



**CONSECINȚELE INFECȚIEI CU *BRUCELLA*
MELITENSIS ȘI ALE IMUNIZĂRII
INTRAOCULARE CU TULPINA REV 1, ASUPRA
SIGURANȚEI LAPTELUI DE OAIE ȘI CAPRĂ**
CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC: Prof. univ. dr. DANEȘ DOINA
Doctorand: SHMEGLIA (AWWAD) ELENA
Domeniul: MEDICINĂ VETERINARĂ

REZUMAT

CUVINTE CHEIE:

Bacterioze, zoonoze, epidemiologie, bruceloza, rumegătoare mici, ovine, caprine,
diagnostic de laborator, biologie moleculară, filogenie.

Teza de doctorat în domeniul ”medicină veterinară”, intitulată “Consecințele infecției cu *Brucella melitensis* și ale imunizării intraoculare cu tulpina Rev1, asupra siguranței laptelui de oaie și capră” a fost realizată la Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București, în cadrul Facultății de Medicină Veterinară, sub îndrumarea Doamnei Prof. univ. dr. Doina DANEȘ.

Primul obiectiv al studiului a fost caracterizarea situației epidemiologice și al riscului pe care îl reprezintă bruceloza în Palestina, după o perioadă de 15 ani de implementare a proiectului de Cel de al doilea obiectiv a fost caracterizarea fenotipică și genotipică a tulpinilor *Brucella*. Teza de doctorat este structurată în două secțiuni: prima secțiune este dedicată studiului cunoașterii în domeniu, iar cea de a doua este consacrată cercetărilor personale. Aceste secțiuni sunt organizate în trei capitole, primul capitol prezentând informații din literatura de specialitate referitoare la subiectul tezei, ce sunt folosite pentru interpretarea și compararea rezultatelor cercetărilor proprii. Capitolele II și III prezintă rezultatele cercetărilor personale.

CAPITOLUL I intitulat “DOCUMENTARE BIBLIOGRAFICĂ” rezumă informațiile științifice fundamentale referitoare la următoarele aspecte: caracteristicile generale și morfologice ale bacteriilor din genul *Brucella*, determinanții antigenici majori, patogenitatea și caracterizarea moleculară a bacteriilor genului *Brucella* și caracterizarea tulpinii *Brucella melitensis* Rev 1. Un subcapitol este consacrat caracterului de zoonoză a brucelozei, fiind descrisă aceasta infecție la animale și om. De asemenea, în acest capitol sunt prezentate informațiile bibliografice despre diagnosticul de laborator al infecțiilor brucelice, de la recoltarea probelor biologice și până la metodele de laborator curent folosite.

CAPITOLUL II este intitulat “FACTORI DE RISC ASOCIAȚI CU PREVALENȚA BRUCELEI *MELITENSIS* ÎN LAPTELE DE OAIE ȘI CAPRĂ ȘI ESTIMAREA SITUAȚIEI EPIDEMIOLOGICE A BRUCELOZEI ÎN CISIORDANIA, PARTE A PALESTINEI”, și este structurat în două subcapitole. În subcapitol “PREZENTAREA PALESTINEI ȘI A MINISTERULUI AGRICULTURII” se face o scurtă descriere a Palestinei istorice, a părții Palestinei care este Cisiordania – West Bank, a Guvernului Palestinian, a Ministerului Agriculturii – viziune și provocări, a interferențelor cu Israelul în sectorul agricol și cel al creșterii animalelor, a particularităților sociale în care beduinii sunt un element important în creșterea animalelor, a principalelor rase de ovine și caprine din Palestina, a produselor lactate tradiționale în Palestina (lapte proaspăt de ovine și caprine, brânza albă (jibnah baida, brânza

nablusia), a producerii brânzei labna (brânza- iaurt), producerea iaurtului uscat (jameed, laban kishq). În finalul acestui subcapitol sunt prezentate serviciile veterinare palestiniene. Al doilea subcapitol, intitulat “BRUCELOZA ÎN PALESTINA ȘI FACTORI DE RISC” prezintă studiile realizate pentru investigarea a patru factori de risc majori, care se manifestă în relație cu bruceloza în Palestina.

