

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI DE MEDICINĂ  
VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI  
FACULTATEA : MEDICINĂ VETERINARĂ  
DOMENIUL : MEDICINĂ VETERINARĂ  
SPECIALIZAREA: FIZIOLOGIE NORMALĂ ȘI PATOLOGICĂ**

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

**CONTRIBUȚII PRIVIND IMPLICAREA  
MECANISMULUI IMUNOLOGIC IN  
LEUCOCITOZA MALIGNĂ LA TAURINE**

**CONDUCĂTOR DOCTORAT,  
PROF.UNIV.DR. ELENA MARCU**

**DOCTORAND,  
SIMION ANI (căsătorită DĂMĂCEANU)**

**IAȘI – 2009**

## REZUMAT

Leucocitoza malignă a bovinelor (LEB - leucoza enzootică bovină) este o boală infecțioasă, produsă de un deltaretrovirus din categoria oncovirusurilor de tip C, denumit virus leucemic bovin (VLB). Majoritatea cercetărilor anterioare au dovedit că 1/3 dintre animalele infectate prezintă o formă de boală preneoplazică - limfocitoza persistentă (LP), ce se caracterizează prin creșterea relativ stabilă a numărului de limfocite B în sângele periferic și numai 5 % dintre aceste animale dezvoltă forma neoplazică de boală, caracterizată prin leucemie limfocitară acută sau limfom/limfosarcom (prin infiltrarea diverselor organe cu limfocite B transformate tumorale).

Un grup de cercetători de la Universitatea din Berkeley, California, sub coordonarea lui G.C.Buehring, în perioada 1994-2005, au evidențiat faptul că VLB poate avea ca celule țintă, nu numai celule sanguine, ci și celule epiteliale ale țesutului mamar, aspect care s-a demonstrat prin tehnici de imunohistochimie și PCR pe probe de culturi celulare și secțiuni de țesut mamar prelevate de la vaci infectate cu VLB, precum și pe probe de țesut mamar normal și malignizat de la femei cu și fără cancer mamar. Frecvența infecției cu VLB a țesutului mamar malign la femei diagnosticate cu cancer mamar a fost mai mare decât la probele martor reprezentate de țesut mamar non-malign. Prin urmare, cercetările privind inducerea transformării maligne de către VLB, prezintă un interes actual major, atât pentru medicina veterinară, cât și pentru medicina umană.

Cercetările actuale privind leucemiile la om și complexe leucemice la diverse specii de animale sunt orientate către descifrarea mecanismelor moleculare ale cancerogenezei, respectiv leucemogenezei, induse viral, pe de o parte, precum și către modalitățile de reactivitate imună antitumorală ale organismului gazdă, pe de altă parte.

Cercetările citate în literatura de specialitate și consultarea ultimilor informații științifice din bazele de date on-line relevă necesitatea completării unor necunoscute ale mecanismului fiziopatologic al leucozei enzootice bovine prin corelarea modificărilor sanguine de tip imunitar cu cele care reflectă deficite energetice și afecțiuni toxico-metabolice ale diverselor organe.

În acest context, scopul prezentei lucrări este cercetarea statusului imun celular și umoral al bovinelor seropozitive pentru VLB, în vederea stabilirii mecanismului fiziopatologic dominant al leucozei bovine a efectivelor și a completării unor necunoscute privind tulburările fiziopatologice ale complexului leucemic bovin.

Obiectivele propuse sunt: studiul epidemiologic al leucozei enzootice bovine în efectivele de taurine din județul Vaslui prin utilizarea testelor serologice bazate pe reacția antigen-anticorp (ID, ELISA); evidențierea mecanismului fiziopatologic dominant implicat în leucocitoza malignă la taurine, prin determinări hematologice cantitative și calitative ale seriei eritrocitare, leucocitare și trombocitare și prin investigații biochimice ale profilului proteic, energetic, hepato-renal și mineral.

Pentru atingerea obiectivelor propuse s-au efectuat 427.394 examene serologice pentru depistarea LEB și s-au investigat 70 de probe de sânge din punct de vedere hematologic și biochimic pentru evidențierea modificărilor imunologice celulare și umorale. Probele de sânge au provenit de la bovine adulte (6-13 ani) grupate pe loturi pozitive și negative pentru virusul leucozei bovine, cu și fără limfocitoză persistentă, astfel: VLB+LP+ (limfocitoză accentuată, respectiv moderată), VLB+LP- (fără limfocitoză), VLB- (lot martor).

