

REZUMAT

La 14 mai 1796 Edward Jener, un medic de țară englez din Gloucestershire, administrează primul vaccin din lume unui copil de opt ani, pe nume James Phipps care era bolnav de variolă și astfel s-a născut primul vaccin uman și prima imunizare eficientă.

Prima descoperire majoră a lui Pasteur în domeniul imunizării a avut loc în anul 1879 și este legată de *holera aviară*, el observând că prin pasaje repetate bacteriile își pierd patogenitatea și inoculând aceste culturi la păsări a creat imunitate contra bacteriei sălbatice. Studiile ulterioare dezvoltate de Pasteur în domeniul vaccinologiei s-au bazat pe acest principiu.

La ora actuală imunizarea se practică la scară mondială pentru o multitudine de maladii prevenind anual 2,5 milioane de decese la toate grupele de vârstă, însă tot se înregistrează peste 1,3 milioane decese la nou-născuți, mai ales în zonele sărace de pe Terra. În prezent, mai mult de 80 de vaccinuri candidate sunt în ultimele faze de studii clinice iar aproximativ 30 dintre acestea sunt destinate să confere protecție împotriva bolilor importante pentru care nu există încă un vaccin înregistrat, cum ar fi febra Dengue sau malaria.

Rabia este o zoonoză gravă, răspândită pe toate continentele cu excepția Antarcticii, ea fiind întâlnită în peste 150 de țări și teritorii. În lume, mor anual din cauza rabiei mai mult de 55000 de persoane iar 40% dintre acestea sunt copii sub 15 ani. Sursa principală de boală în 99% din cazurile de rabie umană este câinele. Anual, peste 15 milioane de persoane primesc tratament specific după ce au fost mușcate iar acest lucru previne alte 327000 de decese.

De la Pasteur și până în prezent tehnologiile de producere a vaccinurilor antirabice au evoluat enorm odată cu beneficiile oferite de dezvoltarea biotehnologiilor. Pentru imunizarea antirabică a animalelor domestice se utilizează vaccinuri inactivate. Aceste vaccinuri au grade diferite de puritate și există posibilitatea să apară accidente postvaccinale de tip neurologic provocate fie de prezența particulei virale întregi, fie de inactivarea incompletă sau de adjuvanții utilizați.

Pentru a înlătura aceste neajunsuri s-au efectuat cercetări și s-au testat vaccinuri subunitare, ce nu utilizează particula virală întreagă precum și vaccinuri ce utilizează doar genomul viral sau vaccinuri recombinante. Toate aceste noi tipuri de vaccinuri s-au dovedit a fi, cel puțin la nivel de cercetare, o alternativă plauzibilă la vaccinurile clasice.

Mai mult, pe fondul crizei economice globale care trenează de ceva timp este nevoie de vaccinuri care să aibă un cost de producție cât mai redus dar care să rezolve și vechile probleme legate de accidentele postvaccinale. Pentru a realiza acest deziderat s-a recurs la producerea și testarea de vaccinuri vectoriale obținute prin tehnologia ADN-recombinant.

Adenovirusurile prezintă anumite proprietăți importante pentru întrebuințarea lor în terapie genică, mai ales datorită spectrului de gazdă foarte larg, ele fiind capabile să infecteze o paletă largă de tipuri celulare, neintegrându-se în genomul celulelor infectate. Din aceste motive adenovirusurile au fost folosite pentru transferul genelor „*in vivo*”, au fost elaborați diverși vectori adenovirali ce încorporează diferite gene de interes (B-gal, OTC, citokine, etc.).

Adenovirusurile de origine animală sunt incapabile să se propage în celulele umane pe care au fost testate, descoperindu-se că aceste tipuri de adenovirusuri nu sunt transcomplementare, eliminându-se astfel riscul de recombinare și de propagare „*in vivo*”.

