

REZUMAT

Importanța bolilor produse de micoplasme crește pe zi ce trece, deoarece micoplasmozele aviare sunt infecții cu caracter persistent cronic, răspândite peste tot în lume. La păsări, infecțiile micoplasmice rămân una dintre cele mai frecvente cauze ale unor pierderi economice majore, datorate scăderii indicilor de productivitate: spor mediu zilnic, consum specific de furaje, vârsta de tăiere, procent de ouat, procent de ecloziune, necesitând pentru combaterea acestora aplicarea unor tratamente costisitoare.

Teza de doctorat cu titlul „**Cercetări privind răspunsul imun în Micoplasmoza respiratorie aviară**” este extinsă pe 192 pagini și este formată, în conformitate cu prevederile legale actuale, din două părți principale: prima parte intitulată „*Stadiul actual al cunoașterii*” elaborată pe parcursul a 49 de pagini, 6 tabele și 13 de figuri, iar partea a doua „*Contribuții personale*” cuprinzând 113 pagini, 31 de tabele, 47 de figuri, pentru o mai bună prezentare a cuprinsului.

Prima parte este alcătuită din patru capitole, în care sunt prezentate succint, informații din literatura de specialitate referitoare la subiectul tezei, care au fost folosite ulterior pentru interpretarea și compararea datelor obținute în partea a doua.

Primul capitol, intitulat „*Date bibliografice privind istoricul, răspândirea și importanța Micoplasmozei respiratorii aviare*”, prezintă date din literatura de specialitate referitoare la primele descrieri ale bolii și ale agentului etiologic, la răspândirea și importanța acestei boli. Micoplasmoza respiratorie aviară (M.R.A.), cunoscută în trecut sub numele de boală respiratorie cronică (B.R.C.), este o boală infecțioasă care afectează găinile, curcile, fazanii, bibilicile, prepelițele, păunii. A fost descrisă pentru prima dată în S.U.A de Delaplane în 1943, agentul cauzal fiind identificat ca microorganism din grupul PPLO în 1952 de către Markham și Wong. În țara noastră, boala s-a diagnosticat prima dată în 1958, după importul de pui din Canada.

Al doilea capitol, intitulat „*Date bibliografice privind etiologia, epidemiologia și patogenеза în Micoplasmoza respiratorie aviară*” este structurat în patru subcapitole, sintetizând principalele date din literatura de specialitate referitoare la natura agentului etiologic, organizarea genomică a *Mycoplasmei gallisepticum*, proteinele și enzimele acesteia, fiind descris rolul fiecăreia, receptorii și țintele celulare ale *Mycoplasmei gallisepticum*, criterii și principii de

clasificare taxonomică a micoplasmelor. În cel de-al doilea subcapitol sunt prezentate sursele de infecție, evidențiindu-se modul de transmitere și factorii favorizanți ai apariției bolii, rezistența la factorii fizico - chimici. În subcapitolul trei este descrisă patogeniza bolii, iar în subcapitolul patru este prezentat răspunsul imun celular și umoral în infecția cu micoplasme și factorii care influențează imunitatea antimicoplasmică.

Capitolul trei al primei părți intitulat „ *Date bibliografice privind aspectele clinice, morfopatologice și histopatologice în Micoplasmoza respiratorie aviară* ” tratează aspecte referitoare la simptomele și leziunile produse în infecțiile cu *Mycoplasma gallisepticum*.

Evoluția și manifestările clinice sunt în funcție de vârstă, de localizarea procesului inflamator și de infecțiile secundare, în general complicații cu *Echerichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Haemophillus spp.*

În cazul transmiterii infecției pe verticală prin ou, primele semne de boală apar încă din prima zi de ecloziune. Puii prezintă într-o primă fază jetaj seros, apoi seromucos, mucos, mucopurulent. Tusea și strănutul sunt prezente, de asemenea și raluri umede la nivelul traheei și pulmonilor. Respirația se face cu ciocul întredeschis sau deschis. Apar sinuzite infraorbitale, cu caracter exudativ.

Începând cu vârsta de 25-30 de zile tabloul clinic se complică, puii strănută, tușesc, prezintă sinuzite de diferite intensități, conjunctivite, apetitul scade, sunt lipsiți de vioiciune, stau mai mult în decubit, apărând astfel plăgi decubitale la nivel sternal, jaretele sunt roșii, inflamate, dureroase.

