



REZUMAT

Cuvinte-cheie: calicivirus felin, herpesvirus felin, pisici, tractus respirator anterior.

La noi în țară literatura de specialitate nu a semnalat date cu privire la cercetări științifice care să vizeze caliciviroza felinei. Acest aspect coroborat cu importanța bolii la pisici, precum și cu faptul că tot mai mulți oameni aleg pisica ca și animal de companie a reprezentat motivația acestei teze de doctorat, intitulată „Cercetări privind caliciviroza felinei”.

Importanța calicivirozei feline este conferită de incidența mare, de ușurința cu care se transmite virusul și de faptul că boala se asociază de multe ori cu herpesviroza felină sau cu infecții bacteriene ale sistemului respirator.

Lucrarea conține 211 pagini, fiind structurată conform uzanțelor în două părți: prima parte (45 pagini) și partea a doua (113 pagini), la care se adaugă cuprinsul, introducerea, rezumatul și bibliografia tezei de doctorat.

Prima parte „Stadiul cunoașterii” este structurată în 4 capitole care sintetizează principalele date din literatura de specialitate cu privire la caliciviroza felinei. Datele prezentate sunt susținute de 2 tabele și 13 figuri.

Partea a doua „Cercetări proprii” este sistematizată în 7 capitole care prezintă scopul, obiectivele și cadrul cercetărilor, rezultatele investigațiilor privind infecțiile virale ale tractusului respirator anterior la pisici, materialele și metodele de lucru utilizate, interpretarea rezultatelor, concluziile și recomandările studiilor realizate. Datele obținute sunt consemnate în 10 tabele și ilustrate în 65 figuri.

Pentru documentarea științifică s-au utilizat 193 titluri bibliografice din literatura națională și internațională.

Bolile tractusului respirator anterior reprezintă o importantă și recurentă problemă pentru medicii veterinari și proprietarii de pisici la nivel mondial, iar calicivirusul și herpesvirusul felin au fost descriși ca fiind una dintre cauzele primare ale infecțiilor.



Astfel s-a pornit la elaborarea unor studii și cercetări privind caliciviroza felină la pisici, scopul tezei fiind de a stabili: prezența și prevalența infecției cu calicivirus felin; particularitățile epidemiologice, clinice și morfopatologice în caliciviroza felină; corelația dintre caliciviroza și herpesviroza felină; factorii de risc în infecția cu calicivirus felin; un protocol de diagnostic virusologic și serologic în caliciviroza felină.

În vederea îndeplinirii scopului tezei s-a întreprins o anchetă epidemiologică descriptivă pe teritoriul județului Iași, în perioada 1 ianuarie 2010 – 1 iunie 2013. Investigațiile au presupus observații periodice, colectarea și prelucrarea de date, recoltarea de probe biologice și efectuarea examenelor de laborator.

Studiul descriptiv observațional privind caliciviroza felină la pisici s-a realizat pe teritoriul județului Iași în cadrul Clinicii Medicale și a Clinicii de Boli Infecțioase ale Facultății de Medicină Veterinară, în cadrul cabinetelor veterinare și a asociațiilor de protecție a animalelor, precum și în cadrul coloniilor de pisici din preajma așezărilor umane.

Testele virusologice și serologice de laborator s-au efectuat în cadrul Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală din București.

„Complexul bolilor respiratorii ale felinelor” implică o varietate de agenți patogeni, calicivirusul felin și herpesvirusul felin tip 1 fiind considerate a fi virusurile responsabile pentru cele mai multe cazuri, fiind urmate de infecțiile bacteriene ale sistemului respirator.

Pentru a stabili raportul cu care sunt implicate cele două virusuri în apariția infecțiilor tractusului respirator anterior la pisici s-au efectuat investigații față de ambele virusuri.

Pe parcursul studiului au fost examinate clinic 598 pisici domestice (*Felis catus*). De la 102 pisici s-au prelevat 247 probe biologice în scopul determinărilor de laborator.

