

## REZUMAT

### CERCETĂRI PRIVIND UTILIZAREA PLASMEI HIPERIMUNE ÎN TRATAMENTUL PATOLOGIILOR SPECIFICE ȘI A DEFICITELOR IMUNOLOGICE LA VIȚEI

Doctorand: POPESCU Dragoș Adrian

Coordonator științific: Prof. Univ. Dr. CODREANU Mario Darius

**CUVINTE CHEIE:** colostru, plasmă hiperimună, imunodeficiență, diaree neonatală, hiperimunizare

Teza de doctorat intitulată *„Cercetări privind utilizarea plasmei hiperimune în tratamentul patologiilor specifice și a deficitelor imunologice la viței”* este redactată și structurată, conform normelor în vigoare la momentul scrierii acesteia, în două părți principale, astfel: prima parte, reprezentată de „Studiul bibliografic” care cuprinde 47 de pagini și cea de a doua parte, intitulată „Cercetări proprii”, cu un număr de 91 de pagini. Lucrarea de doctorat are un număr total de 151 pagini și este ilustrată cu 14 tabele și 35 de figuri. Informațiile consultate din literatura de specialitate, din cadrul primei părți a acestei lucrări, au folosit ca suport pentru interpretarea rezultatelor obținute pe parcursul studiului.

Prima parte, numită *„Studiu bibliografic”* este formată din 3 capitole vaste în cadrul cărora sunt descrise concis statusul imunologic al mamei și fătului, atât în prima parte a gestației, cât și pe întregul parcurs al acesteia, interacțiunea dintre aceștia din punct de vedere imunologic și impactul pe care îl are vaccinarea mamei asupra imunității vițelului. Tot în partea de studiu bibliografic al acestei teze sunt evidențiate noțiuni despre statusul imunologic al vițelului nou-născut și necesitatea consumului colostrului de calitate în vederea modulării dezvoltării sistemului imun al acestuia. De asemenea, sunt sintetizate informații despre evoluția patologiilor neonatale ale vițelilor, cu tropism pentru sistemul respirator sau digestiv și modalitățile de corectare a statusului imun precar al nou-născuților acestei specii.

Cea de a doua parte, reprezentată de *„Cercetări proprii”* este concentrată în 8 capitole în cadrul cărora sunt centralizate rezultatele cercetărilor efectuate pe parcursul stadiului doctoral, ultimul capitol fiind reprezentat de concluziile și recomandările finale ale cercetărilor desfășurate. Capitolele din structura acestei părți sunt divizate în subcapitole care conțin informații despre loturile experimentale, materialele și metodele utilizate, descrierea și interpretarea rezultatelor obținute și concluziile parțiale extrase din fiecare studiu efectuat.

Capitolul IV descrie *„Scopul și obiectivele cercetării”* care sunt conturate în jurul dezideratului ce prevede o soluție alternativă de terapie în patologiile neonatale ale vițelilor, pe de-o parte, și dorinței de obținere a unor produse sangvine hiperimune, cu proprietăți de îmbogățire a statusului imun precar al vițelilor nou-născuți, pe de altă parte. La baza atingerii acestui scop au stat o serie de obiective ce au presupus obținerea de plasmă hiperimună, consecutiv hiperimunizării vacilor indemne de boli infecțioase și administrarea acesteia, în scop terapeutic, la viței cu sindrom diareic.

Capitolul V urmărește *„Evaluarea calității colostrului la vacă”* și presupune cuantificarea titrului de anticorpi colostrali în vederea determinării calității colostrului din fermele de cercetat. Lucrarea s-a desfășurat pe un eșantion de 20 de vaci de lapte, din două rase diferite, Holstein (n=10) și Bălțată Românească cu Negru (n=10), atât vaci primipare, cât și vaci multipare. Vacile aparțin unor ferme din județul Ilfov, localizat în sud-estul României.

Colostrul reprezintă secreția lăctată a femelelor din primele zile post-partum, cu conținut bogat în imunoglobuline și alți constituenți cu rol imunomodulator, iar calitatea acestuia este dictată de concentrația de imunoglobuline pe care o conține. În cadrul acestui capitol s-a cuantificat concentrația gamaglobulinelor,

prin metodă spectrofotometrică, cu obținerea unor rezultate foarte bune în ceea ce privește calitatea colostrului cercetat. Din probele supuse testării (n=20), 19 au avut concentrații crescute ale acestor molecule, indicând un colostru de bună calitate, o singură femelă înregistrând valori ale imunoglobulinelor din colostru sub limitele admise.