Cel mai adesea, în cercetare, sunt utilizate trunchiurile standardizate de origine canină de tip CAV-2, cum sunt Manhattan sau A26/61 (ATCC VR-800). În general, secvența de ADN heterolog ce urmează a fi atașată de CAV-2 poate fi reprezentată de: gene ce codifică produși proteici, gene ce codifică o mutantă a unei proteine celulare, enzime, derivate sangvine, limfocite, interleukine, factori de creștere, neurotransmițători sau precursorii lor și diverse peptide antigenice. Scopul principal este acela de a obține compuși farmaceutici recombiinați ce pot fi formulați în vederea administrării pe cale topică, orală sau parenterală.

În această lucrare științifică sunt prezentate cercetări ce au constatat în oferirea unei alternative la vaccinurile antirabice clasice și anume elaborarea și construirea unui vaccin antirabic obținut prin tehnologia ADN recombinant ce utilizează ca vector adenovirusul canin de tip 2 iar ca și transgenă de interes glicoproteina G a virusului rabic. Acest produs inovator a fost testat la trei specii de animale domestice și anume la pisicile domestice, la suinele hibrid Landrace-Marele Alb-Pietrain și la caii de rentă iar rezultatele obținute au fost încurajatoare.

Teza de doctorat cu titlul „*Cercetări privind utilizarea vectorului adenoviral CAV-2 în*

imunoprofilaxia unor boli infecțioase” se întinde pe 237 de pagini și conform normativelor aflate în vigoare la ora actuală ea este constituită din două părți principale și anume: prima parte intitulată „*Stadiul actual al cunoașterii*” care cuprinde 48 de pagini, 10 tabele și șapte figuri și partea a doua intitulată „*Contribuții personale*”, extinsă pe 137 de pagini, 46 de tabele și 73 de figuri.

„*Stadiul actual al cunoașterii*” cuprinde trei capitole în care sunt expuse succint informații din literatura de specialitate cu referire la subiectul tezei de doctorat și care au fost utilizate ulterior pentru interpretarea și compararea datelor obținute în partea de „*Contribuții personale*”.

Primul capitol, intitulat „*Aspecte bibliografice cu privire la adenovirusul canin de tip 2 (CAV-2)*” este structurat în cinci subcapitole și sintetizează informațiile din literatura de specialitate cu privire la structura capsidului adenovirusului de origine canină CAV-2, organizarea genomului viral și metodele de relaționare cu celula gazdă. Acest capitol tratează și utilizarea CAV-2 ca vector în vaccinologie și terapie genică.

Capitolul intitulat „*Virusul rabic și imunoprofilaxia rabiei la animale*” tratează în primul său subcapitol etiologia rabiei, descriind aspecte legate de morfologia particulei virale, compoziția chimică a acesteia, proteinele virale și organizarea genomului, după încadrarea taxonomică conform Comitetului Internațional de Taxonomie Virală (ICTV) din 2009. Ultimul subcapitol tratează imunoprofilaxia în rabie, cu pornire de la perioada de pionierat în imunizarea rabică când, în anul 1884, Pasteur împreună cu E. Roux și Ch. Chamberland au dezvoltat primul vaccin antirabic la animale, folosind o tulpină de virus rabic de vacă cu patogenitatea atenuată iar imunoprofilaxia în rabie la om s-a născut luni, 6 iulie 1885, atunci când la Pasteur a venit un copil de nouă ani, din Alsacia, pe nume Joseph Meister care fusese mușcat pe 4 iulie de un câine turbat.

Apoi sunt sintetizate informațiile cu privire la imunizarea antirabică în perioada contemporană, începând cu primele generații de vaccinuri preparate din țesut nervos de animal adult, cele preparate pe ouă embrionate sau pe țesut nervos de animal sugar, continuând mai apoi cu vaccinurile antirabice produse în culturi celulare și încheind cu a treia generație de vaccinuri antirabice constituită din vaccinurile obținute pe culturi celulare heteroploide de tipul liniei Vero. Ultima parte a acestui subcapitol tratează perspectivele actuale în imunizarea antirabică, ce

urmăresc producerea de vaccinuri la costuri reduse dar care să nu mai provoace accidente postvaccinale așa cum a fost cazul vaccinurilor ce utilizează particula virală întreagă.