Dintre cele 102 pisici supuse investigațiilor, 6 pisici au murit pe parcursul anchetei epidemiologice.

Prelevarea probelor s-a efectuat de la pisici de apartament, pisici aflate în libertate sub formă de colonii și pisici din cadrul asociațiilor de protecție a animalelor. S-au recoltat probe biologice de la pisici cu semne clinice ce pot fi atribuite infecțiilor cu calicivirus felin și/sau herpesvirus felin, precum și de la pisici clinic sănătoase, pentru a determina eventuala stare de purtător de virus a acestora.

De la pisicile cu semne clinice s-au prelevat secreții orofaringiene, nazale, conjunctivale și sânge, iar la pisicile clinic sănătoase probele au constat în tampoane orofaringiene și sânge.

De la cele 6 cadavre provenite de la pisicile supuse studiului s-au recoltat organe (pulmoni, tonsile, limbă, ficat, intestine și rinichi).

Diagnosticul infecției cu calicivirus felin și/sau cu herpesvirus felin tip 1 s-a realizat prin tehnica de izolare a virusurilor pe culturi celulare. Confirmarea identității virusurilor izolate s-a obținut prin testele de determinare specifică a genomului viral (testul real-time RT-PCR și testul real-time PCR).

Infecția cu calicivirus felin a fost prezentă la pisicile supuse studiului, indiferent de locul de proveniență a acestora (pisici de apartament, pisici aflate în libertate sub formă de colonii sau pisici din cadrul asociațiilor de protecție a animalelor).

O rată scăzută a cazurilor de caliciviroză felină s-a constatat la pisicile de apartament (18,92%), în timp ce la pisicile din cadrul asociațiilor de protecție a animalelor și la pisicile aflate în libertate sub formă de colonii s-a observat o prevalență ridicată a infecției (28,12%, respectiv 33,33%), fapt care demonstrează că prevalența infecției cu calicivirus felin variază în funcție de numărul de animale care populează același habitat.

Un alt aspect privind epidemiologia calicivirozei feline la pisici s-a constatat în cadrul anchetei. Dintre cele 27 pisici care au prezentat infecție cu calicivirus felin, 4 pisoi au fost importați dintr-o țară învecinată (trei pisoi de rasă Persană, cu vârsta de două luni și 15 zile, proveniți de la aceeași mamă; o pisică de rasă Albastru de Rusia, cu vârsta de două luni), existând riscul ca virusul să fie transmis direct sau indirect de la animalele infectate acut la cele sensibile. Datele înregistrate relevă faptul că transportul peste graniță al pisicilor, indiferent de scop, poate juca un rol important în epidemiologia calicivirozei feline mai ales atunci când nu sunt respectate toate condițiile legale impuse în asemenea cazuri.

Factorii de risc în caliciviroza felină au fost reprezentați de neaplicarea măsurilor de imunoprofilaxie (96% dintre cazuri au provenit de la pisici nevaccinate) și colectivitate (74% dintre cazuri au provenit din cadrul coloniilor sau a asociațiilor de protecție a animalelor, acolo unde pisicile trăiesc în grupuri mari iar componența lor este instabilă).

Sensibilitatea față de infecția cu calicivirus felin a fost ridicată la pisicile cu vârsta de până la un an (52% dintre cazuri), iar vârsta de până la trei luni poate fi un factor de risc în caliciviroza felină (4 pisoi cu caliciviroză felină și un pisoi cu coinfecția calicivirus-herpesvirus felin au murit pe perioada anchetei epidemiologice).

Nu s-a constatat o predispoziție la infecția cu calicivirus felin în funcție de factorul sex (56% masculi, 44% femele) și factorul rasă (59% rasa Europeană, 19% rasa Siameză, 11% rasa Persană, 7% rasa Birmaneză și 4% rasa Albastru de Rusia; s-a luat în considerație faptul că rasa Europeană este cea mai răspândită rasă de pisici).

