

REZUMAT

În România creșterea suinelor începe să se dezvolte din ce în ce mai mult, sub forma sistemului fermelor specializate (producătoare de porci, de creșterea tineretului, de îngrășare sau de finisare) și a unităților de tip circuit închis. Necesitatea unei cercetări despre coronavirusurile suine se justifică prin pericolul pe care îl reprezintă această familie de virusuri atât pentru porci, cât și pentru alte specii de animale, precum și pentru om. În trecut, virusul gastroenteritei transmisibile (VGET) a evoluat în țara noastră, producând pierderi foarte mari. De câțiva ani evoluează în Asia și SUA o tulpină foarte virulentă de DEP (virusul diareei epidemice porcine). Emergența unui nou coronavirus cu tropism digestiv, foarte patogen (deltacoronavirusul), care evoluează cu morbiditate și mortalitate mare la porcii sugari în China și SUA atrage încă o dată atenția asupra familiei *Coronaviridae*, care prezintă o variabilitate și patogenitate foarte mare.

Pe de altă parte, persistența unor enterite diareice cu etiologie virală, în efectivele actuale, enterite care au o evoluție recurentă, morbiditate scăzută, dar sunt prezente în mod constant, reflectă în primul rând, o lipsă de respectare a condițiilor de zooigienă și constituie un factor de risc pentru tot efectivul.

Teza de doctorat cu titlul "Cercetări privind infecțiile cu coronavirusuri la suine", are la bază o cercetare referitoare la prezența coronavirusurilor în unele ferme din Nord Estul Moldovei, o evaluare a sensibilității diferitelor metode de diagnostic față de probele recoltate, o investigație serologică pentru două coronavirusuri suine și analiza filogenetică a tulpinilor de coronavirus identificate pe teren.

Teza cuprinde un număr de 184 de pagini, fiind structurată conform criteriilor în vigoare, în două părți: prima parte de studiu bibliografic și partea a doua de cercetări proprii, la care se adaugă cuprinsul, introducerea, rezumatul și bibliografia.

Prima parte intitulată " Stadiul actual al cunoașterii" este compusă din 45 de pagini, 4 capitole, 15 subcapitole și 17 figuri. Pentru realizarea acesteia au fost consultate 261 de titluri bibliografice de specialitate.

Partea a doua, cuprinde o serie de cercetări întreprinse pentru a detecta și diferenția coronavirusurile suine și seroprevalența unor efective din Moldova, materialele și metodele de lucru utilizate, interpretarea și discutarea rezultatelor și concluziile desprinse consecutiv cercetărilor realizate.

Teza cuprind un număr de 84 de figuri și 29 de tabele.

Prima parte a lucrării reprezintă o sinteză a literaturii referitoare la coronavirusurile suine, privind stadiul actual al cunoașterii pe plan național și internațional.

➤ Capitolul I, cu titlul "*Date bibliografice privind istoricul, răspândirea și etiologia coronavirozelor suine*" este alcătuit din trei subcapitole și se referă la importanța coronavirusurilor suine, încadrarea taxonomică, structura și replicarea genomului și rolul proteinelor structurale. Coronavirusurile cercetate în această teză sunt alfacoronavirusuri, dintre care două au tropism enteric (VGET și VDEP) și unul are tropism respirator (CVRP).

➤ În Capitolul II, "*Date bibliografice privind epidemiologia, patogeniza și mecanisme imune implicate în coronavirozele suine*", este descris modelul de evoluție epidemiologic al VGET, VDEP și CVRP, care sunt factorii de risc și sursele de infecție ale bolilor pe care le provoacă și cum se produce infecția la nivel patogenetic, dar și cu ce receptori celulari interacționează coronavirusurile suine pentru a pătrunde în celula gazdă.

➤ Capitolul III, "*Date bibliografice privind simptomatologia și morfopatologia coronavirozelor suine*", descrie aspecte clinice, leziunile macroscopice și histopatologice pe care acestea le produc. Datorită faptului că simptomatologia și tabloul lezional au un caracter nespecific și nu permit diferențierea coronavirusurilor între ele sau față de alte virusuri cu tropism enteric (Rotavirusul porcine de Grup A), sunt necesare examene de laborator pentru a confirma suspiciunea de diagnostic și a stabili cu precizie natura agentului etiologic.

➤ Capitolul IV, "*Date bibliografice privind diagnosticul, profilaxia și combaterea coronavirozelor suine*", cuprinde trei subcapitole care detaliază pe larg toate metodele de diagnostic descrise în literatură, cu avantajele și dezavantajele pe care fiecare le prezintă. În ceea ce privește profilaxia, o mare problemă o reprezintă faptul că încă nu s-a reușit obținerea unui vaccin cu rezultate mulțumitoare, ceea ce în timpul evoluțiilor de tip epidemic ale GET sau a DEP pot duce la pierderi foarte mari pentru fermieri.

