

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE**

Chirilă COVALIU

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător științific,
Prof. Dr. Tudor Perianu**

- I A Ș I 2010 -

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE**

Chirilă COVALIU

**„INVESTIGAȚII PRIVIND SENSIBILITATEA ȘI
SPECIFICITATEA UNOR TESTE DE DIAGNOSTIC ÎN
TUBERCULOZA BOVINĂ”.**

**TEZĂ PENTRU OBTINEREA TITLULUI DE „DOCTOR ÎN ȘTIINȚE MEDICALE”
DOMENIUL „MEDICINĂ VETERINARĂ”**

Conducător științific,

Prof. Dr. Tudor Perianu,

- I A Ș I 2010 -

REZUMAT

Tuberculoza bovină constituie o piedică serioasă în dezvoltarea creșterii animalelor și o gravă amenințare pentru sănătatea publică. Aceasta a făcut ca problema supravegherii și controlului tuberculozei la animale, în general și a tuberculozei bovine în special, să constituie o preocupare din ce în ce mai atentă, atât pentru forurile conducătoare din sectorul agriculturii, cât și pentru serviciile veterinare de pe teren.

În trecut, datorită extensiei sale în masa populației și caracterului practic incurabil, tuberculoza a fost considerată secole de-a rândul drept un important pericol social, pentru care nu existau remedii suficiente.

În ultimii 70 de ani, deși au devenit disponibile mijloace și strategii de supraveghere și control a bolii, tuberculoza continuă să reprezinte, la scară mondială, o problemă gravă de sănătate comunitară. Date recente ale Organizației Mondiale a Sănătății arată că, în prezent, aproximativ o treime din populația lumii este infectată cu *Mycobacterium tuberculosis* și că anual se înregistrează circa nouă milioane de cazuri noi de îmbolnăvire.

În ciuda cercetărilor asidui, nu a fost încă descoperit un mijloc cu eficacitate absolută în prevenția bolii. Bacilul Calmette Guérin (BCG), o tulpină de *Mycobacterium bovis* atenuată, a fost folosit timp de peste 60 de ani și este capabil să confere o sensibilizare limfocitelor T și activarea macrofagelor, factor critic în imunitatea antituberculoasă. Anticorpii serici nu joacă un rol substanțial în răspunsul imun față de această boală, factorul critic al rezistenței fiind sensibilizarea limfocitelor T și activarea macrofagelor.

Bovinele reprezintă principalul rezervor de *Mycobacterium bovis* și pot transmite infecția la un număr mare de mamifere, printre care și omul. Acesta contractează infecția, mai ales, prin consumul de lapte crud și de produse lactate sau prin inhalatie.

Infecția cu bacili bovini la oameni se observă în special la personalul îngrijitor care trăiește în preajma animalelor bolnave și apoi la copiii care se hrănesc cu laptele nesterilizat termic al vacilor tuberculoase. Astfel, încă din anul 1933 Gervois în Franța, stabilea că din 17.045 cazuri de tuberculoză publicate 11,2% erau de origine bovină, iar Mulak (1962) în Polonia stabilește frecvența tuberculozei bovine de 17,5-19,2%. Dintre acestea, la copii frecvența era cuprinsă între 16 și 36% și chiar 41%.

Laptele este un aliment cu rol esențial în transmiterea infecției, deoarece constituie un mediu pentru menținerea bacililor în viață. Bogăția laptelui în *Mycobacterium bovis* este

proporțională cu gravitatea infecției animalului. Tot atât de periculoase ca și laptele, dacă nu mai periculoase, sunt produsele lactate (care provin din laptele nesterilizat termic). Unele din acestea cum sunt frișca și smântâna realizează, printr-un mecanism de flotație, conținuturi mari de bacili și constituie totodată medii în care bacili supraviețuiesc un timp foarte îndelungat. Deoarece produsele lactate nu se consumă pe loc, ci sunt comercializate, acestea devin un mijloc de răspândire la distanță a bolii