Metodele de lucru serologice utilizate pentru detectarea infecției cu VLB au fost: *imunodifuzia în gel de agar (ID sau IDGA)* și *testul imuno-enzimatic (ELISA)*, conform metodologiei prevăzute în instrucțiunile oficiale (Manual OIE 2000). Determinarea constantelor hematologice și biochimice s-a realizat cu ajutorul unor analizatoare automate și semiautomate disponibile în laboratoarele veterinare: *analizatorului hematologic automat MS4-5*, *analizatorul biochimic semiautomat EOS 880 Plus* și *chituri specifice*. Examenul citologic sanguin s-a efectuat pe frotiuri de sânge colorate prin metoda clasică *May-Grünwald-Giemsa* (MGG). Analizele statistice ale rezultatelor au fost efectuate utilizând programul SPSS versiunea 16.0 pentru Windows.

Rezultatele obținute în urma studiului nostru se prezintă în continuare.

Rezultatele studiului epidemiologic efectuat pe o durată de 6 ani în județul Vaslui, arată că din cele 427.394 teste serologice efectuate pentru detectarea LEB (350.182 examene ID și 77.212 examene ID și ELISA), 1643 au fost probe pozitive. Incidența bolii a înregistrat o reducere continuă de la 0,64 % la începutul perioadei la 0,22 % la sfârșitul perioadei studiate. Cartogramele privind distribuția spațială a LEB au evidențiat o creștere a numărului de localități indemne de la 21 la 62. Gradul de răspândire a LEB s-a redus datorită eficientizării măsurilor de profilaxie (asanare prin extracție, depopulare) dublate și de inițierea programului național de înmatriculare (identificare), prin care se urmărește limitarea circulației libere a animalelor bolnave.

În leucocitoza malignă (leucoză) la taurine, mecanismul fiziopatologic dominant este de tip patochimic cu punct de plecare în sistemul imunitar al organismului, manifestarea fiind

declanșata de virusul specific. Afirmatia este susținută de modificările imunității celulare și umorale specifice înregistrate încă din fazele timpurii ale infecției, modificări relevate de testele serologice de diagnostic. Insuși testul serologic de diagnostic, bazat pe titrul de anticorpi, demonstrează implicarea imunității umorale specifice în procesul de boală.

Rezultatele privind variațiile constantelor eritrocitare sanguine au relevat valori mai scăzute ale E, Hb, Ht și CHEM la taurine VLB+ decât la cele VLB- (lotul martor), tendința către o stare de anemie normocitară hipocromă fiind net evidențiată încă din stadiul timpuriu de boală (la lotul VLB + asimptomatic). În boli cronice, stări maligne, inclusiv în leucoza enzootică bovină, se pot asocia scăderea producției de eritropoetină, depresia medulară, hemoliza, pierderea cronică de fier, apariția de produși toxici datorită unor vicii de metabolism, toate acestea conducând la instalarea anemiei și cașectizarea animalelor.

Variațiile constantelor sanguine leucocitare ne-au permis încadrarea animalelor investigate în leucemice și aleucemice, cu limfocitoză pronunțată, limfocitoză de grad redus și fără limfocitoză. În numeroase studii, examenele hematologice au evidențiat leucocitoza, de la valori moderate (în jur de 10.000 leucocite/ $\mu$ l, la valori ce depășesc 100.000 leucocite/ $\mu$ l). Hemogramele obținute de la cazurile de LEB cu limfom demonstrează o mare variație a formulei leucocitare sanguine.

În prezentul studiu, la vaci seropozitive pentru VLB, numărul de leucocite totale din sângele periferic a variat de la valori normale - sub 12.000/ $\mu$ l (limite de variație de 5,51-11,81  $\times 10^3$ / $\mu$ l) la valori moderat crescute – între 12.000 și 20.000/ $\mu$ l (limite de variație 14,40-18,73  $\times 10^3$ / $\mu$ l) și valori de peste 20.000/ $\mu$ l, fără a depăși însă 50.000/ $\mu$ l (limite de variație 24,62-34,20  $\times 10^3$ / $\mu$ l). Astfel, lotul A la care media leucocitelor totale depășește 20.000/ $\mu$ l și lotul B, cu media leucocitelor totale peste 12.000/ $\mu$ l, prezintă leucocitoză accentuată, respectiv moderată, în timp ce lotul C, cu media leucocitelor totale sub 12.000/ $\mu$ l, nu prezintă leucocitoză. Această clasificare relevă faptul că în urma examenelor serologice și hematologice, majoritatea animalelor au fost surprinse în primul stadiu al bolii, de purtător asimptomatic de virus, dar în faze diferite ale interacțiunii virusului cu sistemul imun al organismului gazdă. Includem aici lotul B și C, care însumează 20 din cele 29 de animale investigate (68,96 %). Restul animalelor investigate, în număr de 9, aparținând lotului A (31,04 %) prezintă un stadiu mai avansat de boală, caracterizat printr-o leucocitoză accentuată datorită acumulării în sânge a limfocitelor, fenomen cunoscut în evoluția LEB sub denumirea de limfocitoză persistentă - LP (denumită în unele studii și leucemie limfocitară cronică – LLC). Nu am întâlnit în studiul nostru stadiul final al bolii, cel de dezvoltare tumorală (limfom sau limfosarcom)

Limfocitoza ce caracterizează, conform datelor din literatura de specialitate 20-30 % din vacile cu leucoza enzootică bovină în primul stadiu de evoluție, s-a înregistrat în prezentul studiu la 14 din cele 29 de bovine seropozitive, ceea ce reprezintă un procent de 48,27 %.

