



REZUMAT

Teza de doctorat cu titlul „**Cercetări privind filogenia coronavirusurilor identificate la pisici**” prezintă un număr de 220 pagini, fiind structurată conform cerințelor actuale în două părți: prima de studiu bibliografic, iar cea de a doua de cercetări proprii.

Prima parte intitulată „**Stadiul actual al cunoașterii**” este formată din 45 pagini, 3 capitole, 23 subcapitole, 15 figuri. Pentru realizarea acesteia a fost consultat un număr de 309 titluri bibliografice.

Capitolul I intitulat „**Descrierea coronavirusului felin**” cuprinde 9 subcapitole în care se fac referiri la taxonomia virală, descrierea virionului, clasificare, ipoteze privind sușele benigne și cele virulente, patogeneză, aspecte epidemiologice, reacția organismului.

Coronavirusul felin este încadrat în genul *Alphacoronavirus* 1, familia *Coronaviridae*, ordinul *Nidovirales* alături de coronavirusul canin și cel al gastroenteritei transmisibile porcine. Denumirea virusurilor din această familie se datorează aspectului caracteristic de „coroană” al virionilor examinați la microscopul electronic.

Până în prezent au fost descrise două biotipuri de coronavirus felin - enteric și cel al peritonitei infecțioase feline, dar și două serotipuri I și II. Deasemenea există sușe benigne de coronavirus și sușe înalt virulente, indiferent de clasificarea lor în funcție de serotip sau biotip. În ceea ce privește existența acestor sușe cu virulență diferită s-au formulat mai multe ipoteze, cea mai cunoscută fiind cea a mutației interne din timpul replicăției prin care coronavirusul enteric felin duce la apariția virusului peritonitei infecțioase feline. Coronavirusul enteric se transmite ușor între indivizii speciei feline determinând simptome ușoare, pe când virusul PIF determină o afecțiune fatală, dar care evoluează cu o incidență redusă. Biotipul enteric de coronavirus are afinitate pentru celulele intestinale, pe când virusul ce determină peritonita infecțioasă felină infectează monocitele și macrofagele. Mecanismele de apărare ale organismului infectat sunt ineficiente având în vedere că boala este fatală.

Capitolul II intitulat „**Descrierea semnelor clinice și anatomopatologice în infecțiile coronavirale**” este structurat în 5 subcapitole.

Acesta cuprinde informații din literatura de specialitate referitoare la simptomatologia în infecția cu coronavirus felin, la baza căreia stau leziunile de vasculită. Peritonita infecțioasă felină poate evolua sub mai multe forme (umedă sau uscată - acută sau cronică), iar leziunea histopatologică patognomonică/ de referință o reprezintă piogranulomul cu localizări diverse.

Capitolul III intitulat „*Diagnosticul în peritonita infecțioasă felină*” este structurat în 9 subcapitole în care sunt prezentate metodele de diagnostic clinic și paraclinic utilizate în cazul acestei afecțiuni. Astfel, dintre metodele imagistice, radiografia și ecografia sunt frecvent utilizate, comparativ cu rezonanța magnetică.

Metodele hematologice folosite pentru diagnostic vizează studiul modificărilor formulei leucocitare și depistarea anemiilor non-regenerative. Analizele biochimice sunt realizate în special pe probe de sânge și urmăresc evoluția raportului între alpha - și gamaglobuline. Pentru orientarea diagnosticului se pot realiza examenele amintite și pentru lichidul cefalorahidian și lichidele acumulate în cavități.

Detectarea antigenelor coronavirale se realizează prin metode de biologie moleculară cum ar fi RT-PCR-ul și real-time RT-PCR-ul. Prin metodele serologice se urmărește identificarea anticorpilor anticoronavirali din diferitele lichide patologice. Metodele cele mai relevante pentru diagnosticul PIF sunt imunohistiochimia realizată prin marcarea macrofagelor cu anticorpi specifici și examenul histopatologic. În ceea ce privește modificările microscopice din PIF piogranulomul reprezintă leziunea caracteristică alături de prezența vasculitei. Subcapitolele 8 și 9 fac referire la metodele de tratament și profilaxie specifică și nespecifică testate în cazurile de PIF.

În încercarea de a trata această afecțiune s-au utilizat o multitudine de substanțe farmaceutice, incluzând antiviralele și interferonii. Acestea însă nu și-au dovedit eficacitatea în peritonita infecțioasă felină. Până la ora actuală nu s-a stabilit o schemă de tratament prin intermediul căreia să se reușească vindecarea indivizilor afectați. Din aceste considerente se recomandă tratamentul simptomatic și de susținere care să cuprindă substanțe antiinflamatoare, antibiotice, imunomodulatoare.

În ceea ce privește profilaxia specifică încercările de preparare a vaccinurilor contra coronavirusurilor feline au eșuat în majoritatea cazurilor. Există un vaccin preparat pe baza unei tulpini termosensibile de coronavirus, însă acesta nu este disponibil în Europa, iar eficiența lui a fost deasemenea contestată.