Primul factor de risc investigat este “EVALUAREA SITUAȚIEI EPIDEMIOLOGICE ȘI REVIZUIREA CONTROLULUI BRUCELOZEI ÎNTRE 1974-2014 ÎN CISIODRANIA”: au fost consultate documentele oficiale relevante emise de către ministerul agriculturii și se prezintă materialele și metodele care au fost utilizate pentru controlul brucelozei în Palestina în perioada 1974 – 1998 și controlul brucelozei după implementarea Programului Palestinian de Control al Brucelozei (PBCP) în 1998. Progresul înregistrat consecutiv implementării PBCP a fost cuantificat prin îndeplinirea obiectivelor propuse, astfel: înregistrarea fermierilor, vaccinarea animalelor, monitorizarea animalelor vaccinate în timpul campaniei de vaccinare, epidemio-supravegherea și monitorizarea programului de control al brucelozei, construirea capacității serviciilor veterinare, dezvoltarea capacității laboratorului pentru diagnosticul brucelozei, epidemio-supravegherea infecției cu *Brucella abortus* la vacile de lapte, conștientizarea publicului țintă și măsurarea impactului acțiunilor întreprinse prin studiul KAP. Investigațiile realizate în acest capitol evaluează impactul PBCP asupra situației epidemiologice a brucelozei după 15 ani de implementare a proiectului, prin prevalența brucelozei la animale și oameni, impactul PBCP asupra altor aspecte ale vieții și, în final, aspectele critice care afectează rezultatul programului de control și concluziile.

Ce-al doilea factor de risc investigat este identificarea frecvenței infecției brucelice prin Evaluarea “PREVALENȚEI ANTICORPILOR ANTI-BRUCELLA ÎN CAZURILE DE AVORTURI LA RUMEGATOARELE MICI DIN CISIODRANIA - INVESTIGAȚIE SEROLOGICĂ” prin tehnica ELISA, care au arătat că avortul brucelic se situează pe locul III ca prevalență în etiologia avorturilor la rumegatoarele mici.

EVALUAREA CUNOȘTINȚELOR, A ATITUDINILOR ȘI PRACTICILOR (KAP) REFERITOARE LA BRUCELOZA PE CARE LE DEȚIN PROPRIETARIII ANIMALELOR (OVINE ȘI CAPRINE) DIN CISIODANIA CU REFERIRE LA BRUCELOZĂ” este al treilea factor de risc investigat, folosind materiale și metodele specifice (aria de studiu, identificare

populație tinta, considerarea etnica, designul chestionarului, procesarea raspunsurilor si analiza statistica a acestora). Rezultatul acestui studiu KAP - cunoștințe, atitudini și practici, a fost valuat prin raportare la datele furnizate de ministerul sanatatii palestinian in 1999 si la activitățile de conștientizare publica desfasurate prin programul de control brucelozei 1999-2010. Cel de al IV-lea factor de risc evaluat a fost reprezentat de tehnicile de diagnostic disponibile si performanțele acestora, prezentate în capitolul „IMBUNĂȚĂȚIREA INSTRUMENTELOR DE DIAGNOSTIC FOLOSITE ÎN PROGRAMUL DE CONTROL AL FOCARELOR DE BRUCELOZĂ” , subiect tratat in doua subcapitole.

Primul capitol, “VALIDAREA RT-qPCR PENTRU DETECTAREA GENOMULUI DE *BRUCELLA* ÎN LAPTELE DE OAI ȘI CAPRĂ” prezintă principiul RT-qPCR și cerințele ce trebuiesc îndeplinite pentru validarea tehnicilor RT-qPCR pentru sensibilitate și specificitate, limita de detecție și cuantificare, liniaritatea cu y-intercept și coeficientul de determinare, coeficientul de corelație, deviația standard și coeficientul de variație, eficiența și repetabilitatea și calculul numărului de copii ale genomului. A fost descris modul de procesare al probelor (tulpiniile de control, izolarea tulpinilor de referință, extracția DNAului, determinarea concentrației ADNului *Brucelei melitensis* vaccin Rev 1, amplificarea RT-qPCR-ului) și validarea de RT-qPCR (specificitatea și sensibilitatea, Limita de detecții (LOD) și prepararea curbei standard, repetabilitatea, reproductibilitatea și eficiența testului, robustețe și electroforeza. Concluzia acestui studiu este că RT-qPCR “in-house” este o metodă ieftină și precisă pentru detectarea rapidă al agentului infecțios și utilă pentru implementarea rapidă ale măsurilor în focar și pentru prevenirea răspândirii bolii și evitarea infecțiilor umane.