Partea de cercetări proprii este structurată pe 6 capitole.

➤ Capitolul V, "*Scopul și obiectivele cercetărilor*", este alcătuit dintr-o scurtă prezentare a obiectivelor și activităților necesare pentru atingerea acestora. Pentru a veni în ajutorul medicilor de pe teren, determinarea metodei cele mai sensibile de detecție a antigenelor virali din probe a fost unul din obiectivele urmărite. În același timp s-a dorit realizarea unui screening serologic în ferme și gospodăriile populației, în vederea evaluării seroprevalenței

anticorpilor anti-VGET și anti-CVRP. Prin RT-PCR și secvențiere s-a vizat identificarea speciei de coronavirus implicată în procesul patologic și caracterizarea acestuia din punct de vedere filogenetic.

➤ Capitolul VI, cu titlul "*Cercetări epidemiologice și anatomo-clinice privind infecțiile cu coronavirusuri la suine*" este structurat în 5 subcapitole. La început au fost prezentate efectivele de la care s-au recoltat probe, aria geografică pe care s-au întins cercetările și tipul de investigații realizate.

În cadrul subcapitolului de cercetări epidemiologice, s-a realizat o anchetă epidemiologică pe parcursul a trei ani (2010 – 2012), la două efective în care evoluau în mod constant enterite diareice și exista suspiciunea de infecție cu coronavirus. Categoria de vârstă cu mortalitatea cea mai ridicată a fost cea a purceilor sugari, fiind de 2,74% pentru ferma E și 5,27% pentru ferma L. Enteropatiile au reprezentat în ambele cazuri principala cauză a morții purceilor (75,63% pentru ferma E și 65,09% pentru ferma L). Având în vedere schimbările în sistemul de creștere intensivă, incidența coronavirozelor cu manifestări dramatice s-a redus considerabil în zona studiată, însă este posibil ca aceste virusuri să persiste într-o formă de rezistență în aceste efective. Modul de răspândire și difuzie în efectiv s-a redus, iar categoria de vârstă a sugariilor s-a menținut ca fiind cea mai receptivă.

Cercetarea clinică a vizat examinarea a 125 de animale din opt ferme și gospodării ale populației, prin care s-au pus în evidență manifestările clinice de gastroenterită: diaree gălbuie cu mucus, deshidratare accentuată, abatere și inapetență. Leziunile observate la cele 69 de cadavre necropsiate au constat în: gastroenterită catarală, hipertrofia și congestia limfonodurilor mezenterice, distensia cu gaze și subțierea intestinului subțire. Histopatologic, s-a observat o atrofie pronunțată a vilozităților intestinale, au fost puse în evidență incluzii de hialin în enterocite, necroza epiteliului digestiv, edem în stroma vilozităților și inflamații limfo-histiocitare în alte organe (pulmon, rinichi). Având în vedere că aspectele anatomo-clinice au caracter nespecific, ele nu au putut diferenția enteritele virale produse de VGET, VDEP și PRV, încât cercetările au continuat cu metode de diagnostic mai specifice.

➤ Capitolul VII intitulat "*Diagnosticul serologic în infecțiile cu coronavirusuri și cu rotavirusuri la suine*" cuprinde 4 subcapitole referitoare la metodele de diagnostic folosite: testul imunocromatografic (TIC), imunofluorescența directă (IFD), imunohistochimia (IHC) și tehnica ELISA.

Prin testul imunocromatografic s-a urmărit prezența antigenelor VGET, VDEP și PRV cu ajutorul unor teste rapide. S-au testat 74 de pool-uri de fecale, provenite de la 8 ferme. Dintre acestea, 27,27% au fost pozitive pentru cel puțin unul din cele 3 virusuri testate, iar 23,80% din

enteritele virale au fost determinate de infecții virale multiple, aceasta reprezentând o nouă direcție pentru protocoalele de diagnostic și pentru cercetare.

Prin IFD, au fost testate 76 de probe de țesut (duoden, jejun, limfonoduri, rinichi) provenite de la 19 purcei și 10 probe de fecale de la scroafe gestante și lactante, din ferma E, cu un ser conjugat cu anticorpi specifici VGET. Prin reacția specifică, s-a vizualizat o fluorescență marcată intracitoplasmatică și uneori un halou fluorescent pericelular. Un răspuns pozitiv a fost oferit de 22,09% dintre probele testate, iar o sensibilitate mărită au avut-o amprentele de jejun (52,63%) și de limfonoduri mezenterice (21,05%).

