
TEZĂ DE DOCTORAT

Testarea serologică a probelor de lapte individuale și colective pentru investigarea prevalenței artritei-encefalitei caprine (AEC) în România

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand: **Adrian-Valentin Potârniche**

Coordonatori științifici: **Prof. Dr. Marina Spînu**
Dr. hab Olga Szaluś-Jordanow



REZUMAT

Artrita-encefalita caprină (AEC) este una dintre cele mai importante boli virale ale caprelor, cu implicații economice semnificative (CIRONE și colab., 2019). Boala este cauzată de virusul artritei-encefalitei caprine (VAEC), un lentivirus, un virus cu ARN monocatenar, ce aparține familiei *Retroviridae*, care împreună cu virusul Maedi-Visna (VMV) sunt clasificate ca lentivirusurile rumegătoarelor mici (SRLV) (COST ACTION, 2002). Modul principal de transmitere a virusului se realizează prin ingestia de colostru și lapte infectat, de către iezi (transmitere verticală), însă contactul direct cu animale infectate poate fi de asemenea implicat în diseminarea virusului (transmitere orizontală) (SMITH and SHERMAN, 2009; BALBIN and MINGALA, 2017). Infecția cu SRLV la capre are o evoluție clinică progresivă, în cadrul căreia artrita este cel mai frecvent simptom. Boala este caracterizată de o rată crescută a infecțiilor inaparente, doar 30% din animalele infectate manifestând semne clinice (PETERHANS și colab., 2004). Perioada de incubație este de lungă durată, cu persistența virusului în organism timp de mai mulți ani, sau chiar pe tot parcursul viații (PERK, 1995). Infecția se răspândește în cadrul efectivului insidios înainte ca primele semne clinice să fie observabile, afectând un procent crescut de animale (CZOPOWICZ și colab., 2018).

În consecință, diagnosticul AEC de certitudine este fundamentat pe teste de laborator. Cu toate că identificarea SRLV prin metode de biologie moleculară (PCR) este o variantă potențial utilizabilă pentru diagnostic, asemenea teste nu sunt incluse încă în practica curentă. Testele serologice, cum ar fi testul imunoenzimatic (ELISA) sau testul de dublă imunodifuzie în gel de agar (AGID), rămân principalele metode de diagnostic ale AEC (HERMAN-HOUSING, 2010). În prezent, nu există tratament sau profilaxie specifică împotriva AEC. Ca urmare, programele de control nespecifice reprezintă singura cale de a preveni răspândirea infecțiilor cu SRLV (MINGUIJON și colab., 2015).

Cea mai importantă problemă asociată cu aplicarea procedurilor de diagnostic este colectarea probelor pentru testare (RUIZ-FONS și colab., 2011). În mod curent, sângele reprezintă materialul utilizat pentru detectarea anticorpilor anti-SRLV. În numeroase țări, colectarea probelor de sânge este permisă doar medicilor veterinari, aceasta reprezentând o manoperă invazivă, care crește semnificativ costurile testării (ADJADJ și colab., 2019). Acest inconvenient a dus la ipoteza: utilizarea laptelui ca material alternativ de testare în locul serului. Detectarea anticorpilor din lapte poate fi o variantă mai bună față de identificarea acestora din probele sanguine, colectarea fiind mai ușoară, fără afectarea bunăstării animalelor (GAZZONS și colab., 2018). În turmele crescute pentru lapte, probe individuale de lapte pot fi colectate direct de către fermieri

(BRINKHOF și colab., 2010). Mai mult, utilizarea tot mai frecventă a probelor colective, reprezintă un pas înainte în evoluția metodelor de supraveghere a bolilor (ROTOLO și colab., 2018). În mod special, colectarea laptelui din tanc, pare să fie o opțiune atractivă pentru programele de monitorizare, sau în cazul determinării statusului de boală al turmei (SEKIYA și colab., 2013). Acest mod de prelevare a probelor este o alternativă facilă, ce economisește timp, proba colectivă fiind reprezentativă pentru toate animalele lactante din efectiv (GARCIA-PEREZ și colab., 2009).

În România, datele epidemiologice privind rata infectării cu SRLV sunt incomplete, fiind puține date disponibile la nivel național (POTARNICHE și colab., 2020). În aceste circumstanțe, o imagine epidemiologică completă cu hărți ale distribuției infecției cu SRLV poate fi obținută prin investigații extinse la nivel național, folosind metode de diagnostic eficiente din punct de vedere economic.

