

REZUMAT

Teza intitulată **„CERCETĂRI BACTERIOLOGICE, EPIDEMIOLOGICE ȘI SEROLOGICE ÎN BRUCELOZA OVINĂ”** este motivată științific și practic de următoarele aspecte:

- epididimita infecțioasă în România, descrisă încă din 1957, continuă să fie una din bolile frecvent întâlnite la animale, producând pierderi economice importante în efectivele de ovine prin deprecierea berbecilor reproducători, avorturi și fătări de produși morți sau neviabili la oi precum și prin cheltuielile cu măsurile de supraveghere, profilaxie și combatere, infecția având drept urmare micșorarea procentului de fecunditate;
- deși ca urmare a aplicării măsurilor sanitare veterinare pentru prevenire și combatere epididimita infecțioasă s-a redus considerabil, infecția cu *Brucella ovis* nu poate fi controlată cu maxim de eficiență datorită necunoașterii incidenței reale în rândul animalelor receptive;
- deși *Programul de supraveghere, profilaxie și combatere a bolilor la animale* prevede controale serologice sistematice, s-a constatat persistența focarelor de epididimită infecțioasă, în teritoriul analizat;
- s-au constatat eșecuri în eradicarea infecției cu *Brucella ovis* datorate în mare parte sensibilității și specificității insuficiente a diferitelor teste de screening și diagnostic, inconsecvenței aplicării măsurilor de profilaxie și combatere și nu în ultimul rând, existenței unor surse de infecție insuficient cunoscute care pot contribui la răspândirea bolii.
- lucrarea de față are ca obiective evidențierea unor aspecte privind metodele de diagnostic precum și epidemiologia bolii.

Teza are 161 pagini și este structurată, în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale: prima parte intitulată **„Stadiul cunoașterii”** cuprinde 45 pagini reprezentând 28 % din teză și partea a doua **„Cercetări proprii”**, reprezentând 55,3 % din teză. Lucrarea cuprinde 23 tabele și 67 de figuri (grafice, hărți și fotografii), pentru o mai bună prezentare a conținutului. Bibliografia consultată cuprinde 165 de titluri din literatura de specialitate autohtonă și străină.

Prima parte - „**Stadiul cunoașterii**”, cuprinde trei capitole, în care sunt prezentate succinct, informații din literatura de specialitate referitoare la subiectul tezei, date care au fost folosite pentru interpretarea și compararea rezultatelor obținute în partea a doua.

În primul capitol sunt prezentate date privind istoricul și taxonomia genului *Brucella* precum și caracterele morfologice, culturale, biochimice și de patogenitate ale brucelinelor.

În capitolul II „Implicațiile patogene ale speciei *Brucella ovis*” este descrisă, pe baza literaturii consultate, infecția cu *Brucella ovis*. S-a accentuat modul de transmitere a speciei *Brucella ovis* în cadrul efectivelor de ovine. S-au evidențiat caracterele morfologice și culturale ale speciei *Brucella ovis*, epidemiologia, patogeniza, tabloul clinic și morfopatologic, profilaxia și combaterea infecțiilor cu *Brucella ovis*.

Capitolul III cuprinde modalitățile de diagnostic a epididimitei infecțioase prin examen bacterioscopic și bacteriologic precum și diagnosticul serologic prin reacția de fixare a complementului și testul imunoenzimatic ELISA.

Partea a II-a „**Cercetări proprii**” cuprinde patru capitole, concluziile generale și bibliografia, în care sunt prezentate și discutate rezultatele investigațiilor efectuate.

În capitolul IV sunt prezentate cercetări epidemiologice privind infecția cu *Brucella ovis* în județul Vaslui. Investigațiile epidemiologice s-au efectuat în perioada 2000-2008. Studiul a fost efectuat pe efectivele de berbeci de reproducție din județ.