Reacția de IHC s-a realizat pe probe de țesut provenite de la 47 de animale necropsiate, din 2 unități de creștere cu suspiciune de infecție cu coronavirusuri cu tropism digestiv. La reacția cu anticorpul FIPV3-70, din cele 188 de probe testate, 52 au reacționat pozitiv. Țesuturile cele mai sensibile au fost la fel ca la IFD jejunul și limfonodurile mezenterice, dar prin acest test s-a detectat un număr mai mare de probe pozitive (27,65% reacții), având o sensibilitate superioară testului de IFD.

Prin testarea ELISA s-a dorit o evaluare serologică a fermelor și a unor localități luate în studiu. Astfel, au fost testate seruri de la 12 ferme și 11 gospodării ale populației pentru prezența anticorpilor anti-VGET și anti-CVRP. Deși numeroase țări din Uniunea Europeană raportează o seroprevalență de peste 50% față de CVRP, rezultatele obținute prin cercetarea de față au fost mult mai reduse. În ferme, la 22,95% din probele testate s-au identificat anticorpi pentru CVRP, iar la purceii din gospodării într-o proporție și mai mică, de 17,18%. Aceasta sugerează o descoperire imunologică și un risc pentru populația de suine din această zonă. Pentru confirmarea prezenței coronavirusurilor în efectiv este necesară utilizarea unei metode specifice de detecție a antigenului. Pentru VGET nu s-au evidențiat anticorpi nici în sistemul gospodăresc de creștere, nici în ferme.

Capitolul VIII se referă la "*Identificarea coronavirusurilor suine și a rotavirusului suin grup A prin tehnici de biologie moleculară*", mai exact prin tehnica de Revers Transcripție-PCR. Este metoda cea mai frecvent citată în literatură, dovedind o sensibilitate și specificitate superioară celorlalte metode. S-a dorit identificarea VGET, VDEP și PRV din pool-uri de fecale pentru a analiza etiologia virală a enteritelor virale, dar și detectarea CVRP din probe de exudat. În acest sens, s-a realizat mai întâi extracția ARN-ului viral din probe, care a fost supus ulterior procesului de revers transcripție pentru sinteza de ADNc. Acesta a fost testat cu o serie de primeri specifici pentru fiecare din virusurile de mai sus. Mai întâi, pentru identificarea coronavirusurilor s-a folosit un primer general, care corespunde unei porțiuni bine conservate din gena nucleoproteinei (Ncons). Prin amplificarea cu acest primer, s-au obținut 19 probe de fecale și 5 probe de exudat pozitive la coronavirus. Acest rezultat confirmă superioritatea sensibilității

reacției de RT-PCR (37,25%). Deși o parte din probele testate au răspuns pozitiv prin utilizarea primerilor Ncons pentru coronavirusuri, la testarea cu primeri specifici, care diferențiază VGET de CVRP și VDEP nu s-au obținut probe pozitive. Acest rezultat contradictoriu poate fi explicat prin nefuncționarea specifică a primerilor. Având în vedere că pentru VGET și CVRP s-au folosit primeri pentru gena S, care prezintă o variabilitate foarte mare, este posibil ca tulpinile coronavirusale identificate să fi suferit o serie de mutații la nivelul acestei gene, încât primerul nu mai recunoaște antigenul. În literatura de specialitate, detectarea VDEP este dificilă, fiind necesare mai multe pasaje, uneori oarbe, ale virusului izolat din probe pe culturi celulare, după care se recomandă realizarea RT PCR-ului din produsul rezultat. Pentru diferențierea celor trei specii este necesară secvențializarea fragmentelor obținute sau testarea cu alți primeri specifici pentru gena N, care corespund unor secvențe mai bine conservate.

Pentru identificarea PRV s-a folosit o pereche de primeri pentru gena NSP5, aceasta fiind cea mai bine conservată genă. A fost testat ADNc de la pool-urile de fecale (n=51) investigate anterior pentru coronavirus. S-au obținut 13 probe pozitive (25,49%) pe diferite categorii de vârstă.

Prin RT-PCR, numărul de probe pozitive a fost mai mare și față de cele testate prin kit rapid, chiar și în cazul existenței unei cantități foarte reduse de antigen viral în probe.

➤ Capitolul IX "*Analiza filogenetică a secvențelor de nucleotide izolate din genomurile coronavirusale suine*" urmărește să diferențieze speciile de coronavirusuri obținute prin RT PCR. Probele pozitive extrase din gelul de agar au fost trimise la un laborator specializat pentru secvențiere. S-au izolat două tulpini de VGET care corespund ca și secvență nucleotidică cu tulpini omologate pe culturi celulare.

➤ Capitolul X "*Concluzii finale*" prezintă succint un număr de 14 concluzii finale pe baza datelor furnizate de rezultatele cercetărilor.