Această situație a făcut ca problema cunoașterii și a supravegherii tuberculozei la animale, în general și a tuberculozei bovine în special, să devină o preocupare din ce în ce mai atentă, atât pentru forurile conducătoare din sectorul agriculturii cât și pentru serviciile veterinare de pe teren. Combaterea bolilor transmisibile de la animale la om, printre care și tuberculoza produsă de *Mycobacterium bovis*, este prin excelență o problemă de igienă, dar și o problemă, care dovedește în același timp că igiena este unică, deoarece intertransmisibilitatea și reciprocitatea unor zoonoze, cum este și tuberculoza nu permit separarea din punct de vedere al profilaxiei între cele două „medicini” și impun cooperarea dintre ele. „Una sanitas, una medicina!” (Goret și Joubert, 1966).

Creșterea interesului mondial față de infecția cu *Mycobacterium bovis*, s-a datorat pericolului de transmitere a bolii la om și consecințelor nefaste asupra sănătății și productivității animalelor, și asupra comerțului cu animale de reproducție și de carne din zone unde agentul etiologic al tuberculozei este prezent (Rochat T., 1993).

Încă din secolul trecut Koch R. a intuit rolul vaccinal al unui contact anterior al organismului cu bacili tuberculoși. Mergând pe această linie de cercetare și încercând să găsească un remediu pentru bolnavii de tuberculoză, a preparat tuberculina, care deși nu a dat rezultatele terapeutice scontate, s-a dovedit un instrument foarte eficace pentru depistarea celor infectați.

Astăzi metoda standard de detectare a tuberculozei este testul tuberculinic, care se bazează pe interpretarea reacției locale apărute la animalele infectate în urma inoculării tuberculinei. Inițial s-a utilizat tuberculina preparată de Koch (numită în prezent : alt tuberculin koch sau old tuberculin). Ulterior, Seibert F., a realizat derivatul proteic purificat de tuberculină (PPD – Purified Protein Derivative) care a fost adoptat de experții OMS ca preparat de referință. Administrarea intradermică a PPD și citirea la 72 de ore (când se înregistrează intensitatea maximă a răspunsului specific) este considerată metoda cea mai fidelă de punere în

evidență a hipersensibilității întârziate, indusă de infecția naturală cu *Mycobacterium bovis*. Cu toate că testul de tuberculinare intradermică este utilizat pe scară largă pentru depistarea bovinelor cu tuberculoză, există date certe asupra sensibilității reduse a acestui test, înregistrându-se reacții fals negative sau reacții fals pozitive. Din această cauză, în ultimele decenii s-au făcut eforturi pentru îmbunătățirea mijloacelor de depistare a bovinelor infectate cu *Mycobacterium bovis*.

În acest context, testele imunologice se încadrează bine pentru cunoașterea modificărilor produse în urma infecției și diagnosticarea în timp util a tuberculozei, atât la animale cât și la om, ceea ce duce la o mai bună supraveghere și aplicare a măsurilor de supraveghere și control. Totodată, evaluarea comparativă a unor teste de diagnostic cu substrat imunologic la bovine ca și analiza epidemiologică minuțioasă pot conduce la elaborarea suportului științific pentru aplicarea unui program eficient de profilaxie și control a bolii. Recunoașterea sistemului imun ca un tot condiționează înțelegerea funcției normale sau a unor alterări ale uneia sau mai multor laturi din rețeaua complexă a imunității.

Având în vedere pe de o parte prezența bolii în efectivele de bovine cu importanța economică și sanitară, iar pe de altă parte multitudinea mijloacelor de depistare a infecției tuberculoase, ne-am propus să cercetăm evaluarea unor teste de diagnostic aflate în uz în România la bovine (testele intradermice, testul Bovigam), și estimarea eficienței unor tehnici, cum ar fi dozarea lizozimului și a imunoglobulinei G, comparativ cu metodele de diagnostic acreditate în diagnosticul infecției cu bacilii tuberculozei.