După vârsta de 3 luni, când boala poate apare numai datorită transmiterii pe cale aerogenă sau prin contact direct, simptomele scad în intensitate față de tineret, boala având o evoluție nespecifică. La găinile adulte rase grele, boala evoluează cronic. Se poate întâlni sporadic, sindromul de coriză. În schimb, se înregistrează scăderi ale principalelor indicatori: producție de ouă, procent de ecloziune, mortalitate la puii obținuți, pui neviabili. Pot să apară ouă moi în coajă, ouă mici ca dimensiune, deformate și ouă cu suprafața cojii rugoasă. În schimb, găinile adulte rase ușoare nu fac boala clinic manifestă, dar reprezintă o sursă importantă de infecție pentru rasele grele.

Modificările anatomopatologice sunt variabile, după vârsta păsărilor și stadiul de evoluție al bolii. În faza inițială a bolii se întâlnește rinită și sinuzită seroasă, uneori și laringită seroasă sau serohemoragică. La acestea se adaugă ulterior leziunile traheei. În sacii aerieni se găsesc mase fibrinoase sau cazeoase, de regulă conglomerate de aspectul „jumărilor de ouă” care îi pot bloca total sau parțial. De asemenea, se pot întâlni dopuri fibrino-cazeoase ce blochează respirația păsărilor, aflate, de regulă, la bifurcația traheei.

În formele avansate de boală, mai ales când se adaugă și intervenția altor germeni – cu precădere *Escherichia coli* - se observă o inflamație fibrinoasă sau fibrino-caleoasă a majorității seroaselor din cavitatea toraco-abdominală, îndeosebi pericardică, epicardică, cu aderențe fibrinoase între pericard și epicard, perihepatită și aerosaculită.

Pentru puicute, menționăm prezența frecventă a unor salpingite pseudomembranoase în care exudatul fibrinos se elimină sub forma unui pseudoconcrement la începutul ouatului. Este o leziune de mare importanță epizootologică, fiindcă demască existența infecției în unitate.

Examenul histologic relevă hiperplazia glandelor mucoasei nazale, care le conferă un aspect tubular, aspect care poate fi observat și la nivelul epiteliului traheal. La nivelul mucoasei traheale se constată infiltrare limfoidă și hiperplazia glandelor mucoasei, încât acestea iau aspect de amforă.

Ultimul capitol al primei părți intitulat, ***„Diagnosticul, profilaxia și combaterea în Micoplasmoza respiratorie aviară”***, tratează aspecte referitoare la metodele de diagnostic utilizate pentru confirmarea bolii, dar și aspecte legate de principalele măsuri de profilaxie și combatere. Prevenirea și combaterea bolii se realizează prin: respectarea măsurilor de biosecuritate obligatorii; aplicarea programelor de imunoprofilaxie, corelate cu situația epidemiologică a fiecărei unități de creștere a păsărilor în parte; monitorizarea serologică a tuturor categoriilor de păsări (reproducție, selecție, broiler) ; medicație de elecție aplicată curativ.

Capitolul V prezintă scopul și obiectivele tezei de doctorat.

Capitolul VI intitulat „ ***Cercetări privind evoluția Micoplasmozei aviare la efectivele dintr-o unitate cu creștere intensivă*** ” prezintă materialele și metodele utilizate în perioada 2000 – 2001 pentru monitorizarea micoplasmozei în fermele de păsări ale S.C.AGRICOLA INTERNAȚIONAL S.A BACĂU, perioadă în care efectivele de reproducție nu erau imunizate contra micoplasmozei precum și rezultatele obținute în urma imunizării acestora cu vaccin inactivat Mipravec Avis, în perioada ianuarie –decembrie 2002.

Au fost efectuate 5685 examene anatomopatologice pe cadavre din 10 serii diferite de pui broiler proveniți din efective de reproducție nevaccinate, din care 4886 prezentau leziuni de micoplasmoză, reprezentând 86%. Procentul de pierderi prin mortalitate /serie este cuprins între 12-15%. Au fost testate serologic 338 probe de sânge din care 264 au fost seropozitive, reprezentând 78%.

După imunizare au fost efectuate 4781 examene anatomopatologice pe cadavre din 10 serii diferite de pui broiler din care 3442 prezentau leziuni de micoplasmoză, reprezentând 72%. Procentul de pierderi prin mortalitate/serie a scăzut, dar cu doar 3% acesta fiind cuprins între 9-12%. Au fost testate serologic 470 probe de sânge din care 330 au fost înalt seropozitive,

reprezentând 70%. Analiza acestor rezultate relevă faptul că, incidența micoplasmozei era destul de mare în efectivele de păsări nevaccinate. După imunizarea acestora cu vaccin inactivat procentul de pierderi prin mortalitate s-a redus, dar doar cu 3%, iar cauzele pierderilor prin mortalitate erau date tot de micoplasmoză, incidența bolii scăzând cu doar 12%, menținându-se la 72%.