S-au prelucrat și valorificat o serie de date multianuale referitoare la evoluția epididimitei infecțioase în județul Vaslui. Prelucrarea datelor s-a efectuat prin diverse metode matematice, de la simpla medie aritmetică a unor șiruri multianuale, până la formule consacrate în aprecierea valorii intrinsece a testului alergic (sensibilitate, specificitate) și în stabilirea unor indici epidemiologici: prevalența și incidența bolii.

Astfel, în județul Vaslui, în perioada analizată, incidența maximă a bolii a fost de 155 cazuri (2,84 %) în anul 2002, cu un minim de 2 cazuri (0,03 %) în 2005. Prevalența anuală a infecției cu *Brucella ovis* a variat de la o valoare de 6 (0,10 %) în anul 2005, la o valoare de 157 (2,88 %) în anul 2002. Incidența cea mai mare a cazurilor depistate serologic a fost în anii 2002 (de 155 cazuri) și 2007 (de 137 cazuri), media multianuală a cazurilor de bruceloză la berbeci fiind de 82,66. Au fost depistate în 2007 în 22 localități (53,66 %) 137 cazuri de berbeci seropozitivi la RFC, localități situate în partea de Nord- Est a județului Vaslui.

Capitolul V, intitulat „Cercetări privind semnificația testelor bacteriologice și serologice în diagnosticul infecțiilor cu *Brucella ovis*” cuprinde rezultatele cercetărilor privind semnificația

testelor bacterioscopice și bacteriologice în diagnosticul infecției cu *Brucella ovis*, a investigațiilor serologice reprezentate de reacția de fixare a complementului și testul imunoenzimatic ELISA, precum și corelații ale rezultatelor acestor teste.

În subcapitolul 5.1. sunt prezentate rezultatele obținute în urma examenului bacterioscopic efectuat din secțiunile de organe și țesuturi din fiecare zonă în care au fost constatate congestii, infiltrații, cazeificări, densificări, prin amprente pe lame prin presare.

În perioada 2000–2008, s-au examinat bacterioscopic 234 probe. S-au depistat bacterii cocobacilare la un număr de 145 probe (61,97 %).

Preparatele au fost apoi uscate, fixate și colorate prin tehnici de colorare: metoda Stamp (Ziehl-Neelsen modificată) recomandată de O.I.E. și O.M.S. Microscopia directă corect efectuată a identificat, prin colorațiile amintite, cocobacili sau bacili mici, colorați în roșu intens, pe un fond verde-pal, respectiv, albastru, izolați sau în grupări diplo, adesea în grămezi mici, cu localizare intracelulară, mai ales în leucocitele polimorfonucleare.

Cultivarea brucelilor s-a evidențiat în subcapitolul 5.1. - „Examenul bacteriologic”. Examenul cultural a constat în pregătirea materialelor patologice și a mediilor de cultură, însămânțarea acestora, incubarea lor urmată de lecturarea și bacterioscopia culturilor.

Examenul cultural s-a efectuat la probe de testicule prelevate de la berbeci seropozitivi de la 234 cazuri. Culturile primare sau secundare obținute pe medii solide sau lichide au fost examinate în scopul identificării caracteristicilor de creștere ce pot conduce la tipizarea speciei de *Brucella*.

În mediile de cultură lichide, *Brucella ovis* produce o turbiditate redusă sau moderată, uniformă, cu depozit pulverulent și eventual inel la suprafață.

Pe mediile solide, după 48-72 ore, au apărut colonii rugoase, de tip R, cu aspect uscat, granular, de culoare galben-auriu, cu dimensiuni variabile (2- 4 mm diametru), la temperatura de 36-38°C, la un pH de aproximativ 7 și în atmosferă cu CO₂ (fig. 5.7- 5.12.).

La specia *Brucella ovis*, datorită lipsei antigenelor M (melitensis) și A (abortus), nu se observă tipul cultural S.