După ce în primele două capitole au fost prezentate informații bibliografice cu privire la vectorul vaccinal (CAV-2) și gena de interes (glicoproteina G a virusului rabic), în capitolul III, intitulat „**Tehnologia ADN-recombinant**”, este prezentată tehnologia ce a fost uzitată pentru producerea unui vaccin antirabic vectorial. Pentru început au fost menționate unele repere în această tehnologie după care au fost prezentate elementele utilizate și etapele dezvoltării unui produs prin această tehnică.

Partea de „**Contribuții personale**” debutează cu capitolul IV intitulat „**Elaborarea și construirea unui nou vaccin antirabic recombinant bazat pe vectorul adenoviral CAV-2**”. În acest capitol s-a recurs la alegerea, producția și purificarea unor antigene recombinante cu potențial vaccinal împotriva rabiei, care au dus la construirea și producția de vectori adenovirali de tip CAV-2, capabili să exprime noile antigene imunogene.

Acest deziderat a fost realizat în mai multe etape distincte utilizând tehnici de biologie moleculară caracteristice tehnologiei ADN recombinant. Inițial s-a construit vectorul utilizând clonajul molecular și s-a făcut recombinarea omologă cu scopul de a obține o plasmidă care să conțină vectorul adenoviral canin de tip CAV 2, ce are integrată transgenă de interes (glicoproteina G rabică/GFP), cu ajutorul kitului de transformare DHCα produs de Invitrogen. Prin transfecție s-a reușit introducerea vectorul recombinat CAV-G pe linia celulară canină DK-cré utilizând două kituri de transfecție diferite și anume Lipofectamine de la Invitrogen și jetPrime de la PolyPlus Transfection. Pentru fiecare kit de transfecție s-au utilizat două concentrații diferite de ADN (3μg și 5μg) și s-a observat după 48-72 ore, utilizând microscopul cu fluorescență Olympus U-RFL-T, apariția expresiei tranzitorii GFP. După 48 de ore de la transfecție, utilizând microscopul optic clasic, s-a putut observa apariția efectului citopatic caracteristic infecțiilor adenovirale. Între cele două metode de transfecție utilizate nu s-au remarcat diferențe majore din punct de vedere al efectului citopatogen, însă diferențe privind intensitatea ECP au fost remarcate între cele două concentrații de ADN utilizate pentru transfecție.

Consecutiv transfecției liniei celulare canine DKCré, a fost caracterizat vectorul vaccinal recombinant, după care s-a trecut la producția acestuia în sistem bioreactor.

După procesul de amplificare a vectorului recombinat CAV-G/GFP s-a recurs la purificarea particulelor obținute eliminând artefactele apărute și simultan s-a efectuat și o verificare a stabilității vectorilor obținuți utilizând metoda cu CsCl. Deoarece metoda de purificare prezintă unele inconveniente, s-a efectuat dializa volumului de vector obținut după purificarea cu CsCl, cu ajutorul coloanelor Amersham PD10 de la GE Healthcare și a fost recuperată o cantitate de 1,5 ml de virus CAV-G purificat și dializat.

Titrul particulelor infecțioase aflate în suspensie în $TCID_{50}/ml$ a fost de $10 \times 10^{8,6}$ în urma utilizării formulei matematice elaborate în anul 1939 de către Reed și Muench. În urma titrării prin intermediul RT PCR s-a stabilit că 2 μl de virus reprezintă o concentrație de $10^{10,4}$ particule infecțioase. Ținând cont de factorul de diluție, de masa moleculară de $2,3 \times 10^7$ Da a adenovirusului și de faptul că proteinele reprezintă 87% din masa totală a virusului CAV 2, s-a obținut la DO_{260} o concentrație de virus recombinat CAV-G de $1,1 \times 10^{12}$, valoare ce corespunde și tulpinii virale sălbatice de CAV 2.

În capitolul V denumit „*Testarea vaccinului antirabic ce utilizează vectorul viu CAV-2 replicativ și non-replicativ la pisicile domestice*” s-a efectuat o evaluare experimentală a proprietăților imunogene induse de glicoproteina G a virusului rabic la pisicile domestice și s-a verificat intensitatea răspunsului dat de organismul animalelor supuse testării la vectorului inoculat (CAV replicativ și non-replicativ).

