre bluetongue, referitoare la etiologie, caractere epidemiologice, simptomatologie și tablou lezional. Sunt precizate date despre diagnosticul diferențial ce trebuie realizat în boli și afecțiuni cu manifestări clinice similare sau apropiate, iar în capitolul 3 sunt prezentate tehnicile de diagnostic, cu accent pe metodele moderne de laborator, utilizate în cadrul controlului oficial. Ultimul capitol al primei părți prezintă succint, câteva informații privind profilaxia și combaterea bluetongue.

Capitolul 1 “Cadrul general”, prezintă datele cunoscute până în prezent despre bluetongue. Sunt amintite câteva date cu caracter istoric, precum distribuția bluetongue pe mapamond, alături de implicarea în patologia umană și veterinară a virusurilor din genul *Orbivirus*. Este prezentată structura și compoziția virusurilor bluetongue, cu rolul componentelor virale în ciclul de replicare celulară al virusului.

Având în vedere caracterul necontagios al bolii, este descrisă importanța insectelor vectoare prin prezentarea succintă a unor date despre biologia culicoizilor și despre modul în care aspectele lor comportamentale influențează epidemiologia bolii alături de factorii geoclimatici.

Sunt enumerate aspectele patogenetice ale replicării virusurilor bluetongue în organismul rumegătoarelor susceptibile, arătând modul de exprimare a tabloului simptomatic și implicit, a aspectele generale și particulare ale tabloului lezional, în funcție de specia receptivă.

Răpsunsul imun consecutiv infecției cu virusuri bluetongue este influențat de către determinanții antigenici ai capsidului, proteine care sunt utilizate și în structura testelor pentru diagnosticul serologic al bolii. Exprimarea clinică a bolii este foarte variabilă la animalele receptive, fiind influențată de factori legați de tulpina de virus, dar mai ales de factorii gazdei – specie și rasă. Virusurile bluetongue trec relativ ușor barierele de specie, dovadă fiind semnalările bolii de la carnivore.

În prezentarea simptomelor și a leziunilor, au fost utilizate datele bibliografice cu referire la speciile de rumegătoare domestice susceptibile (bovine, ovine, caprine) și la speciile de rumegătoare sălbatice. Aceste date din literatura de specialitate se referă la evoluțiile predominant asimptomatice ale bolii la specia bovină și caprină, alături de o evoluție clinic manifestă, cu mortalitate la specia ovină. Mult mai puține date bibliografice există despre boala la rumegătoarele sălbatice, însă exceptând cazuri izolate, evoluția este considerată în general inaparentă clinic.

Aspectele diagnosticului clinic diferențial în special în cazul bolilor majore exotice, sunt importante pentru că reacția tuturor actorilor implicați în fața unei posibile amenințări a unei boli emergente trebuie să fie promptă și eficientă.

Capitolul 2 “Diagnosticul diferențial în bluetongue” prezintă o serie de aspecte de natură clinică și epidemiologică de diferențiere între bluetongue și alte boli virale majore sau alte afecțiuni de natură primară.

Diagnosticul de laborator rămâne demersul major pentru identificarea circulației de virus în populațiile de insecte vectoare și a cazurilor de infecție cu bluetongue la animale.

Diagnosticul în bluetongue are două scopuri principale: identificarea agentului cauzal, prin detecția de antigen sau genom viral sau izolarea de virus, precum și detecția de anticorpi, ca rezultat al conflictului dintre agentul cauzal al bolii și reactivitatea organismului gazdă.

Capitolul 3 “Tehnici de diagnostic în bluetongue” prezintă tehnicile și metodele disponibile cadrul laboratorului, toate prevăzute de Manualul de standarde al OMSA pentru teste de diagnostic și vaccinuri, metode care au fost aplicate în conformitate cu un sistem de management al calității implementat conform SR EN ISO 17025/2005.