Lucrarea cuprinde 145 pagini, fiind redactată în X capitole și este structurată în două părți distincte. Prima parte (cap. I, cap. II și cap. III) sintetizează principalele date bibliografice din literatura de specialitate privitor la infecția tuberculoasă și constituie „**Stadiul actual al cunoașterii**”, iar partea a doua (cap. IV, V, VI, VII, VIII și IX) se referă la „**Cercetările proprii**”. Fiecare capitol din partea a 2-a a tezei, are în cuprins material și metodele de lucru, rezultatele obținute cu discutarea lor și concluzii parțiale.

În capitolul X sunt sintetizate în cele 23 de „**Concluzii finale**”, principalele aspecte desprinse în urma cercetărilor efectuate.

În lucrare sunt expuse 45 tabele, 18 figuri, iar bibliografia cuprinde 156 titluri.

Prima parte a lucrării, reprezintă o sinteză a literaturii referitoare la metodologia de diagnostic în tuberculoza bovină, cu accente asupra mecanismului etiopatogenetic, fiind trecute

în revistă aspecte referitoare la stadiul cunoașterii infecției cu *Mycobacterium bovis*. În capitolul I, intitulat „**Date bibliografice privind tuberculoza bovină**” sunt trecute în revistă aspecte legate de istoricul cunoștințelor despre tuberculoză, răspândirea bolii în plan național și internațional, ca și importanța economică și sanitară a bolii.

Al doilea capitol intitulat „**Implicațiile genului *Mycobacterium* în patologia animală**”, sintetizează principalele date din literatura de specialitate, privitor la taxonomie, morfologia și structura antigenică a agentului etiologic. Sunt prezentate particularitățile structurale și elementele de patogenitate ale speciei *Mycobacterium bovis*. De asemenea, sunt prezentate sursele de infecție, evidențiindu-se modul de contaminare și mecanismul patogenetic al infecției cu *Mycobacterium bovis*.

În capitolul III, intitulat „**Aspecte actuale în diagnosticul tuberculozei bovine**” sunt tratate aspecte referitoare la modalitățile de inițiere și de confirmare a diagnosticului. Se subliniază că, pentru un diagnostic de certitudine este necesară efectuarea unui complex de examene alergice, bacteriologice, seologice, histopatologice și biologice.

Lucrarea propriu – zisă abordează o tematică de actualitate, de un interes deosebit pentru patologia bovină, cu aspecte, în special de diagnostic mai puțin elucidate, motiv pentru care investigațiile privind evaluarea unor teste folosite în diagnosticul tuberculozei bovine și estimarea eficienței altora, comparativ cu metodele folosite în prezent, apar deosebit de interesante și necesare studiului.

Creșterea numărului de cazuri de infecție tuberculoasă la animale și apariția riscului de transmitere la om, ca și numărul mare de reacții fals pozitive, dar și fals negative, au impus îmbunătățirea metodologiei de supraveghere și control a tuberculozei bovine.

Tematica abordată reprezintă una de interes major nu numai în plan sanitar și sanitar veterinar ci și din punctul de vedere al factorilor sociali și politici decizionali responsabili de starea de sănătate a populației, incidența tuberculozei fiind în creștere.

Astfel, investigațiile privind prevalența tuberculozei bovine în județul Iași, în perioada 2000 - 2008 (Cap.V), au evidențiat că, din cele 1.412.694 bovine existente, un număr de 1.230.786 de animale au fost supuse testului unic de tuberculinare (TU), ceea ce reprezintă 80,04%.

Din cele 1.203.870 bovine supuse testului unic de tuberculinare, 2.126 (0,18%) bovine au reacționat pozitiv, iar 2.997 (0,25%) bovine au fost încadrate în grupa recontrol.

Testul comparativ simultan (TCS), efectuat la 4.914 bovine cu reacții pozitive și recontrol la testul unic de tuberculinare, a evidențiat reacții pozitive la 18 (0,36%) bovine, recontrol la 56 (1,14%) și negative la 4840 (98,5%) bovine.

Rezultatele investigațiilor obținute prin testele alergice intradermice, privind situația tuberculozei bovine din județ, în perioada 2000 - 2008, au fost finalizate prin confirmarea/infirmarea bolii în urma examenelor de laborator după sacrificare. Datele obținute au permis stabilirea unei sensibilități a testului alergic de 78,37%, o specificitate de 96,78%, și o prevalență reală a bolii de 0,0018%.