În experiment s-au utilizat 20 de pisici domestice (11 masculi și nouă femele ce au vârste cuprinse între un an și patru ani, având o greutate corporală ce variază de la un kilogram la patru kilograme) care au fost repartizate în 10 grupe cu câte două pisici/grup. Opt grupe de pisici au fost vaccinate cu vectorul vaccinal CAV-G (grupele 1-4 au primit câte o doză de CAV-G⁺ în concentrații de la $10^4 TCID_{50}/ml$ la $10^7 TCID_{50}/ml$ iar grupele 5-8 au primit câte o doză de CAV-G⁰ în concentrații de la $10^5 TCID_{50}/ml$ la $10^8 TCID_{50}/ml$), grupul 9 (pisicile 17 și 18) au fost imunizate cu vaccinul antirabic inactivat Nobivac Rabies de la Intervet iar ultimul grup (pisicile 19 și 20) nu au fost vaccinate antirabic (Control negativ). După 200 de zile de la prima vaccinare s-a recurs la revaccinarea pisicilor din primele opt grupuri (pisicile 1-16) folosind același tip de vaccin și aceeași posologie.

Rezultatele obținute la examenul serologic utilizând testul ELISA Platelia Rabies II după prima vaccinare antirabică au arătat că la sfârșitul experimentului sunt protejate de virusul

sălbatic doar pisicile din grupurile vaccinate cu dozele cele mai mari de vector CAV-G replicativ sau non-replicativ și anume pisicile 7 și 8 ce au primit o concentrație de $10^7 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ CAV-G⁺ și pisicile 15 și 16 ce au primit o concentrație de vector de $10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ CAV-G⁰. Prin comparație, se observă că răspunsul umoral specific în S₈ este mai intens la grupul de pisici domestice vaccinate cu produsul comercial Nobivac Rabies decât la grupele de feline domestice vaccinate cu vectorul CAV-2.

Rezultatele obținute la examenul serologic folosind testului ELISA anti-CAV-2 au indicat titrurile cele mai crescute la animalele imunizate cu cele mai mari concentrații de vector vaccinal, ceea ce arată că vectorul utilizat a rămas stabil după administrarea intramusculară la felinele domestice.

În urma efectuării testului de seroneutralizare virală pentru CAV-2, se observă un răspuns mai puternic la pisicile vaccinate cu vector vaccinal defectiv pentru replicare iar una dintre explicații ar fi aceea legată de concentrația mai mare de vector R⁰ ($10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ comparativ cu $10^7 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$).

Rezultatele obținute după vaccinarea de rapel la 200 de zile au arătat că, în ansamblu, revaccinarea cu același tip de vector vaccinal, respectând aceeași posologie, duce la o imunizare mai puternică comparativ cu o singură administrare și poate reprezenta pe viitor o soluție viabilă în imunizarea antirabică a felinelelor domestice, rezultatele actuale fiind promițătoare.

În capitolul VI intitulat „*Testarea vectorului adenoviral CAV-2 în imunoprofilaxia rabiei la ecvine*” s-a testat eficacitatea vaccinului antirabic obținut prin tehnologia ADN recombinat la ecvinele crescute în condiții proprii animalelor de rentă.

În acest experiment s-au utilizat 11 ecvine (șase masculi și cinci femele) cu vârste cuprinse între un an și 10 ani, ce au fost împărțite în trei loturi: lotul I (caii 1-5) a primit vaccinul recombinat replicativ antirabic CAV-G în doză de 4 ml, ce are o concentrație de $10^9 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ și care s-a administrat i.m. în două puncte separate în musculatura cervicală, lotul II (calul 6) a servit ca martor negativ în experiment iar lotul III (caii 7-11) a fost imunizat cu preparatul comercial Nobivac Rabies de la Intervet. Probele s-au recoltat săptămânal, timp de șapte săptămâni, după care ultima recoltare s-a efectuat în ziua 112 de la debutul experimentului.

În urma dozării unor markeri biochimici (ASAT, ALAT, albumină serică, creatinină, proteine totale) timp de 14 zile de la debutul experimentului, s-a constatat că vectorul vaccinal

CAV-G ce are o concentrație de $10^9 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, odată administrat intramuscular la ecvinele ce au vârste cuprinse între 1-10 ani nu manifestă acțiune citotoxică.