În capitolul VII intitulat, „*Cercetări privind căile de administrare și vârsta optimă de vaccinare contra Micoplasmozei aviare*” sunt prezentate pe parcursul a trei subcapitole materialele și metodele necesare imunizării efectivelor de reproducție rase grele Ross 308 contra micoplasmozei cu vaccin viu Nobilis MG 6/85 precum și rezultatele obținute. Au fost cercetate 4 căi diferite de administrare a vaccinului: ocular, oculonazal, oculonazal-aerosoli, aerosoli, la diferite vârste. Acest studiu a fost efectuat timp de 6 ani, perioada 2003-2009. În urma cercetărilor efectuate, cea mai eficientă cale de administrare a vaccinare este prin aerosoli, ambele vaccinări, vârsta optimă de vaccinare în condiții de risc crescut de contaminare cu tulpini sălbatice de teren fiind de 14 zile. Vaccinul Nobilis MG 6/85 induce un răspuns imun celular. Așadar, sistemul imunitar al păsărilor vaccinate nu produce anticorpi antimicoplasma. Se poate face astfel diferența între o pasăre contaminată care are anticorpi și una necontaminată. Au fost efectuate studii ale răspunsului imun în efective de pui broiler obținuți din părinți vaccinați care vor fi prezentate în capitolul IX. După 6 serii vaccinate consecutiv, în perioada 2003-2006 din care ultimile trei serii vaccinate numai prin aerosoli începând cu vârsta de 14 zile, nu la 6 săptămâni (42 de zile) așa cum recomandă producătorul vaccinului, am obținut rezultatul propus: efective de reproducție rase grele - efectivele matcă și pui broiler fără leziuni de micoplasmă și liberi de anticorpi antimicoplasma.

Capitolul VIII intitulat, „*Cercetări privind statusul imun în Micoplasmoza aviară, înainte și după vaccinarea cu vaccin viu Nobilis MG 6/85*” prezintă pe parcursul a trei subcapitole programele de testare privind statusul imun în micoplasmoză și rezultatele obținute în screening-ul serologic efectuat în fermele de reproducție, la 11 serii de părinți rase grele, care au fost imunizate în mod diferit, așa cum sunt prezentate în capitolul VII. A fost utilizată metoda de seroaglutinare rapidă pe lamă și testul imunoenzimatic Elisa. La toate seriile au fost efectuate testări la vârsta de o zi, 14, 28-44, 70, 90 -100, 130 de zile și la găini adulte la vârste diferite. S-au recoltat câte 10 probe de sânge /hală, atât la femele cât și la masculi. Toate probele de sânge testate la vârsta de o zi și la 14 zile în număr de 2640 au fost negative. Nu au avut anticorpi antimicoplasma. Deci, tineretul de reproducție nu era contaminat până la această vârstă. La vârsta de 40 de zile, înainte de vaccinare cu o zi, au fost recoltate și testate un număr de 360 de probe, provenite de la primele 3 serii (S1-S3) vaccinate ocular, oculonazal, oculonazal-aerosoli la

41 de zile. La 57 din acestea au fost detectați anticorpi antimicoplasma, reprezentând 16% din probe. Aceste păsări au fost pozitive la toate testările serologice până la încheierea ciclului de ouat. Au transmis micoplasma prin ou, iar broilerul provenit din aceste efective matcă a fost infectat, rezultatele studiilor clinice, anatomopatologice, serologice și de performanțe tehnologice sunt prezentate în capitolul IX și X. La următoarele 2 serii (S4-S5), vaccinate numai prin aerosoli la vârsta de 14 zile procentul de păsări pozitive a scăzut la 3%. Din 240 de probe testate serologic 8 au fost pozitive. La seriile 6-11, nu au fost detectați anticorpi antimicoplasma. Toate cele 720 de teste elisa efectuate au fost negative. S-au menținut negative până la încheierea ciclului de ouat.

În capitolul IX, denumit „*Cercetări privind stabilitatea tulpinii vaccinale și răspunsul imun al progenilor obținuți din părinți rase grele ross 308, vaccinați cu vaccin viu Nobilis MG 6/85*” prezentăm pe parcursul a trei subcapitole, cercetările efectuate pentru determinarea stabilității tulpinii vaccinale MG 6/85 și rezultatele răspunsului imun al progenilor obținuți din matcă vaccinată. Pentru determinarea stabilității tulpinii vaccinale, am vaccinat 36500 pui de găină părinți, cu vaccin Nobilis MG 6/85. După intrarea în ouat a găinilor, au fost recoltate ouă care s-au introdus la incubat.