Cu toate că prezența infecției cu SRLV în România este o certitudine, sunt puține date în ceea ce privește epidemiologia acesteia. Din aceste motive, această teza are următoarele obiective:

- de a rezuma informații actuale în ceea ce privește statusul epidemiologic al infecției cu SRLV în cadrul populației de caprine din România și de a prezenta incidența AEC în perioada 2008-2019;
- de a stabili dacă probele de lapte pot fi folosite ca material alternativ probelor de ser pentru detecția infecției cu SRLV;
- de a investiga fezabilitatea testării laptelui din tanc pentru diagnosticul infecției cu SRLV;
- de a estima prevalența AEC în 8 județe din Transilvania și zonele limitrofe folosind ca material laptele colectiv (din tanc);

Studiile prezentate în cadrul tezei au fost efectuate pe perioada doctoratului (2016-2020), în cadrul a două universități, una din România, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca, Facultatea de Medicină Veterinară, Departamentul de Boli Infecțioase și Medicină Preventivă, și a doua din Polonia, Universitatea de Științe ale Vieții din Varșovia, Institutul de Medicină Veterinară, Divizia de Epidemiologie și Economie Veterinară.

Teza intitulată “Testarea serologică a probelor de lapte individuale și colective pentru investigarea prevalenței artritei-encefalitei (AEC) în România” este structurată în două părți principale: stadiul actual al cunoașterii ce acoperă trei capitole și contribuția personală care cuprinde 10 capitole. Teza cuprinde 117 pagini, incluzând 21 de tabele, 35 de figuri și 250 de referințe bibliografice.

Prima parte (Stadiul actual al cunoașterii), rezumă informații din literatura de specialitate despre caracteristicile lentivirusurilor rumegătoarelor mici (SRLV), despre epidemiologia și patogeniza artritei-encefalitei caprine, precum și despre diagnosticul și strategiile de control ale bolii. **Capitolul 1** conține informații despre istoricul SRLV, etiologie și taxonomie, caracteristicile generale ale lentivirusurilor și diversitatea lor genetică. **Capitolul 2** include date despre distribuția bolii, susceptibilitatea gazdelor, căile de transmitere, patogeniză, răspunsul gazdei și tabloul clinic al bolii. **Capitolul 3** prezintă date din literatură în ceea ce privește diagnosticul și diagnosticul diferențial, tratamentul, prevenția și strategiile de control utilizate pentru limitarea răspândirii bolii.

A doua parte (Contribuția proprie) e structurată în 10 capitole și include obiectivele tezei (**Capitolul 4**), urmate de cercetarea propriu-zisă descrisă în **Capitolele 5-8**. Concluziile generale și recomandările sunt prezentate în **Capitolul 9**, iar originalitatea și contribuțiile inovative în **Capitolul 10**. Sursele bibliografice citate sunt reprezentate de 250 de titluri.

Ținând cont de faptul că singurele date despre infecția cu SRLV a caprelor din România sunt publicate în jurnale locale fără vizibilitate bună în comunitatea științifică internațională, scopul **Capitolului 5** a fost acela de a colecta toate informațiile disponibile, publicate până în prezent, privitoare la statusul epidemiologic al AEC în România, folosind baze de date electronice. Mai mult decât atât, au fost analizate și datele oferite de Organizația Internațională de Epizootii (OIE) în ceea ce privește incidența bolii în perioada 2008-2019. În România, au fost publicate doar cinci studii cu privire la infecția cu SRLV la capre. În plus, numărul de animale și de turme investigate în aceste studii a fost redus, în unele județe fiind testată o singură turmă. În toate aceste studii au fost utilizate metode serologice, pentru diagnostic. Seroprevalența adevărată a AEC a fost estimată în 13 din 42 de județe (31%) și a variat între 0,4% și 40%. Pe baza datelor furnizate de OIE, AEC a fost raportată între 2008 și 2019 în 14 județe din România (33.33%), însumând 182 de focare de boală. Datele raportate în literatură sunt în contradicție cu situația raportată de ANSVSA din România. Absența programelor de control a SRLV reprezintă bariera majoră în limitarea răspândirii bolii la nivel național. Autoritățile competente din România ar trebui să inițieze un program de supraveghere a bolii, pentru a determina statusul epidemiologic actual, ce reprezintă pasul cheie al oricărui program de control și eradicare.