În subcapitolul 5.2 sunt prezentate rezultatele obținute în urma examenului serologic efectuat prin reacția de fixare a complementului. Studiul s-a efectuat pe efectivul de berbeci de reproducție din județ.

În perioada 2000-2008 s-au examinat 103194 probe seruri și s-au depistat un număr de 744 (0,72 %) berbeci serologic pozitivi, în timp ce la 125 probe (0,12 %) s-au înregistrat rezultate de anticomplementaritate.

Probele anticomplementare s-au reexaminat printr-un nou control la 21 de zile, la 12 (9,6 %) dintre ele s-au obținut rezultate pozitive iar la 21 probe (16,8 %) s-a menținut caracterul de anticomplementaritate.

De la animalele sacrificate (234) pentru stabilirea diagnosticului de bruceloză la berbeci (31,45 %), s-au trimis probe la laboratorul național de referință (testicule și epididim). În urma examenului bacteriologic, s-au confirmat 112 cazuri (47,86 %).

De asemenea, la R.F.C. au fost obținute un număr de 116 (0,11 %) probe cu reacție dubioasă (de ++).

Prin testul imunoenzimatic ELISA s-au examinat toate probele de sânge care au avut rezultat pozitiv și dubios în RFC, precum și alte probe de sânge provenite de la berbeci de reproducție.

În anul 2006 s-a obținut în urma examenului RFC rezultat pozitiv la 125 de probe, iar la un număr de 59 probe rezultatele au fost de anticomplementaritate. Urmare a acestor rezultate s-a efectuat testul ELISA la probele pozitive. Rezultatele obținute în urma efectuării testului ELISA au redus numărul animalelor pozitive de la 125 probe prin RFC la 80 probe (64,00 %) în timp ce rezultate dubioase s-au obținut la 24 probe (19,02 %), restul de 21 probe (16,80 %) fiind negative .

În anul 2007 s-au examinat prin testul imunoenzimatic ELISA 137 probe pozitive în RFC. Testul ELISA a dat rezultat pozitiv la un număr de 125 probe (91,24 %), 12 probe (8,76 %) fiind dubioase .

Testul imunoenzimatic ELISA s-a efectuat în 2008 pe 48 probe ser provenite de la berbeci serologic pozitivi în RFC. În urma testului s-au obținut 33 (68,75 %) probe pozitive, 8 (16,66 %) probe dubioase, restul fiind negative.

Din cele 310 probe ser berbeci reproducție cu rezultat pozitiv la RFC, testul imunoenzimatic a fost pozitiv la 238 probe (76,77 %), dubios la 44 probe (14,19 %) și negativ la 28 probe (9,03 %).

Un alt aspect cuprins în studiu este reprezentat de corelarea testelor de diagnostic în infecția cu *Brucella ovis*.

În perioada 2000-2008 au fost examinate serologic pentru infecția cu *Brucella ovis* – 103194 probe ser provenite de la berbeci reproducție, 744 (0,72 %) dintre acestea având rezultat pozitiv. Un număr de 310 probe de la berbecii seropozitivi s-au lucrat și prin testul imunoenzimatic ELISA, 238 (76,77 %) fiind pozitive și la acest test.

De la un număr de 234 berbecii seropozitivi la RFC s-au recoltat testiculele și epididimul după castrare sau sacrificare pentru examenele de laborator: anatomopatologic și bacterioscopic (efectuat în laboratorul județean) și bacteriologic (la laboratorul național de referință).

În studiu s-au utilizat probe provenite de la berbeci de reproducție din efective indemne și din efective contaminate.

În urma examenului serologic, s-au sacrificat 234 berbeci seropozitivi, suspecți de epididimită infecțioasă, pentru confirmarea diagnosticului. Dintre aceștia, 79 (33,76 %) au prezentat leziuni macroscopice caracteristice bolii. În urma examenului bacteriologic, boala s-a confirmat la 112 probe (47,86%).