Creșterea numărului de limfocite și prezența bazofiliei citoplasmatică a limfocitelor și a celulelor asemănătoare imunocitelor sau plasmocitelor indică o stimulare antigenică cronică și o creștere a sintezei imunoglobulinelor, cum se întâmplă în bolile cu perioadă de latență îndelungată.

În prezentul studiu, numărul de limfocite la animalele VLB<sup>+</sup>, considerate în stadiul de limfocitoză persistentă, a variat între 7,6 și 25,4 mii/ $\mu$ l, în condițiile în care lotul martor a prezentat o medie a numărului de limfocite de  $3,8 \pm 0,28$  mii/ $\mu$ l. Vacile din acest grup (VLB<sup>+</sup>PL<sup>+</sup>) au prezentat și neutrofilie (numărul absolut de neutrofile fiind de 4,9-7,9 mii/ $\mu$ l, peste valoare medie a lotului martor VLB negativ, de  $4,55 \pm 0,78$  mii/ $\mu$ l) și monocitoză (limitele de variație pentru numărul de monocite fiind de 0,6-2,3 mii/ $\mu$ l, depășind media martorului VLB negativ, de  $0,4 \pm 0,01$  mii/ $\mu$ l).

Date cunoscute din literatura de specialitate precizează că profilul citokinelor implicate în activarea sistemului imunitar se modifică odată cu progresia diverselor boli cronice, inclusiv a leucozei enzootice bovine, aceste citokine fiind extrem de variabile în funcție de stadiul de evoluție al bolii. În afară de limfocitele T și B, un rol esențial în producerea interleukinelor au și neutrofilele și sistemul monocito-macrofagic (D.Pyeon și G.A. Splitter, 1998). De asemenea, s-a arătat că, deși ținta majoră a VLB este limfocitul B, există și alte celule, în principal lineajul celular monocito-macrofagic în care virusul leucozei bovine, ar putea persista timp îndelungat (N. Gillet și colab., 2007).

Prezența unui număr mai mare de monocite în sângele periferic, mai ales la animalele cu limfocitoză persistentă, s-ar putea explica prin scăderea morții celulare programate a acestor celule, ca urmare a integrării virusului în genomul celulei gazdă, dar și prin creșterea producției acestor celule implicate în modificarea profilului citokinic corespunzător progresiei bolii.

Prin examinare microscopică a frotiurilor de sânge colorate MGG, limfocitele s-au diferențiat morfologic și funcțional după dimensiunile lor (Lf mari, mijlocii și mici) și după prezența sau absența granulațiilor intracitoplasmatică (Lf cu granulații sau reactive și fără granulații sau areactive).

Rezultatele examinării morfologiei limfocitare au evidențiat un procent de limfocite mari mai redus la loturile VLB pozitive (A, B, C), comparativ cu lotul martor VLB negativ care are cel mai ridicat procent de limfocite de talie mare. Valorile medii procentuale și absolute ale

numărului de limfocite mici indică diferențe între loturile VLB pozitive, direct proporționale cu gradul de limfocitoză înregistrat. Taurinele cu limfocitoză severă au cel mai mare număr de limfocite de talie mică (o medie de  $10,59 \pm 5,66$ , reprezentând  $74,93 \pm 20,35$  %), în timp ce taurinele cu limfocitoză de grad redus au un număr de limfocite mici de  $3,70 \pm 1,39$ , reprezentând  $56,45 \pm 18,79$  %, iar taurinele fără limfocitoză au un număr de Lf mici de  $2,06 \pm 0,69$ , reprezentând  $59,42 \pm 16,95$  %.

Reactivitatea limfocitară a prezentat diferențe între loturile investigate, cel mai redus procent de limfocite reactive fiind întâlnit la taurinele din lotul A –  $4,74 \pm 3,48$  %, în timp ce loturile B și C, ca și lotul martor, au prezentat un procent de limfocite reactive între limitele de referință citate în literatura de specialitate: lotul B –  $12,59 \pm 5,86$  %, lotul C –  $8,89 \pm 5,08$  %, lotul martor –  $10,23 \pm 0,71$  %, aceasta relevând faptul că limfocitoza severă este rezultatul proliferării limfocitelor transformate, areactive imunologic.