Datele anamnetice au descris faptul că dintre pisicile cu caliciviroză felină, 25 pisici au prezentat manifestări clinice, în timp ce două feline nu au evidențiat semne clinice la data consultației, respectiv data prelevării probelor. Acest fapt demonstrează că în caliciviroza felină pisicile sunt purtători asimptomatici și eliminatori de virus.

Ulcerele au reprezentat principala manifestare anatomo-clinică prezentă la pisicile cu caliciviroză felină, cu localizare în special pe fața antero-dorsală a limbii (66,67%), mai rar la nivelul palatului dur (4%) și a nasului (4%).

Semnele clinice frecvente în caliciviroza felină la pisici au fost exprimate prin: secreții oculare și nazale (62,96%, respectiv 48,15%), apatie (59,26%), inapetență (51,85%), febră (40,74%), strănut (25,93%) și dispnee (25,93%). Mai rar ($\leq 14,81\%$) s-au întâlnit manifestări clinice ca: hipersalivație, halitoză, tuse, diaree, anorexie, cherato-conjunctivită și gingivostomatită.

Nu a fost identificată artrita acută, tip de evoluție clinică care produce sindromul de șchiopătare la pisoi infectați cu calicivirus felin.

Aspectele lezionale corelate cu tabloul clinic au evidențiat o incidență crescută a ulcerelor linguale în cazul pisicilor care au prezentat infecția cu calicivirus felin (80%). Leziunile macroscopice întâlnite la pisicile cu caliciviroză felină au fost exprimate și prin: pneumonie interstițială (40%), traheo-bronșită catarală (20%), rinită catarală (20%), precum și prin enterită catarală (80%), leziune mai rar descrisă de literatura de specialitate ca fiind asociată cu infecția cu calicivirus felin la pisici. Pneumonia interstițială s-a exprimat histologic prin: hiperplazia învelișului alveolar; hiperplazie limfohistiocitară; infiltrație celulară cu limfocite, celule plasmatică și macrofage la nivelul septelor alveolare.

La pisicile supuse studiului s-a întâlnit și **infecția cu herpesvirus felin tip 1**. O rată scăzută a cazurilor de herpesviroză felină s-a constatat la pisicile de apartament (13,51%), în timp ce la pisicile aflate în libertate sub formă de colonii și la pisicile din cadrul asociațiilor de protecție a animalelor s-a observat o prevalență ridicată a infecției (27,27%, respectiv 31,25%).

Principalele manifestări clinice prezente la pisicile cu herpesviroză felină au fost reprezentate de semne nazale (75%) asociate cu semne oculare (54,17%). Semnele nazale au fost descrise prin secreții sero-mucoase și muco-purulente, abundente și continue. Semnele oculare au constat în secreții sero-mucoase și muco-purulente, abundente, precum și conjunctivită seroasă, sero-mucoasă, muco-purulentă și purulentă.



Semnele clinice frecvente în herpesviroza felină la pisici au fost exprimate prin: strănut (54,17%), inapetență (41,67%), apatie (41,67%), febră (33,33%) și dispnee (29,17%). Mai rar ($\leq 12,5\%$) s-au întâlnit manifestări anatomo-clinice ca: tuse, cheratită, cherato-conjunctivită, simblefarom, anorexie, prostrație, uveită, fotofobie, ulcere nazale, ulcere linguale, disfagie, diaree.

La pisicile supuse studiului nu a fost identificată prezența ulcerelor corneene, semne anatomo-clinice caracteristice infecției cu herpesvirus felin tip 1.

Leziunile macroscopice întâlnite la pisicile cu herpesviroză felină au fost descrise prin: cherato-conjunctivită, rinită catarală, traheită catarală și pneumonie interstițială.

Calicivirusul felin a contribuit într-o proporție mai mare în **infecțiile tractusului respirator anterior la pisici** comparativ cu herpesvirusul felin (26,47%, respectiv 23,53%).

Se recomandă continuarea studiilor cu investigații față de bacteriile implicate în infecțiilor tractusului respirator anterior la pisici, pentru a se putea stabili proporția cu care acestea contribuie în „complexul bolilor respiratorii ale felinei” (*Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydomyphila felis*, *Mycoplasma spp*, dar și *Staphylococcus spp.* și *Escherichia coli*).