Singura modalitate de apărare împotriva infecției cu coronavirus în cazul speciei feline constă în respectarea măsurilor de profilaxie nespecifică. Evitarea stresului, a contactului cu eliminatorii de coronavirus, igienizarea litierei și a vaselor utilizate pentru hrană și apă, eliminarea de la reproducție a indivizilor ce provin din linii sensibile reprezintă metode eficiente în evitarea transmiterii infecției.

Partea de cercetări proprii însumează 150 pagini, 73 figuri și 25 tabele și cuprinde opt capitole în care sunt prezentate rezultatele privind analiza filogenetică a coronavirusurilor identificate la pisici, dar și a examenelor premergătoare acestora.

Capitolul IV cu titlul „**Scopul și obiectivele cercetării**” cuprinde obiectivele și activitățile aferente necesare pentru realizarea analizelor filogenetice. Astfel, pentru aceasta, a fost necesară selecția unor indivizi de la care să se facă recoltarea de diverse probe care au fost apoi supuse examinării virusologice. Aceasta a fost efectuată utilizând tehnici de biologie moleculară cum ar fi RT-PCR-ul și real-time RT-PCR-ul. Probele pozitive au fost apoi secvențializate pentru obținerea informației genetice codificate de acestea. Pe baza acestor rezultate au fost simulate proteinele corespunzătoare necesare pentru construcția arborilor filogenetici.

Capitolul V intitulat „**Evaluarea clinică a pisicilor suspecte de peritonită infecțioasă felină**” cuprinde 3 subcapitole în care sunt prezentate materialele și metodele de lucru, rezultatele, discuțiile și concluziile parțiale. Investigațiile au avut drept scop obținerea de tulpini de coronavirus de la indivizii purtători și eliminatori de coronavirus cu semne clinice de peritonită infecțioasă felină.

Astfel, au fost luate în studiu un număr de 25 de pisici din cazuistica Clinicilor de Medicală și Boli infecțioase din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași și 11 din cea a cabinetelor particulare de pe raza orașului Iași, totalizând un număr de 36 cazuri din care 29 masculi și 6 femele, majoritatea fiind în jurul vârstei de doi ani.

Pentru fiecare caz s-a realizat anamneza și examenul clinic utilizând metode imagistice precum ecografia, radiografia. Pentru lichidele patologice de epanșament s-a examinat aspectul, s-a determinat concentrația în proteine și s-a realizat examenul citologic.

Simptomele întâlnite la cazurile examinate au variat foarte mult, cel mai frecvent observându-se modificări ale comportamentului, pierderi în greutate, afecțiuni digestive, renale, acumulări de lichid în cavitățile abdominală și/sau toracică.

Capitolul VI având titlul „**Aspecte anatomo și histopatologice la pisicile cu infecții coronavirale**” prezintă pe parcursul a două subcapitole modificările macroscopice și microscopice la pisicile cu infecții determinate de coronavirusuri.

Subcapitolul 6.1. prezintă rezultatele anatomopatologice ale necropsiilor realizate, precum și metodele de lucru. Astfel în urma examinării a 10 cadavre s-a observat, în majoritatea cazurilor, aspectul cahectic al acestora, iar la deschidere prezența fibrinei și a lichidelor acumulate în cavități. Deasemenea s-au observat modificări la nivelul organelor interne, mai ales în ceea ce privește volumul. O coinfecție bacteriană cu *Streptococcus spp.* a fost întâlnită în cazul unui mascul în vârstă de aproximativ 2 ani. Cele mai afectate organe din punct de vedere macroscopic au fost limfonodurile mezenterice, ficatul, splina, rinichii. Modificările au fost observate în cazul tuturor pisicilor examinate.

La nivelul organelor parenchimatoase (rinichi, ficat) s-a observat prezența unor noduli albicioși determinați de depunerea complexelor antigen-anticorp.

În subcapitolul 6.2. sunt prezentate rezultatele examenului histopatologic realizat pe preparate din organe recoltate de la doi indivizi. Probele au fost incluse în parafină și colorate prin metoda HE și HEA. Leziunile microscopice observate la nivelul organelor examinate au fost cele de edem, infiltrații celulare și de fibrină, necroze, steatoze, vasculită, piogranulom hepatic și renal, comparabile cu cele amintite în literatura de specialitate ca fiind tipice pentru peritonita infecțioasă felină.

Capitolul VII intitulat „**Examene serologice pentru depistarea anticorpilor anticoronavirali**” conține 3 subcapitole în care sunt prezentate metodele de lucru, rezultatele și concluziile parțiale. Determinarea titrului anticorpilor virali s-a realizat pentru 12 probe de sânge și lichide patologice recoltate de la pisici suspecte de PIF și 8 probe de sânge provenite de la indivizi clinic sănătoși, utilizându-se tehnica de imunofluorescență indirectă. Pentru efectuarea acestora s-au utilizat culturi celulare din linia PK infectate cu virusul gastroenteritei transmisibile porcine. Pentru evidențierea complexelor antigen-anticorp s-a utilizat tehnica de imunofluorescență directă. Titrul de anticorpi în cazul pisicilor cu semne clinice de peritonită infecțioasă felină a variat de la 1/625 până la 1/16000, indicând în ultimul caz un răspuns imun puternic, iar la pisicile clinic sănătoase anticorpii anticoronavirali au fost detectați în probele de sânge la diluții de la 1/125 până la 1/3125.