Examenul anatomopatologic la 468 perechi de testicule a evidențiat leziuni de orhiepididimită la 18 perechi (3,85 %). Aceste leziuni au fost reprezentate de: abcese la capul sau coada epididimului, microabcese parenchimale, calcificări în parenchim, hipertrofie testiculară sau atrofii în epididim.

Făcând corelația între prezența leziunilor anatomopatologice specifice pentru epididimită și confirmările bacteriologice, au fost obținute următoarele rezultate: de la 18 eșantioane cu leziuni a fost izolate *Brucella ovis* în cultură pură pentru 12 probe (66,67 %); *Br. ovis* asociată cu *Arcanobacterium pyogenes* (*C. pyogenes*) din 3 probe (16,67 %); *A. pyogenes* la un eșantion (5,55 %) și la 2 probe (11,11 %), examenul bacteriologic a fost negativ.

Examenul bacteriologic efectuat pentru confirmarea infecției cu *Brucella ovis* a fost efectuat pe un număr de 234 probe testicule și epididim. Rezultatul acestui examen a arătat că orhiepididimita a fost cauzată de următoarele tipuri de bacterii:

- *Brucella ovis* : 47,86 %;
- *Brucella ovis* asociată cu *Arcanobacterium pyogenes* (*C. pyogenes*): 6, 42 %;
- *Arcanobacterium pyogenes* : (7,69 %).
- Alte specii bacteriene: (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp.): 10,68 %.

Având în vedere faptul că RFC este metoda standard de diagnostic pentru infecția cu *Brucella ovis* și comparând rezultatele examenului bacteriologic pe aceleași probe care au fost diagnosticate pozitiv în RFC, s-a constatat că între aceste două metode există o corelație pozitivă.

Corelația dintre examenul necropsic și examenul clinic, pe de o parte, și examenele serologice a fost negativă: doar 4,17 % din berbecii diagnosticați serologic pozitivi au prezentat leziuni epididimale specifice și modificări clinice .

Pentru a stabili valoarea testelor de screening utilizate în diagnosticul infecției cu *Brucella ovis* s-a calculat specificitatea și sensibilitatea acestora.

Astfel, reacție de fixare a complementului (RFC) este o metodă de diagnostic serologic sensibilă (67,07 %), dar insuficient specifică (48,09 %) datorită interferenței antigenice a *Brucellei ovis* cu alți germeni.

Studiul efectuat a demonstrat că testul ELISA are sensibilitate mai bună (80,00 %) decât RFC-ul (67,07 %).

Datorită existenței unui număr de 28 de seruri negative în ELISA și pozitive în RFC, combinația dintre aceste două teste ar putea da o sensibilitate mult mai ridicată.

Pentru a evita reacțiile fals pozitive la berbecii de mare valoare biologică și economică, este necesară efectuarea a cel puțin două metode diferite de diagnostic (RFC și ELISA sau RFC și examen bacteriologic și de material seminal).

Pentru asigurarea indemnității efectivelor de ovine împotriva orhiepizidimitei infecțioase trebuie respectat programul strategic național care specifică eliminarea prin sacrificare a berbecilor de reproducție serologic pozitivi.

Cel mai eficient instrument de diagnostic serologic al brucelozei nu poate fi decât o combinație a celor două teste, dar în niciun caz un singur test din cele prezentate în lucrare.

Capitolul VI, intitulat „Cercetări epidemiologice și clinice în infecțiile cu *Brucella ovis*” cuprinde studiul efectuat la berbecii seropozitivi la RFC în perioada 2000-2008. În urma examenului clinic, s-a constatat că la 348 (46,78 %) de berbeci seropozitivi au apărut modificări clinice de orhiepizidimită, ce au dus la suspiciunea unei infecții cu *Brucella ovis* iar la 396 berbeci (53,22 %) nu s-au depistat modificări la examenul clinic.

S-a demonstrat că există o corelație negativă între semnele clinice și rezultatul examenului serologic.