Calicivirusul felin se poate asocia cu herpesvirusul felin în infecțiile tractusului respirator anterior la pisici. În urma testelor de laborator s-a constatat prezența ambelor virusuri într-una dintre cele 10 probe analizate în acest sens, fapt care a demonstrat existența coinfectiei calicivirus-herpesvirus felin la una dintre pisicile supuse studiului (un pisoi de rasă Persană, cu vârsta de două luni și 15 zile).

Rezultatele investigațiilor au relevat faptul că majoritatea semnelor clinice în caliciviroza și herpesviroza felină coincid. Prin urmare, cele mai multe dintre semnele clinice prezente în infecțiile tractusului respirator anterior la pisici pot fi atribuite atât calicivirozei feline cât și herpesvirozei feline (secrețiile nazale, secrețiile oculare, apatia, inapetența, febra, strănutul și dispneea).

Cu toate acestea, la pisicile supuse studiului s-au remarcat două aspecte care pot face ca medicul veterinar clinician să se poată orienta în diagnostic spre o boală sau alta.

Ulcerele linguale au fost caracteristice infecției cu calicivirus felin (66,67% în cazul pisicilor cu caliciviroză felină; 4,17% în cazul pisicilor cu herpesviroză felină), în timp ce infecția cu herpesvirus felin a provocat afecțiuni nazale și oculare cu un grad accentuat de severitate în special la pisoi.



Diagnosticul infecției cu calicivirus felin și/sau cu herpesvirus felin tip 1 s-a realizat prin tehnica de izolare a virusurilor pe culturi celulare.

Izolarea virală pe culturi celulare a presupus prelucrarea probelor corespunzătoare (tampoane nazale, conjunctivale și orofaringiene; organe), inocularea pe linia celulară de rinichi de pisică CRFK (Crandell-Rees feline kidney) și examinarea periodică pentru observarea efectului citopatic.

Efectul citopatic atribuit calicivirusului felin s-a manifestat după cca. 12 ore de la inocularea probelor biologice pe linia celulară de rinichi de pisică, iar după 2 zile de la inoculare s-a observat și efectul citopatic produs de herpesvirusului felin tip 1.

Efectul citopatic atribuit calicivirusului felin a constat în modificări degenerative și distrugere celulară, rezultat al multiplicării virale: celule mici, cu aspect ușor granulat; rotunjire celulară; tendința de agregare celulară sub formă de ciorchine; distrucția monostratului celular. Efectul citopatic atribuit herpesvirusului felin s-a caracterizat prin formarea sincițiilor și prezența de zone localizate de infecție (degenerare focală).

Calicivirusul felin a fost izolat în special din secreții orofaringiene și conjunctivale (26,92%, respectiv 24,39%), dar și din secreții nazale (5,77%) și țesut pulmonar. Herpesvirusul felin tip 1 a fost izolat cu predilecție din secreții conjunctivale și nazale (39,02%, respectiv 23,08%), dar și din secreții orofaringiene (1,28%).

Rezultatele obținute dovedesc că în tehnica de izolare virală pe culturi celulare un aspect important îl reprezintă tipul probelor utilizate pentru diagnostic. Pentru diagnosticul calicivirozei feline se recomandă utilizarea tampoanelor orofaringiene și conjunctivale, iar în diagnosticul infecției cu herpesvirus felin este indicată utilizarea tampoanelor conjunctivale și nazale.

Confirmarea identității virusurilor izolate s-a obținut prin testele de determinare specifică a genomului viral.

Detecția calitativă a calicivirusului felin (ARN-virus) și a herpesvirusului felin (ADN-virus) din izolatele virale s-a executat prin tehnica real-time RT-PCR, respectiv analiza real-time PCR, cu sonde de hidroliză de tip TaqMan.