Capitolul 4 “Profilaxia și combaterea bolii” tratează aceste demersuri specifice pentru o boală cu transmitere vectorială, măsuri prevăzute de legislația comunitară. Monitorizarea entomologică poate oferi date valoroase pentru determinarea genului și speciilor de insecte și identificarea vectorilor competenți în diseminarea virusurilor bluetongue, iar profilaxia specifică poate proteja efectivele de animale de infecție.

Partea a II-a “Cercetări personale”, cuprinde 3 mari capitole, fiecare cu mai multe subcapitole, respectiv scopul lucrării, un capitol dedicat materialelor și metodelor utilizate pe durata cercetărilor, apoi sunt prezentate rezultatele interpretate ale investigațiilor, precum și partea finală a concluziilor și câteva recomandări.

Scopul lucrării este acela de a identifica trăsăturile generale și specifice ale manifestării bluetongue, boală emergentă în prima sa evoluție pe teritoriul României.

S-au urmărit manifestările clinice ale bolii la diversele specii de rumegătoare receptive, marea majoritate a acestora fiind întreținute în exploatații non-profesionale și în sistem extensiv.

Au fost evaluate leziunile produse de virusul bluetongue serotip 4, realizându-se corelații cu susceptibilitatea la boală a fiecărei specii de animale gazdă și urmărindu-se modul în care tropismul celular al virusului influențează tabloul morfopatologic global.

A fost considerat diagnosticul bolii, atât cu metode virusologice clasice cât și cu instrumentele moderne ale detecției de genom viral, în condițiile în care exigențele actuale ale controlului oficial impun acreditarea în conformitate cu standardele internaționale în vigoare.

A fost studiat comportamentul virusului bluetongue serotip 4 în cursul replicării pe linii celulare permissive, urmărindu-se aspectele specifice ale efectului citopatic rezultat, iar prin electronmicroscopie au fost studiate aspectele ultrastructurale ale virionilor, evaluându-se modul în care această tehnică poate fi utilizată în diagnosticul primar al bolilor emergente.

Capitolul 5 “Material și metode” prezintă tipurile de probe / matrice de încercare luate în lucru precum și metodele de investigare anatomoclinică și de laborator a cazurilor de bluetongue.

Investigațiile au fost realizate în cadrul Laboratorului Național de Referință pentru Arboviroze din Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală București, precum și în cadrul laboratoarelor sanitare veterinare și pentru siguranța alimentelor județene, în conformitate cu capacitatea pentru metodele de diagnostic și cu reglementările în vigoare referitoare la desemnările în cadrul controlului oficial.

Au fost efectuate investigații și evaluări la un număr de 242 cadavre provenite de la diferite specii de rumegătoare susceptibile, 2125 seturi de organe, 3033 probe de sânge recoltate pe anticoagulant și 54056 probe de ser sanguin.

Animalele infectate cu serotipul 4 de virus bluetongue au fost supuse examenelor clinice, urmărindu-se simptomele manifestate de către fiecare specie de animal receptiv, iar examenele necropsice și evaluarea seturilor de organe au permis evidențierea leziunilor și observarea corelațiilor acestor leziuni morfopatologice cu tabloul simptomatic.

În cadrul laboratorului au fost aplicate metodele pentru diagnosticul și supravegherea bluetongue determinată de serotipul 4 de virus. Au fost utilizate în primul rând metodele prevăzute în cadrul Manualului OMSA pentru diagnosticul bolii, respectiv metode pentru detecția de genom viral atât pentru serogrup cât și pentru serotipul 4, precum și metodele pentru detecția de anticorpi – teste imunoenzimatic ELISA și teste de virusneutralizare. De asemenea, au fost utilizate teste ale virusologiei clasice – izolarea de virus, dar și investigații electronmicroscopice.

Au fost aplicate o serie de metode de colorare specifice histopatologiei (HE, HEA, Martius Scarlet Blue, Gömori, Pappenheim) pe secțiuni de țesuturi / organe prelevate de la cazurile de boală, supuse tehnicii de microtomie și de includere în parafină.