Cel de-al doilea capitol de investigație în cadrul factorului de risc patru, “DETECTAREA GENOMULUI GENULUI *BRUCELLA* PRIN RT-qPCR DIN PROBE DE LAPTE DE LA RUMEGĂTOARELE MICI ÎN CISIORDANIA, INSTRUMENT IMPORTANT ÎN ADMINISTRAREA FOCARELOR” prezintă modul în care a fost utilizat protocolul dezvoltat “in house” în timpul focarului de bruceloză, fiind prezentate, materialele și metodele, inclusiv criteriile și modul de prelevare al probelor de lapte. Sunt discutate rezultatele și performanța testului serologic Rose-Bengal, rezultatele și performanța izolării bacteriene din probele de lapte, față de performanța RT-qPCR. Concluzia acestui subcapitol este că introducerea în uz a unor teste rapide, precise și sensibile ca RT-qPCR este un element extreme avantajos și oferă un instrument de încredere pentru utilizarea de către autorități, în scopul punerii în aplicare a

ăsurilor preventive de control al focarelor și prevenirea răspândirii bolii în rândul populației umane și animale.

În CAPITOLUL III este prezentată “PREVALENȚA INFECȚIEI CU *BRUCELLA MELITENSIS* ȘI IDENTIFICAREA GENELOR CE CODIFICĂ DETERMINAȚII DE PATOGENITATE ASOCIAȚI PERETULUI CELULAR LA TULPINI SALBATICE IZOLATE DIN CISIODRANIA, PALESTINA” , obiectiv căruia i s-a răspuns prin patru studii.

Primul studiu a cercetat „BAZA MOLECULARĂ A GENELOR DE VIRULENȚĂ ALE TULPINILOR DE *BRUCELLA MELITENSIS* IZOLATE ÎN CISIODRANIA, PALESTINA” .

Acest studiu este structurat în materiale și metode (recoltarea și cultivarea probelor, analiza PCR și identificarea genelor de virulență prin PCR), și prezintă rezultate și concluzii, conform cărora, în ciuda introducerii vaccinării de masă în 1999 în Palestina, prezența determinanților genetici de patogenitate asociați învelișului celular înregistrează o rată extrem de ridicată (95-100%) a la tulpinile sălbatice izolate din Cisiordania. Cel de-al doilea studiu realizează “ANALIZA POLIMORFISMULUI GENETIC ȘI OMOGENITĂȚII GENELOR ÎNVELIȘULUI CELULAR *lpsB*, *dacE* ȘI *amiC* LA TULPINILE SALBATICE DE *BRUCELLA MELITENSIS* IZOLATE ÎN CISIORDANIA, PALESTINA”. Sunt prezentate materialele și metodele (recoltarea și cultivarea probelor, proiectarea primerilor și analiza de PCR, secvențierea și analiza BLAST a genelor *lpsB*, *dacE* și *amiC*, omologia și analiza filogenetică), rezultatele (analiza bacteriologică, secvențierea genelor și analiza de BLAST) și concluziile. Conform acestui studiu, tulpinile izolate din West Bank au fost strâns înrudite cu *Brucella melitensis* biovarului 1, reconfirmând rezultatele identificării lor prin metodele bacteriologice bazate pe fenotip, respectiv proprietățile morfologice și biochimice.