Capitolul VI descrie **„Evaluarea taurinelor pentru depistarea, prin metoda PCR, a afecțiunilor infecto-contagioase și parazitare”** și oferă informații asupra statusului epidemiologic al femelelor din fermă. Importanța identificării animalelor purtătoare de agenți patogeni și eliminarea lor din lotul experimental derivă din influența pe care o au aceste animale asupra studiului. Animalele infectate, aflate în stare de latență sau cu semne clinice, au efecte negative asupra titrului de anticorpi postvaccinali sau influențează rezultatul final al studiului datorită reacțiilor postinfecție. Utilizarea testelor PCR au fost alese în detrimentul celor uzuale în vederea obținerii unor rezultate mai concludente și datorită timpului de efectuare, care este minimizat datorită posibilității de lucru pe un eșantion mai mare în același timp. Rezultatele concentrate în acest capitol prevăd excluderea unei singure femele din lotul supus studiului, care a fost depistată pozitivă la herpes virusul bovin tip 1. În urma excluderii bovinei purtătoare, eșantionul de rumegătoare pe care s-a efectuat studiul în continuare a fost format din 19 femele.

Capitolul VII intitulat **„Hiperimunizarea vacilor în ultima parte a gestației”** descrie etapele de selecției a animalelor supuse imunizării repetate și protocolul utilizat în această lucrare, în vederea hiperimunizării animalelor gestante. În acest scop sunt selectate femele sănătoase (n=19), după ce sunt supuse testelor de screening și unui control clinic, și vaccinate împotriva celor mai frecvente patologii. Vaccinul utilizat este Bovilis Rotavec Corona, un vaccin polivalent care are ca și substanțe active o tulpină de Rotavirus bovin inactivat, tulpina UK-Compton, serotipul G6 P5, Coronavirus bovin inactivat, tulpina Mebus și o tulpină de E. coli F5 (K99) aglutinat, conform prospectului producătorului. Ca și adjuvanți, acesta conține ulei mineral și hidroxid de aluminiu. Protocolul instituit în acest caz presupune vaccinarea mamelor cu 3 doze de vaccin, la interval de 2 săptămâni, prima realizându-se în jurul vârstei gestației de 220-235 zile. Vaccinarea triplă a efectivului de bovine supuse imunizării a avut ca obiectiv creșterea titrului de anticorpi împotriva celor mai frecvenți agenți patogeni implicați în diareea neonatală a vițelilor. Rezultatele cuantificării acestora indică un succes al hiperimunizării vacilor.

Capitolul VIII numit **„Evaluarea nivelului seric de imunoglobuline al vacilor hiperimunizate”** urmărește cuantificarea cantității de imunoglobuline serice ale vacilor supuse protocolului de hiperimunizare. În cazul acestei etape a fost necesară prelevarea de probe de sânge de la cele 19 femele luate în studiu și prelucrarea acestora cu ajutorul kiturilor Bovine IgG ELISA utilizate în acest studiu. Creșterea titrului de anticorpi în procent de 65% în serul bovinelor imunizate în ultima parte a gestației, comparativ cu cantitatea de imunoglobuline existentă în ser înainte de prima vaccinare, confirmă faptul că imunizarea femelelor pe parcursul gestației are efecte pozitive asupra titrului de anticorpi.

Capitolul IX descrie cadrul și etapele ce presupun **„Obținerea de produse și subproduse sangvine hiperimune la vacă”**. Produsele sangvine obținute constau în plasmă hiperimună și concentrat eritrocitar, separate din unitățile sangvine, prelevate de la vacile supuse hiperimunizării. În prima etapă, unitățile sangvine recoltate de la vacile indemne au fost supuse procesului de centrifugare, urmat de separarea celor două produse, care a fost facilitată de un expresor de plasmă semi-automat, determinând în final segregarea concentratului de plasmă și a celui eritrocitar. Fiecare unitate sangvină a avut o greutate variabilă, între 480-650 de grame, și a exprimat plasmă hiperimună în proporție de 63-64%, restul fiind reprezentată de concentrat eritrocitar. De la fiecare femelă s-au obținut câte două unități sangvine.