Acest studiu demonstrează importanța examenelor de supraveghere serologică anuală a berbecilor, înainte și după perioada de montă. În județ, infecția cu *Brucella ovis* a avut o largă răspândire și a apărut în sezonul de montă la berbeci și în perioada imediat următoare.

În perioada 2000-2008, efectivul de ovine din județ a avut în general o evoluție crescătoare, ajungând de la 222475 în 2000, la 272424 în 2008. În acest context, a crescut și numărul de berbeci de reproducție, de la 4836 în 2000, la 6382 în 2008, cu un maxim de 6700 în 2007, când de altfel s-au depistat prin examen clinic și sacrificat 117 berbeci în vederea confirmării diagnosticului de infecție cu *Brucella ovis*.

Examenele de supraveghere serologică la berbecii de reproducție s-au efectuat de 2 ori pe an, în perioada septembrie- noiembrie, înainte și după montă.

În ceea ce privește examinarea clinică, aceasta s-a efectuat prin observație și prin palpare. Au fost examinați berbecii care au reacționat serologic pozitiv la RFC precum și cei la care infecția s-a confirmat și au fost dirijați spre sacrificare. S-au sacrificat 234 berbeci, de la care s-au prelevat probe perechi care au constatat în testicule și epididim. O parte din aceste probe s-au lucrat la nivelul laboratorului județean, iar o parte s-au trimis la laboratorul național de referință pentru confirmare. Ca urmare a rezultatelor examenelor bacteriologice, infecția a fost confirmată la 112 cazuri.

S-au investigat clinic un număr de 744 berbeci reproducție cu rezultate pozitive la examenul de supraveghere a epididimitei infecțioase prin RFC.

În ceea ce privește strategia de supraveghere și control a infecțiilor cu *Brucella ovis* în județul Vaslui, se poate afirma că, sub raportul evoluției infecțiilor cu *Brucella ovis*, aceasta reprezintă o activitate importantă, în vederea menținerii indemnității efectivelor de ovine. De aceea, la nivel național, autoritatea veterinară centrală, cea abilitată să aprobe strategiile la nivel național, emite anual norme sanitare veterinare referitoare la modalitatea prin care se poate obține indemnitatea efectivelor de ovine. Conform normelor anuale, strategia de supraveghere și control al infecțiilor cu *Brucella ovis* este realizată, prin includerea ca și acțiune obligatorie, a supravegherii efectivelor de berbeci, așa cum este prevăzut în *Programul acțiunilor de supraveghere, prevenire, control și eradicare a bolilor la animale, a celor transmisibile de la animale la om, protecția animalelor și protecția mediului*, a altor acțiuni prevăzute în alte programe naționale.

Programul prevede ca în efectivele de ovine să nu se introducă animale nou achiziționate, decât dacă provin din efective indemne. La înșămânțarea artificială a oilor se va folosi numai material seminal controlat morfologic și bacteriologic, provenit de la berbeci siguri indemni și negativi la trei examene complexe. Se va evita contactul cu alte turme, direct sau prin intermediul padocurilor.

Este obligatoriu controlul serologic, prin RFC, a berbecilor de reproducție cu două săptămâni înainte și după sezonul de montă. De asemenea, este obligatoriu controlul serologic al infecțiilor brucelice la berbecii, țapii, oile și caprele de reproducție în cazurile de vânzare-cumpărare.

La noi în țară nu se practică imunizarea activă a animalelor contra infecției brucelice.

Confirmarea bolii prin examene complexe de laborator duce la asanarea efectivului.

În acest scop, toate animalele cu semne clinice de boală și cele serologic pozitive se elimină din efectiv. Eliminarea animalelor bolnave este urmată și de dezinfecții riguroase. Asanarea este considerată încheiată, când la două examene complexe (clinic și serologic), trimestriale nu se înregistrează cazuri pozitive.