În al treilea studiu este investigată “ABORDAREA EPIDEMIOLOGICĂ A BRUCELOZEI ÎN PALESTINA, FOLOSIND ANALIZA PROFILULUI FILOGENETIC”. Sunt prezentate materialele și metodele (recoltarea probelor și izolarea bacteriană, proiectarea primerilor și identificarea de PCR, proiectarea primerilor și protocolului de amplificare, secvențierea produsilor de amplificare, alinierea și analiza filogenetică), rezultatul alinierii

evențelor și arborele filogenetic rezultat și, în final, concluziile care arată că deși cele 18 izolate *B. melitensis* au un ancestor comun, între ele există și diferențe, variații. Secvențe din același raion au avut un grad mare de omologie, dar un grad de omologie mai puternic al variațiilor genetice, au avut probele de la aceleași sate, ceea ce a condus la localizarea pe aceleași ramuri

ale arborelui filogenetic. Acest studiu arată că relația strânsă dintre variațiile secvențelor depinde de distanța dintre raioanele de origine a probelor. Au fost identificate printre tulpinile de teren unele care au prezentat un grad mai mare de omologie cu tulpina vaccinală *Brucella melitensis* Rev 1, sugerând o posibilă infecție produsă de tulpina vaccinală. Deși gradul de variație al tulpinilor salbatice *Brucella melitensis* a fost redus, ele au conservat virulența, capacitatea abortigenă și patogenitatea pentru om. Cartografierea filogenetică la nivel mondial a relevat faptul că tulpinile palestinienilor sunt înrudite genetic cu cele care au fost izolate alte țări ale bazinului mediteranean, precum Spania, Israel, Cipru și Turcia dar și cu cele izolate în unele țări din Asia ca India, Malaezia, Indonezia. Această constatare indică o origine evolutivă comună ancestrală a izolatelor.

În cel de al 4-lea studiu este cercetată “PREVALENȚA ȘI DISCRIMINAREA MOLECULARĂ A TULPINII *B. MELITENSIS* REV.1 FAȚĂ DE IZOLATELE DIN LAPTELE DE OAI ȘI CAPRĂ, PRIN ANALIZA POLIMORFISMUL DE RESTRICȚIE AL GENEI *OMP2*”: sunt prezentate materialele și metodele (recoltarea probelor, izolarea tulpinii *Brucella melitensis* Rev 1 și a tulpinilor salbatice, analiza de PCR, digestia ADN-ului cu enzima *PstI* și migrarea electroforetică a produsilor de digestie). Rezultatele obținute au arătat că fragmentele de ADN obținute de la tulpina vaccinală *B. melitensis* Rev 1 și de la două izolate salbatice de la turmele din raione Hebron și Ramallah au un profil de digestie similar cu *PstI* și au rezultat după digestie trei benzi: un fragment intact de 282 bp al genei *omp2a* amplificată, căreia îi lipsește situsul de restricție *PstI*, și două fragmente mai mici de 238 și 44 bp, obținute din digestia fragmentului *omp2b* amplificat. În contrast, izolatele salbatice *B. melitensis* au produs doar două fragmente mai mici: un fragment de 238 bp și 44 bp.

CAPITOL IV al tezei de doctorat “TENDINȚE NOI DE DIAGNOSTICUL LABORATOR AL BRUCELOZEI ÎN PALESTINA: SCURTĂ PREZENTARE ” a cumulat toate tehnicile de diagnostic de laborator care au fost folosite pentru realizarea cercetărilor prezentate în teză și prezintă planul general al diagnosticului brucelezei în laboratorul veterinar central palestinian, modul de recoltare, colectare și procesare a probelor, examinarea serologică a probelor de ser, testul de fixarea complementului (CFT), metoda imunoenzimatică indirectă (ELISA), izolarea și identificarea brucelelor, diagnosticul molecular al brucelezei – extracția ADN și identificarea prin PCR, PCR utilizând unul sau mai multe perechi de primeri, PCR în timpul real, detectarea polimorfismului genetic genei *omp2* prin PCR-RFLP, secvențierea produsilor de amplificare,

alinieră și analiza filogenetică, care au permis formularea concluziei că autoritățile au la dispoziție întregul panel de metode de diagnostic necesare pentru controlul brucelozei. Lucrearea se încheie cu 19 concluzii generale, cu 12 recomandări și cu indicarea referințelor bibliografice.