Conform rezultatelor obținute în urma utilizării testului ELISA Platelia Rabies II pe probele de ser recoltate la 112 zile (S_{16}) de la administrarea celor două tipuri de vaccinuri antirabice, niciunul dintre animalele testate nu dezvoltă un răspuns umoral specific la un nivel care să-i asigure protecția împotriva virusului sălbatic (0.5 U.I./ml) dar cu toate acestea se observă că ecvinele vaccinate cu preparatul imunologic CAV-G⁺ au o rată a seroconversiei specifice mult mai ridicată comparativ cu cele imunizate cu preparatul comercial Nobivac Rabies.

O metodă complementară reacției ELISA Platelia Rabies II usum veterinarum utilizată în acest experiment a fost testul de seroneutralizare virală ce a fost efectuat în cadrul Laboratorului de rabie și pentru faună sălbatică de la Nancy (Franța), care este centru colaborator al Organizației Mondiale a Sănătății ce furnizează o expertiză științifică asupra metodelor de control în rabie la animale. Acest laborator este atât laborator național de referință al Franței pentru rabie dar și laborator de referință al OIE pentru rabie și participă activ la dezvoltarea și standardizarea metodelor de diagnostic.

În cazul efectuării testului de seroneutralizare virală se remarcă apariția unui nivel ce asigură protecție antirabică (0.5 UI/ml) încă din ziua 28 a experimentului dar care scade sub limita de protecție la sfârșitul experimentului. Dacă se compară cele două tipuri de vaccinuri utilizate se poate remarca faptul că grupul de cai ce a primit $10^9 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ de CAV-G dezvoltă un răspuns mai puternic comparativ cu grupul vaccinat cu produsul Nobivac Rabies, lucru confirmat și în urma utilizării testului ELISA Platelia.

Pentru a putea evalua activitatea efectorilor imunității celulare s-a recurs la o metodă serologică cantitativă ce decelează nivelul de $\text{IFN}\gamma$ din serul ecvinelor vaccinate antirabic folosind cele două tipuri de preparate imunologice, știut fiind faptul că $\text{IFN}\gamma$ sunt markeri ai imunității celulare. Însă rezultatele au arătat că nivelul seric de $\text{IFN}\gamma$ rămâne constant pe durata efectuării cercetărilor, el variind în limite restrânse de la 1 pg/ml până la 1000 pg/ml . Așadar, se poate afirma în urma experimentului de față că nivelul de $\text{IFN}\gamma$ nu se modifică în urma inoculării unui vaccin antirabic inactivat sau a unui vaccin obținut prin tehnologia ADN recombinat și care folosește ca vector adenovirusul canin de tip 2 (CAV-2).

S-a evaluat calitatea răspunsului specific umoral anti-CAV-2 utilizând testul de seroneutralizare virală pentru a arăta cinetica răspunsului anti-adenoviral care a fost dezvoltată de lotul de ecvine vaccinat cu astfel de vector, confirmând sau infirmând eficacitatea unui astfel de vector atunci când el este utilizat la ecvine. Rezultatele obținute au arătat o cinetică ascendentă pentru anticorpii anti-CAV-2 începând chiar cu ziua 14 post-administrare, ceea ce demonstrează faptul ca vectorul a pătruns în organismul gazdă la care a fost inoculat unde s-a multiplicat și a transmis mesajul genetic, însă acesta din urmă a fost de intensitate subliminală.

În urma cercetărilor efectuate în acest experiment, vaccinarea antirabică a cailor fie cu un produs comercial așa cum e cazul preparatului Nobivac Rabies, fie cu vectorul vaccinal CAV-G nu asigură protecție contra virusului sălbatic, în urma unei singure administrări, dar vectorul CAV-2 poate fi utilizat cu succes în alte aplicații biomedicale, dovadă fiind titrurilor ridicate obținute la testul de virus-neutralizare.

Cea mai complexă cercetare din lucrarea de față este prezentată în capitolul VII denumit „*Testarea vectorului adenoviral CAV-2 în imunoprofilaxia rabiei la suine*”, în care s-a verificat imunogenitatea și calitatea răspunsului imun umoral și celular în urma administrării vectorului adenoviral vaccinal CAV-2 ce exprimă glicoproteina G a virusului rabic la suine.