În **capitolul 6 “Rezultate și discuții”** sunt prezentate într-o manieră detaliată rezultatele investigațiilor efectuate pe probele luate în studiu.

Examenele și evaluările clinice au permis evidențierea diverselor categorii de simptome clinice și a ponderii acestora din totalul cazurilor luate în considerare.

Interpretarea globală a acestor date au confirmat o evoluție tipică a bolii produse de serotipul 4 de virus bluetongue la rumegătoarele mici (clinic manifestă la ovine și slab exprimată la caprine) dar atipică la bovine, cu semne clinice severe.

Dacă în literatura de specialitate, la rumegătoarele sălbatice, evoluția bolii este predominant asimptomatică iar evoluția la cervidee pare să confirme aceste date din literatură, la zimbri în schimb, s-a constatat o evoluție gravă, similară cu cea de la bovine.

În cazul examenelor anatomopatologice, s-a putut observa corelarea leziunilor cu gravitatea simptomelor clinice, tabloul lezional fiind marcat în ansamblu de rezultanta modificărilor vasculare induse de virus la nivelul întregului organism, pe de o parte datorită fenomenului patologic de afectare

a endoteliilor vaselor mici din țesuturi, cu apariția consecutivă a trombozelor vasculare și a infarctizărilor țesuturilor irigate și pe de altă parte, prin creșterea permeabilității vasculare, care generează producerea de edeme ale țesuturilor.

Deteția de anticorpi efectuată prin teste imunoenzimatic de screening, a permis identificarea animalelor trecute prin boală, în timp ce testele de virusneutralizare au confirmat originea de serotip a anticorpilor respectivi.

Izolarea agentului cauzal pe culturi celulare permissive pentru replicarea virală a evidențiat efectul citopatic specific virusurilor bluetongue și a permis confirmarea unui aspect descris relativ de curând în literatură, respectiv capacitatea virusurilor bluetongue de blocare a ciclului celular în mitoză și de inducere a unor mitoze aberante.

Prin colorații histopatologice clasice, au fost evidențiate sediile intracitoplasmice ale replicării virale – incluziile virale, iar electronmicroscopia prin transmisie a furnizat date de ultrastructură ce a permis identificarea de gen a agentului cauzal al bolii.

Astfel, metoda detecției de genom viral prin Real Time RT-PCR reprezintă testul de bază în identificarea infecției cu virus bluetongue, fiind aplicată atât pe probe de sânge cu EDTA de la animalele în viață, cât și pe probe din organe recoltate de la animalele moarte.

Corelarea acestor teste cu cele de serologie a permis determinarea clară a stadiului infecției la animalele în viață. Astfel, adevărata imagine a rezultatului replicării virusurilor în țesuturi și organe a fost evidențiată de tehnicile histopatologice clasice, fiind evidentă succesiunea efectelor patogenetice, pornind de la lezarea endoteliilor vaselor mici și ajungându-se la aspectul hemoragic de ansamblu ce caracterizează evoluția tipică de bluetongue la speciile receptive luate în studiu.

În **capitolul 7 “Concluzii și recomandări”** sunt prezentate 38 de concluzii extrase pe parcursul și în urma investigațiilor efectuate în efectivele de animale din România din perioada anilor 2014 – 2015 a bluetongue determinate de serotipul 4 de virus. Sunt precizate și un număr de 4 recomandări, care se referă nu numai la demersurile de supraveghere și diagnostic ale bluetongue, ci au în vedere orizonturi mai largi, precum creșterea capabilității de laborator pentru identificarea bolilor emergente, aplicarea unor mijloace de supraveghere adaptate contextului epidemiologic regional dar și creșterea gradului de conștientizare și implicare a personalului medical veterinar în activitățile de supraveghere a bolii.