Recomandarea plasmei hiperimune în patologii neonatale constituie un punct de sprijin în instituirea terapiei la speciile ale căror placentă nu permite trecerea anticorpilor de la mamă la făt sau când, în lipsa consumului de colostru de calitate, apare o deficiență în apărarea imună. Aplicabilitatea acestei terapii ca alternativă la antibiotice constituie un interes tot mai ridicat, având în vedere ritmul alarmant de urgență a rezistenței bacteriene în fața

substanțelor antimicrobiene. De asemenea, administrarea plasmei hiperimune, la vițeii cu titru scăzut de anticorpi post-colostrali, favorizează apărarea organismului în fața agenților patogeni din mediu.

Ultimul capitol de studiu a fost reprezentat de „**Evaluarea eficacității subproduselor sangvine hiperimune utilizate la vițeii cu tulburări digestive**” și reprezintă partea cea mai voluminoasă din această teză. Patologiile digestive neonatale ale vițelilor reprezintă o cauză majoră a pierderilor economice din sectorul bovin, datorită ratei crescute de morbiditate și mortalitate în primele săptămâni post-partum. Diareea neonatală care evoluează în primele 2-4 zile de viață a vițelului este adesea cauzată doar de *E-coli* (K99), iar între 5 și 21 de zile intervin rotavirusul, coronavirusul și *Cryptosporidium* spp., care sunt și ele responsabile de apariția acesteia.

Terapia de primă linie în tratarea sindromului diareic la viței este axată pe antibiotic- și fluidoterapie. Rata de urgență crescută a rezistenței antimicrobiene stimulează cercetările spre găsirea unor soluții alternative la acest tip de medicamente, acest deziderat stând în spatele desfășurării acestui studiu.

Înainte de administrarea intravenoasă a plasmei hiperimune, vițelilor li s-au prelevat probe de fecale în vederea confirmării diagnosticului de diaree de origine infecțioasă sau parazitară. Diagnosticul etiologic s-a făcut cu ajutorul unor kituri ELISA, toți vițeii din lotul de cercetare fiind pozitiv la cel puțin un agent patogen care s-a urmărit. După selectarea vițelilor pentru lotul de studiu s-a realizat transfuzarea plasmei, prin administrare intravenoasă, la nivelul venei jugulare, pe parcursul căreia s-a supravegheat fiecare animal în vederea intervenirii în cazul unei reacții alergice.

Pentru evidențierea efectelor rezultatelor administrării plasmei hiperimune s-au format două loturi de viței, unul martor care a fost tratat cu antibiotice (n=10) și lotul experimental (n=20), vițeii din cadrul acestora fiind expuși procedurii de transfuzare a plasmei hiperimune. Recoltarea de sânge pentru cuantificarea titrului de anticorpi s-a făcut înainte de administrarea oricărei forme de terapii, la 1 oră și la 24 de ore de la transfuzarea plasmei și la 48, respectiv 72 de ore de la administrarea antibioticelor.

Rezultatele studiului au demonstrat eficacitatea transfuzării plasmei hiperimune, titrul seric al anticorpilor vițelilor cărora li s-a administrat acest produs hiperimun fiind dublu comparativ cu cel obținut de la vițeii din lotul martor cărora li s-a administrat antibiotice. În plus, creșterea concentrației anticorpilor s-a realizat instant, în doar o oră de la administrarea produsului hiperimun concentrația circulantă a acestora fiind de 9,5 x mai mare decât înainte de administrare. În ceea ce privește evoluția clinică a bolii, acesta a avut o durată mai scurtă în cazul pacienților cărora li s-a administrat plasmă, comparativ cu cei tratați cu antibiotice. De asemenea, rata de supraviețuire a fost mai mare în cazul vițelilor din lotul experimental, de 98%, iar a celor din lotul martor de doar 50%, jumătate din aceștia nesupraviețuind bolii diareice.

În cadrul capitolului XI s-au conturat o serie de concluzii și recomandări extrase de pe urma cercetărilor întreprinse în cadrul acestei teze de doctorat. De asemenea, în conținutul acestei lucrări de doctorat se regăsesc rezultate publicate în articole indexate în baza de date internaționale.

În cadrul referințelor bibliografice sunt însumate un număr de 287 titluri din literatura internațională și națională, 38 dintre acestea fiind publicate sub anii 2000, 50 între anii 2000-2010, iar restul cercetărilor efectuate fiind peste anul 2010 și până la momentul redactării tezei. Din totalul titlurilor citate, 20 sunt reprezentate de cărți de specialitate și 267 sunt articole din reviste de prestigiu.