Au fost prelevate probe din ouăle embrionate -de pe suprafața internă a membranei viteline; din sacii aerieni, din faringe, trahee –tampoane traheale de la embrionii morți rămași în coajă și pui neviabili; exudate din aspirația sinusurilor infraorbitale, cavitatea nazală și saci aerieni de la puii broiler de 20 de zile precum și 50 de probe de sânge pentru detectarea anticorpilor anti*Mycoplasma* de la de pui de o zi. Probele au fost lucrate în Institutul Pasteur, Departamentul de cercetare –Laboratorul de biologie moleculară și serologie București și în Laboratoire D’Analyses de biologie veterinaire et de L’Environnement –Bio Chene Vert Franța. Au fost efectuate examene bacteriologice prin cultivarea pe medii specifice pentru izolare *Mycoplasma gallisepticum* –bulion de bază PPLO și agar purificat pentru micoplasme.

Culturile au fost declarate negative după 20 de zile de la însămânțare.

De asemenea au fost examinate prin tehnica PCR - metodă de detecție a ADN-ului bacterian, din țesuturile și secrețiile recoltate pentru analiză prezentate anterior. Rezultatul este negativ la toate probele analizate.

Au fost efectuate și examene serologice prin Elisa pentru detectarea anticorpilor anti*Mycoplasma* la puii de o zi, din stația de incubație. Rezultatul a fost negativ pentru toate cele 50 de probe lucrate.

Concluzia care se desprinde după efectuarea acestor teste este că, tulpina vaccinală vie MG 6/85 nu se transmite pe verticală prin ou; este un vaccin sigur care se poate aplica fără

rezerve și la rasele grele – părinți de reproducție, nu numai la rasele ușoare și hibrizi ouători. Răspunsul imun al progenilor obținut din matcă vaccinată evidențiază faptul că vaccinarea numai prin aerosoli a părinților, înainte de contaminarea cu tulpini sălbatice poate conduce într-un interval de 2-3 ani cu respectarea măsurilor de biosecuritate, la efective libere de *Micoplasma gallisepticum*.

Capitolul X intitulat „**Cercetări privind starea de sănătate și performanțele tehnice ale progenilor obținuți din părinți rase grele ross 308 vaccinați contra micoplasmozei respiratorii aviare**” conține informații referitoare la rezultatele obținute la puii de carne. Puii broiler obținuți din S6- S11 au atins în sfârșit ținta stabilită de noi: sunt pui fără sindroame respiratorii datorate micoplasmozei. Tratamentele contra micoplasmozei aviare s-au scos atât din fermele de părinți cât și din fermele de creștere a broilerului.

Pentru monitorizarea situației anatomopatologice a progenilor au fost efectuate 1950 de necropsii. Principalele leziuni întâlnite au fost: aerosaculită fibrinocazeoasă dopuri fibrinoase sau fibrinocazeoase situate la nivelul traeei și ramificația bronhiilor, opacifieri ale sacilor aerieni, poliserozite. Procentul de pierderi prin mortalitate a scăzut de la 12% cât era la puii obținuți din S1, la 2% la puii obținuți din S6. Incidența leziunilor specifice datorate micoplasmozei au scăzut de la 65% la puii din S1 la 0 la puii proveniți din S6.

Performanțele tehnice obținute sunt: reducerea procentului de confiscate în abator de la 3.5 % la 0; procentul de ecloziune în stațiile de incubatie s-a îmbunătățit cu 4% ajungând de la 84-85% la 89%, costurile cu medicația în broiler erau de 5% din totalul cheltuielilor /kg viu. După a șasea serie vaccinată acestea nu se mai fac. A rămas costul cu vaccinarea părinților, care este de 0.2% din totalul cheltuielilor. Consumul specific de furaj a scăzut de la 2.025 kg/kg viu, la 1.8kg/kg viu. Greutatea corporală a puilor la o zi este cu 10-15g mai mare față de puii proveniți din seria 1. (40-45g față de 30-32g). Situația financiară a fost vizibil îmbunătățită, costul de producție /kg viu scăzând de la 350 lei /kg viu la 320 lei /kg viu.

Aceste rezultate au fost obținute din anul 2007, după a șasea serie de părinți vaccinată cu vaccin viu Nobilis MG 6/85, respectiv a 3a serie de părinți vaccinată consecutiv prin aerosoli până în anul 2009 luna mai, când au fost încheiate cercetările.

În capitolul XI sunt prezentate concluziile finale, în număr de 22, care au fost obținute după o lungă perioadă de cercetare extinsă pe parcursul a 10 ani.