În acest experiment s-au utilizat 11 purci metiși Landrace-Marele Alb-Pietrain (șase masculi și cinci femele, în vârstă de opt săptămâni), care au fost împărțiți în trei loturi și anume: lotul I (porcii 1-5) a fost imunizat cu vaccin recombinat replicativ antirabic CAV-G în doză de 2 ml, având o concentrație de $10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, ce a fost administrat i.m. în două puncte separate în mușchii fesieri; lotul II (porcii 6-10) a fost imunizat cu vaccinul comercial antirabic inactivat Nobivac Rabies în doză de 1 ml, având o concentrație de 2 U.I./ml, ce a fost administrat i.m. în mușchii fesieri într-un singur punct (T^+) iar lotul III (porcul 11) a fost folosit ca martor negativ. Recoltarea probelor s-a făcut săptămânal timp de 56 de zile (S_0 - S_8).

În urma evaluării și dozării unor parametri clinici, hematologici și biochimici se poate afirma că administrarea pe cale intramusculară a $10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ de vector CAV-G la porcii hibrizi Landrace-Marele Alb-Pietrain nu manifestă acțiune citotoxică asupra acestora, aspect deosebit de important în continuarea cercetărilor.

În prima parte a acestui capitol s-a efectuat o evaluare cantitativă a răspunsului antirabic umoral prin intermediul testului ELISA Platelia Rabies II și a reacției de seroneutralizare virală.

Rezultatele furnizate de testul ELISA Platelia Rabies II au arătat că porcii care au fost vaccinați antirabic cu ajutorul vaccinului recombinat replicativ au avut în S_8 rata de seroconversie cea mai ridicată (2-4 U.I./ml), în timp ce porcii care au fost imunizați antirabic utilizând vaccinul comercial inactivat au determinat în S_8 un răspuns imun umoral specific nesatisfăcător și incomparabil mai mic (0,25-0,125 U.I./ml).

Rezultatele obținute la testul de seroneutralizare efectuat în cadrul laboratorului de la Nancy (Franța) au fost asemănătoare cu cele obținute la testul ELISA Platelia Rabies II, doar cu o amplitudine puțin mai redusă, seroneutralizarea fiind, totuși o metodă în care cuantificarea se face mai precis decât la tehnica ELISA unde se uzează de valorile DO_{450} citite la sfârșitul reacției.

În continuare, pentru a identifica, cuantifica și interpreta anticorpilor anti-CAV-2 s-a utilizat testul de virus neutralizare care conferă rezultate specifice și de o înaltă sensibilitate. Intensitatea răspunsului umoral anti-CAV-2 este direct proporțională cu intensitatea nivelului umoral antirabic, pe toată durata experimentului.

Datorită faptului că vectorul CAV-2 este stabil și nu se dezintegrează în organismul gazdă, apare un răspuns umoral specific din partea gazdei care duce la o sinteză de anticorpi specifici pentru vector dar și pentru transgena de interes, ce asigură protecție antirabică la animalele supuse testului. Faptul că nu se decelează anticorpi anti-CAV-2 în serurile recoltate de la grupul de porci vaccinat cu Nobivac Rabies sau de la martor ne indică faptul că porcii supuși experimentului nu sunt purtători de adenovirus canin sau de alt tip de adenovirus care ar putea da reacții încrucișate.

În ultima parte a acestui capitol s-a efectuat o evaluare și cuantificare a răspunsului imun mediat celular prin intermediul testului ELISpot și în urma utilizării platformei Luminex.

Testul ELISpot a fost validat după raportarea la factorii intrinseci și s-a efectuat în ziua 14, 21, 28 și 42 a experimentului. De menționat este faptul că atunci când se folosește tehnica ELISpot se utilizează niște stimulânți celulari care sunt compatibili cu structura antigenului utilizat (vaccinul CAV-G și vaccinul inactivat Nobivac Rabies). Astfel, între cele două vaccinuri există o omologie la nivel de glicoproteina G care are aceeași structură antigenică, ea fiind comună ambelor produse utilizate. Stimulanții clasici într-un astfel de test sunt reprezentați de peptidele antigenice specifice, însă din cauza faptului că transgena de interes-glicoproteina G a

virusului rabic este foarte lungă (~500 aa.) iar peptidele omoloage acestuia ar trebui să fie foarte multe, utilizarea acestora a fost aproape imposibilă.