Examenul serologic efectuat la 205 probe prin testul Bovigam, a evidențiat reacții pozitive la 17 (8,26%) bovine, recontrol la 9 (4,37%) și negative la 182 (87,37%) .

Din cele 25 de bovine cu reacții pozitive la testul comparativ simultan și la testul Bovigam, sacrificate în abator, la 4 (16%) s-a confirmat infecția tuberculoasă, iar la 21 (84%) s-a infirmat, examenul fiind negativ.

Rezultatele obținute prin aplicarea testelor intradermice (TU și TCS), au demonstrat fluctuațiile clasice, care au la bază pe de o parte reacția de hipersensibilizare de tip IV reală, iar pe de altă parte, erorile posibile de interpretare datorate reacțiilor para - sau pseudoalergice, ceea ce susține necesitatea diagnosticării tuberculozei pe baza unui set de teste, care să fie corelate și a căror date coroborate să faciliteze diagnosticul, reducând incidența cazurilor fals pozitive.

Valorile obținute în urma “dozării gammainterferonului la diferite categorii de bovine tuberculino-reagente” (Cap.VI), încadrate în funcție de testul intradermic, sunt în general mai mari la categoriile TU și TCS pozitive, față de celelalte categorii. De asemenea, se observă un răspuns mai intens la stimularea cu PPD bovin comparativ cu stimularea cu PPD aviar, la aceleași categorii, cu o inversare a situației în cazul categoriilor TU dubios și respectiv TCS recontrol, în care răspunsul la stimularea cu PPD aviar este însă doar ceva mai intens decât la cea cu PPD bovin, și o aproximativă egalitate a răspunsului la ambele tuberculine în cazul categoriei TCS negative.

De asemenea, urmărind valorile obținute, se poate constata că diferențe foarte mari la citirea testului intradermic la tuberculina bovină cum sunt mediile de peste 7 mm pot să fie reflectate sau nu în valorile testului Bovigam. Este desigur posibilă aici intervenția unor alte cauze care determină asemenea rezultate, cum sunt parazitozele cronice (de ex. Linguatuloza)

care nu cedează la tratamentele antiparazitare.

La toate categoriile, altele decât cea pozitivă, se constată că valorile densităților optice pentru testul Bovigam se mențin sub 0,150 în medie.

Dacă se examinează valorile individuale și nu cele medii, se observă că în alte categorii decât cea pozitivă se regăsesc valori peste limita medie menționată anterior. Analizând datele oferite de testul BOVIGAM, se constată că rezultatele nu sunt satisfăcătoare. Aceasta, este susținută de negativarea prin Bovigam a unor animale reacționate pozitiv la testul cutanat sau pozitivarea altora, în categoria dubios prin TU, negativ prin TCS.

Din acest motiv, se pare că, acest test (BOVIGAM) costisitor și laborios, pare a fi mai util pentru supraveghere, acolo unde există cazuri izolate de boală, nu și pentru diagnosticarea certă a bolii respectiv eliminarea animalelor reagente. Din această cauză, testul Bovigam are mai curând valoare de diagnostic de grup decât de diagnostic individual.

Analiza coeficienților de corelație obținuți (Cap.VII) sugerează o lipsă de corelație ($r=0,034$) între testul **tuberculinic intradermic pozitiv** și rezultatele la **testul Bovigam**, dacă ele sunt pozitive, respectiv o slabă corelație în sens pozitiv ($r = 0,14$) dacă acestea sunt negative, în cazul stimulării cu tuberculină bovină.

Corelațiile stabilite între testul tuberculinic intradermic pozitiv și testul Bovigam, indiferent dacă rezultatele acestuia sunt pozitive sau negative prezintă valori apropiate ($r = 0,68$; $r = 0,65$) pentru stimularea cu tuberculină aviară. Semnificația lor este $p < 0,001$, iar variația intens direct proporțională..