Variațiile constantelor trombocitare depind ca și cele leucocitare de stadiul de evoluție a bolii. Numărul mediu de plachete sanguine a prezentat valorile cele mai scăzute la lotul B (cu grad redus de limfocitoză) –  $344,2 \pm 97,93$  mii/ $\mu$ l, fără a ajunge însă sub limita inferioară a speciei. Dacă în stadiul asimptomatic de boală, numărul de trombocite nu variază considerabil față de cel al lotului martor, VLB negativ, în stadiul de tranziție către limfocitoza persistentă, așa cum este cazul lotului B din studiul nostru, se înregistrează trombocitopenie, iar în stadiul mai avansat, de limfocitoză persistentă, deși media numărului de trombocite este apropiată de cea a lotului martor, există variații foarte largi de la trombocitopenie la trombocitoză. Virusurile, inclusiv cele leucemice, pot induce în anumite stadii ale bolii hipoplazie medulară, având ca rezultat leucemia aleucemică, care se poate asocia cu trombocitopenie și anemie.

Rezultatele privind variația constantelor biochimice în LEB au relevat o serie de modificări, unele dintre ele nefiind citate în literatura de specialitate.

Imunitatea umorală specifică mecanismului imunologic a scos în evidență modificări ale profilului proteic. Astfel, proteinele totale din serul sanguin al taurinelor VLB+, de  $9,63 \pm 0,97$  g/dl, sunt mai crescute decât cele înregistrate la lotul martor VLB- și depășesc cu mult media valorilor de referință. Alfa-globulinele serice, ca și beta-globulinele serice au înregistrat la lotul pozitiv pentru VLB ușoare creșteri nesemnificative statistic ( $1,35 \pm 0,96$  g/dl, respectiv  $1,60 \pm 0,97$  g/dl), față de valorile lotului martor ( $1,09 \pm 0,20$  g/dl, respectiv  $1,30 \pm 0,32$  g/dl). Gama-globulinele serice au înregistrat creșteri semnificative statistic –  $3,43 \pm 1,06$  g/dl la vaci pozitive,

față de martorul negativ -  $1,92 \pm 0,26$  g/dl. Aceste modificări concordă cu rezultatele altor studii ce explică creșterea gamaglobulinelor prin proliferarea tumorală a limfocitelor B.

Rezultatele privind investigarea profilului energetic au relevat unele variații la taurine pozitive pentru VLB și considerăm că acestea completează informațiile de specialitate. Astfel, am obținut creșterea de două ori la vaci VLB+ a trigliceridelor serice -  $59,5 \pm 17,92$  mg/dl, față de media martorului VLB-; creșterea nivelului seric al colesterolului ( $159,2 \pm 37,82$  mg/dl) față de media de referință cunoscută (100 mg/dl); creșterea netă la vacile VLB+ a lactacidemiei ( $40,02 \pm 6,56$  mg/dl), aspect evidențiat de majoritatea studiilor anterioare efectuate la om și animale cu leucemii.

Hipercolesterolemia este controversată în literatura de specialitate, unii autori vorbind de creșteri ale colesterolemiei în stadii precanceroase ale bolii, iar alții de hipocolesterolemie în stadii de malignitate avansată a sistemului hematopoetic. Explicația creșterii nivelului acidului lactic este sporirea producției acestuia de către celulele leucemice (care au funcția mitocondriilor responsabile de metabolismul energetic aerob perturbată).

Cercetările privind profilul hepato-renal obținute de noi pot fi considerate originale pentru leucoza bovină. Evidențierea unui nivel seric al GGT ( $24,38 \pm 9,75$  U/l) la limita superioară de referință, a PAL ( $124 \pm 80,32$  U/l) peste media de referință și a BUN ( $32,08 \pm 3,57$  mg/dl) peste limita superioară de referință a speciei, demonstrează că la vacile VLB+ se instalează tulburări hepato-celulare și renale încă din stadiile timpurii ale bolii, ca rezultat al infiltrației limfocitare leucemice a ficatului și rinichiului.

Profilul mineral investigat în prezentul studiu arată la vaci VLB+ menținerea în limite normale a concentrației serice a calciului ( $9,91 \pm 0,26$  mg/dl) și magneziului ( $2,22 \pm 0,23$  mg/dl) dar o reducere a concentrației fosforului anorganic ( $2,98 \pm 1,06$  mg/dl), aspect care nu este relevat în literatura de specialitate cunoscută.

În concluzie, prezența anticorpilor anti-VLB, relevată pe baza testelor serologice, modificările celulare sanguine (leucocitare, trombocitare, eritrocitare), relevate prin examene hematologice cantitative și calitative, ca și modificările biochimice privind profilele proteic, energetic, hepato-renal și mineral la bovinele investigate în prezentul studiu, arată implicarea unor mecanisme imunologice și patochimice complexe în producerea leucozei enzootice la bovine.