Capitolul VIII este intitulat „**Examene virusologice realizate prin tehnica real-time RT-PCR**”. În cadrul acestuia sunt prezentate eșantioanele luate în studiu și care au constat atât în materiale patologice recoltate de la pisici suspecte de PIF, cât și din organe recoltate în urma necropsiilor. Pentru efectuarea tehnicii real-time RT-PCR s-a utilizat perechea de primeri 205-211 necesară pentru amplificarea unei porțiuni bine conservate în genomul familiei *Coronaviridae*. Ca martor pozitiv s-a utilizat ARN provenit de la virusul gastroenteritei transmisibile porcine ca atare și în diluții de 1/10 și 1/100. Amplificarea s-a realizat într-un termociclor Ligh-Cycler de la Roche, pentru fiecare probă analizată fiind necesar ARN pur și diluat 1/10.

Din cele 47 de probe analizate, coronavirusul a fost detectat în 35 de probe de fecale, lichide patologice și organe. În cazul tuturor probelor de intestin recoltate de la cele 4 pisici luate în studiu s-au înregistrat rezultate pozitive, situație legată de tropismul virusului pentru enterocite. Încărcătura virală cea mai mare a fost înregistrată în cazul unei probe de intestin, aceasta devenind pozitivă la un număr de cicluri (16.51) apropiat de cel al diluției de 1/100 a matorului pozitiv (15.65).

Capitolul IX cu titlul „**Examene virusologice realizate prin tehnica RT-PCR**” prezintă metodele de lucru și rezultatele obținute în cazul amplificării probelor luate în studiu, utilizând perechi de amorse corespunzătoare genelor 7b, 3c, M și N. Pentru testare au fost recoltate probe

atât de la pisici clinic sănătoase, cât și de la cele suspecte de PIF. Amplificarea s-a realizat utilizând kitul comercial Qiagen One-Step RT-PCR, iar pentru vizualizarea rezultatelor s-a efectuat electroforeza în gel de agaroză. Probele pozitive au fost decupate din gel, ADN-ul corespunzător acestora fiind extras utilizând kitul MinEluteGel Extraction și trimis pentru secvențiere.

Pentru caracterizarea tulpinilor de coronavirus identificate, RT-PCR-ul a permis obținerea a 5 rezultate pozitive la amplificarea genei 7b, 23 de rezultate pozitive la amplificarea genei M, 27 de rezultate pozitive la amplificarea genei 3c, 28 de rezultate pozitive la amplificarea genei N.

Capitolul X denumit *„Analizarea/prelucrarea informațiilor obținute prin examene virusologice și secvențializare”* cuprinde 4 subcapitole și prezintă modul de lucru și rezultatele analizei filogenetice. Rezultatele de la secvențializare corespunzătoare amplificării fiecărei gene au fost prelucrate utilizând programe *in silico* pentru obținerea proteinelor și arborilor filogenetici. Programele utilizate au fost accesate online pe site-ul European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk), iar pentru obținerea arborilor s-au utilizat diverse versiuni ale programului MEGA.

Rezultatele analizei filogenetice au arătat că proteinele coronavirusale 7b identificate în diferite organe ale aceluiași individ cu PIF au fost înrudite.

Pentru construcția arborilor filogenetici pe baza proteinelor de matrice s-au utilizat și tulpini de coronavirus canin și un coronavirus porcine. Cu acestea au prezentat similarități tulpini coronavirusale identificate în probe de ficat, pancreas și intestin recoltate de la doi indivizi cu PIF.

Utilizând tulpini de coronavirus din literatura de specialitate identificate la pisicile sănătoase comparativ cu cele de la pisicile luate în studiu și cele cu PIF din literatura de specialitate nu s-a observat o segregare netă între acestea, în cazul analizei filogenetice pe baza proteinelor N și 3c. În urma amplificării porțiunii corespunzătoare genei care codifică proteina de membrană s-au identificat în probe de organe trei tulpini de coronavirus ce au prezentat înrudiri filogenetice cu coronavirusuri identificate la câini, ceea ce susține încadrarea acestora în rândul virusurilor ce depășesc bariera de specie. Amplificarea genei 7b a dus la obținerea a cinci proteine non-structurale virtuale, analiza filogenetică realizată pe baza lor susținând ipoteza conform căreia virusul peritonitei infecțioase feline apare în urma unor mutații din timpul replicării virale.

Capitolul XI cuprinde *„Concluziile finale”*.