În cazul categoriei **TCS recontrol** pentru ambele tuberculine corelația negativă indică proporționalitate inversă ($p < 0,001$). Pentru această categorie cele două șiruri de valori pot să ajungă la limite inferioare nedecelabile prin testele respective (de ex. valori foarte mari la TCS și foarte mici la Bovigam și invers), subliniat de rezultat negativ la Bovigam în prezența reacției TCS. Din punct de vedere al acestei categorii, pentru clarificarea diagnosticului este utilă efectuarea ambelor teste.

Între cele două teste în cadrul categoriei **TCS negative-Bovigam negative**, corelația este negativă, de intensitate slabă spre mijlocie pentru tipul aviar de tuberculină ($r = - 0,29$) și respectiv **pozitivă**, de intensitate **mijlocie** ($r = 0,44$) pentru **tipul bovin** de tuberculină. Sensul negativ al corelației în cazul cuplului **TU pozitiv-Bovigam negative** reflectă dependența invers proporțională a rezultatelor obținute prin cele două teste.

Se pare că în cazul animalelor **TU dubios**, **Bovigamul** depistează totuși cu maximă precizie animalele pozitive ($r = 1$; $p < 0,001$).

În cazul testului Bovigam, se pare că acesta este mai bine corelat cu testul comparativ simultan la animalele cu sensibilitate nespecifică, respectiv cu reacții la tuberculina aviară, atât în cazul rezultatului pozitiv cât și a celui negativ la acest test, cu toate că în cazul testului unic corelația pentru animalele hipersensibilizate este inversă.

În concluzie, se poate spune că nu pentru toate perechile de șiruri, variația lui **r** urmează același tipic și dacă se pune problema posibilității de înlocuire a testelor intradermice cu testul Bovigam trebuie efectuate investigații suplimentare pe efective mai mari în scopul eliminării erorii de probă.

De asemenea, se poate aprecia că prin coroborarea rezultatelor testelor alergice cu rezultatele testelor complementare tuberculinării s-ar constitui un suport mai rațional și mai fidel în ceea ce privește decizia de a îndruma la sacrificarea în abator a unui animal reagent la tuberculină, decât testele alergice privite la modul singular.

Analiza comparativă a valorilor concentrațiilor IgG la cele două categorii de animale investigate (subcap.8.1), evidențiază că media lotului reacționat la testarea cutanată este crescută față de cea a lotului sănătos, indemn la tuberculoză. Cu toate acestea, valoarea lui **p** (**$p < 0,228$**) nu relevă semnificația statistică a diferențelor.

De asemenea, din analiza rezultatelor obținute se observa că la bovinele sănătoase concentrația imunoglobulinelor G circulante este mai redusă decât la cele cu reacții la tuberculinare. După cum se cunoaște, baza protecției immune în tuberculoză este reprezentată de activitatea sistemului celular de protecție specifică. Totuși, monitorizarea reactivității umorale specifice indică o creștere a concentrației IgG, respectiv o stimulare a reacției umorale de protecție, fără a fi fost definită specificitatea acestor molecule. Valorile determinate în cazul imunoglobulinei G se corelează cu rezultatele testului comparativ simultan, pentru categoriile pozitiv și recontrol, sugerând utilizarea testului pentru diagnosticul alternativ

Din cercetările privind „estimarea valorii lizozimului la animalele hipersensibilizate” (subcap.8.2.), rezultă că, în cazul animalelor tuberculino-reagente crește concentrația lizozimului seric comparativ cu animalele sănătoase, areactive, probabil datorită prezenței în circulația organismelor infectate a unor celule secretoare (neutrofile, macrofage) cu activitate

intensificată.

Cu toate că diferența dintre cele două loturi de animale (sănătoase și tuberculino-reagente) nu este semnificativă, se constată o deviere considerabilă de la normal a concentrației lizozimului în cazul bovinelor reacționate pozitiv la testul tuberculinic.

Rezultatele obținute sugerează posibilitatea utilizării testului difuzimetric ca test complementar în diagnosticarea bolii și stabilirea corelației dintre valorile lizozimului și cele ale testului tuberculinic