Rezultatele înregistrate au relevat faptul că testul real-time RT-PCR este mai sensibil și mai rapid în comparație cu tehnica de izolare virală a calicivirusului felin. Dintr-un număr de 20 probe supuse studiului, 13 probe au generat un răspuns pozitiv prin tehnica real-time RT-PCR și doar 10 probe au produs un răspuns pozitiv prin metoda izolării virale. Testul real-time RT-PCR s-a executat în aproape două zile, iar izolarea virală s-a efectuat în circa două săptămâni.



Testul PCR în „timp real” este sensibil și specific în determinarea acizilor nucleici virali, în timp ce tehnica de izolare virală pe culturi celulare demonstrează prezența unui virus viabil, capabil de replicare.

În cadrul examenelor de laborator s-a întâlnit situația în care o probă pozitivă la izolarea calicivirusului felin pe linia celulară de rinichi de pisică CRFK a generat un răspuns pozitiv la testarea prin metoda real-time PCR. Astfel a fost identificată prezența ambelor virusuri în aceeași probă, fapt care demonstrează existența coinfecției calicivirus-herpesvirus felin la una dintre pisicile supuse studiului.

Așadar, o probă pozitivă la izolarea calicivirusului felin pe culturi celulare nu înseamnă neapărat că este negativă în ceea ce privește infecția cu herpesvirus felin, de aceea se recomandă efectuarea testelor de determinare specifică a genomului viral pentru ambele virusuri implicate în infecțiile tractusului respirator anterior la pisici.

În general, diagnosticul serologic în infecția cu calicivirus felin nu este de ajutor deoarece testele serologice nu pot face distincția dintre infecție și vaccinare. Cu toate acestea, cunoașterea titrului de anticorpi de neutralizare a calicivirusului felin poate fi utilă, pentru a anticipa dacă pisicile sunt protejate sau nu față de boală.

Rezultatele obținute au evidențiat faptul că testul imunoenzimatic ELISA indirectă poate fi utilizat în special ca metodă de monitorizare a eficacității vaccinării în infecția cu calicivirus felin la pisici, și mai puțin ca metodă de diagnostic în caliciviroza felină. O pisică de rasă Birmaneză, vaccinată și fără semne clinice, și care a prezentat infecție cu calicivirus felin, identificată prin tehnica de izolare virală și confirmată prin testul real-time RT-PCR, a generat un răspuns negativ la testarea ELISA indirectă, demonstrând faptul că în caliciviroza felină testele serologice nu pot face distincția dintre infecție și vaccinare.

S-a constatat și faptul că pisicile care au trecut prin boală nu sunt protejate pe durata vieții, motiv pentru care în caliciviroza felină se recomandă vaccinarea. La 15 pisici nevaccinate, cu semne clinice și care au prezentat infecție cu calicivirus felin, s-a constatat pe parcursul investigațiilor un titru de anticorpi >90 care nu asigură protecția necesară împotriva calicivirozei feline.

Cunoașterea titrului de anticorpi de neutralizare a calicivirusului felin este necesară pentru a anticipa dacă pisicile sunt protejate sau nu față de boală. Vaccinarea reprezintă singura măsură sigură și eficientă pentru protejarea pisicilor față de boală (5 pisici fără semne clinice,



EUROPEAN UNION



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PENSANELOR VÂRSTNICE
(ASPECTUL)



Fondul Social European
2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
DIRECȚIE



USAMV Iași

care au fost vaccinate la data prezentării la consultație, au prezentat pe parcursul investigațiilor un titru de anticorpi >270 care le-a asigurat protecția necesară împotriva calicivirozei feline).

În caliciviroza felină vaccinarea reprezintă singura măsură sigură și eficientă pentru protejarea pisicilor față de boală, dar care nu oferă protecție față de infecție sau starea de purtător. O pisică de rasă Birmaneză, vaccinată și fără semne clinice, a prezentat infecția cu calicivirus felin, identificată prin tehnica de izolare virală și confirmată prin testul real-time RT-PCR, cu toate că la această felină s-a constatat un titru ridicat de anticorpi >270 , considerat protectiv.