De asemenea, dacă ne referim la epitopii imunologice, nu există cercetări la porcii care au fost utilizați în acest experiment (am utilizat porci proveniți de la o îngrășătorie și nu animale cu origine cunoscută din linii speciale, "*pathogen free*" sau consangvini de diferite grade). Dacă ar fi epitopi caracterizați la acest tip de porc atunci s-ar fi putut achiziționa peptide individuale corespunzătoare acestuia, dar cum acestea nu există atunci nu s-a realizat acest deziderat.

O alternativă la utilizarea de peptide în stimularea antigenică este utilizarea vectorului. Odată animalul imunizat, celulele sale T vor recunoaște, consecutiv unei stimulări "*in vitro*", respectiv în testul ELISpot, antigenul inițial.

În urma testării prin metoda ELISpot, porcii hibridi de Landrace-Marele Alb-Pietrain supuși experimentului au dat rezultate satisfăcătoare, ceea ce denotă o amplificare a nivelului de IFN γ , deci un răspuns din partea imunității specifice mediate celular.

La suine citokinele joacă un rol important în modularea proceselor fiziologice și imunologice pentru menținerea homeostaziei. În acest scop s-a recurs la dozarea unor citokine prin intermediul tehnicii Luminex pentru a observa dacă apar variații ale acestor citokine după administrarea celor două vaccinuri sau dacă cinetica acestor compuși diferă în funcție de tipul de vaccin administrat. Prin urmare, s-a efectuat dozajul IFN γ , IL10, IL4, IL6 și IL8 utilizând serul sangvin recoltat săptămânal de la porcii supuși experimentului.

Dacă se analizează în ansamblu nivelul de citokine la grupul de porci ce au fost inoculați cu câte 2 ml de vector CAV-G, ce are o concentrație de 10^8 TCID $_{50}$ /ml, se observă că pe durata desfășurării experimentului nivelul IFN γ , IL10 și cel al IL4 se păstrează relativ constant. În cazul IL6 se observă un nivel crescut în ziua 0 după care acesta scade treptat ajungând la un nivel constant în zilele 28 și 42 din experiment. Asemănător în cazul IL8 se observă o creștere peste medie în ziua 14 după care nivelul scade treptat.

Un nivel constant de citokine înregistrat la lotul de porci vaccinați cu vectorul CAV-G este explicabil prin faptul că mecanismul prin care se determină apariția anticorpilor antirabici specifici este diferit, vectorul pătrunzând direct în celula gazdă unde trimite mesajul genetic care va genera sinteza de anticorpi.

Dacă analizăm nivelurile citokinelor la lotul de porci imunizat cu preparatul Nobivac pe

toată durata experimentului putem observa că nivelul citokinelor dozate este mai crescut în ziua 14 comparativ cu restul perioadelor analizate.

Dacă acest preparat imunogen ar fi determinat un răspuns antirabic puternic care să asigure protecție contra virusului sălbatic, atunci cu siguranță că nivelurile de citokine ar fi fost mult mai mari și cu o anumită tendință clară, însă în lipsa instalării unei imunități protectoare se constată doar un nivel mai crescut la 14 zile post-administrare care mai apoi scade. Dacă se compară dozarea citokinelor cu răspunsul antirabic umoral atunci se observă aceeași tendință, cu un vârf slab, lipsit de amplitudine, în ziua 14 urmat de o evoluție descendentă până la sfârșitul experimentului.

Ca în orice lucrare cu caracter științific, ultimul capitol este cel de „**Concluzii și recomandări**” în care sunt prezentate sintetic un număr de 24 de concluzii și recomandări ce se desprind din lucrarea de față.

***Cuvinte cheie:* CAV-2, rabie, vaccin, ADN recombinant, imunitate**