Laptele a fost identificat ca fiind un înlocuitor adecvat pentru ser în ceea ce privește identificarea anticorpilor anti-SRLV (MOTHA și RALSTON, 1994; PLAZA și colab., 2009). Astfel, principalele obiective ale **Capitolului 6** au fost: a) testarea ipotezei referitoare la identificarea infecției cu SRLV la capre folosind probe de lapte în locul

probelor de sânge și estimarea concordanței între probele perechi; b) efectuarea unei analize comparative între trei kituri comerciale ELISA, pentru detectarea anticorpilor anti-SRLV. Pentru acestea, au fost colectate simultan, 420 de probe perechi (sânge și lapte) de la capre ce proveneau din 5 turme pentru lapte din Polonia. Trei din acestea au fost negative la infecția cu SRLV (A, B, C), iar celelalte două erau cunoscute ca incluzând animale infectate (D, E). Probele de ser și lactoser au fost testate pentru detectarea anticorpilor anti-SRLV utilizând trei kituri comerciale ELISA: ID Screen® MVV/CAEV Indirect (IDVet - Innovative Diagnostics, Grabels, France), IDEXX MVV/CAEV p28 Ab Screening (IDEXX Laboratories Inc, Westbrook, USA) și Small Ruminant Lentivirus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD – Veterinary Medical Research and Development, Pullman, USA). Acestea au fost utilizate conform instrucțiunilor date de producători. Coeficientul kappa a arătat o concordanță aproape perfectă - 93.7%, între probele perechi de ser și lactoser când s-a folosit kitul ELISA IDVet. Patru sute șapte din 420 probe au dat același rezultat în probele de ser și lactoser. Șapte din cele 235 de probe pozitive de ser au fost negative la testarea lactoserului, în timp ce șase probe care au fost negative ca ser, au dat un rezultat pozitiv pentru lactoser, ducând la o sensibilitate și specificitate relativă de 97%. Rezultate similare s-au obținut când s-a utilizat kitul ELISA de la IDEXX. Concordanța probelor a fost considerată aproape perfectă - coeficientul kappa fiind de 93.2%. Patru sute șase din 420 de probe au avut același rezultat la ambele tipuri de probe. Doar 3 probe au fost pozitive pentru ser și negative pentru lactoser, în timp ce 11 probe au fost negative în ser și pozitive în lactoser, rezultând o sensibilitate și specificitate relativă de 99% respectiv 94%. În cazul kitului ELISA VMRD, concordanța dintre probele perechi a fost moderată - 76.2%. În acest ultim caz, 370 din totalul de 420 de probe au produs același rezultat. În acest caz, 19 probe au obținut un rezultat pozitiv în ser și negativ pentru lactoser, iar 31 de probe au fost pozitive pentru lactoser, dar negative pentru ser. Sensibilitatea și specificitatea relativă au fost vizibil mai scăzute comparativ cu kiturile ELISA descrise anterior, fiind de 91 și respectiv 85%. În plus, a fost evaluată corelația rezultatelor numerice (valorilor S/P% și PI%) dintre probele de ser și lactoser în fiecare tip de ELISA. Similar rezultatelor calitative, kiturile ELISA IDVet și IDEXX au obținut o corelație directă intensă ($r=0.91$, respectiv $r=0.94$), în timp ce ELISA VMRD a arătat un nivel mai scăzut al corelației ($r=0.78$). Per ansamblu, s-a definit o corelație pozitivă semnificativă între probele de ser și lactoser. Pe baza acestor rezultate, putem concluziona că probele individuale de lapte (lactoser) ar putea fi folosite ca material alternativ pentru detectarea anticorpilor anti-SRLV la caprele lactante prin utilizarea kiturilor comerciale ELISA (IDVet, IDEXX, VMRD).

Testarea laptelui din tanc (probă colectivă) reprezintă o opțiune utilă și atractivă în cazul monitorizării efectivelor pentru lapte pentru diferite boli infecțioase, luând în considerare reducerea enormă a costurilor (BRINKHOF și colab., 2010). Cu toate acestea, există anumiți factori care pot influența nivelul anticorpilor din laptele din tanc, unul dintre cei mai importanți fiind seropozitivitatea relativă a animalelor (SEKIYA și

colab., 2013). Așadar, obiectivele **Capitolului 7** au fost următoarele: a) stabilirea corelației dintre seroprevalența din cadrul turmei (probe individuale de lactoser) și valorile S/P% (IDVet, IDEXX) sau PI% (VMRD) ale ELISA efectuate pe laptele din tanc și b) dezvoltarea unei ecuații care să permită calcularea prevalenței infecției cu SRLV în cadrul turmei, pe baza valorilor S/P% sau PI% a probelor de lapte din tanc. Toate probele de lactoser utilizate în acest studiu au fost testate anterior (**Capitolul 6**) folosind cele trei kituri ELISA comerciale: IDVet, IDEXX și VMRD. Pentru acest studiu, au fost create probe artificiale de lapte din tanc prin amestecarea unor cantități egale de lapte provenite de la capre cu status cunoscut al infecției cu SRLV. În acest sens, au fost utilizate: i) 100 de probe individuale de lapte pozitive care provin de la capre identificate anterior ca fiind pozitive la toate cele 3 kituri ELISA (aplicate probelor de ser): IDVet (S/P% > 300%), IDEXX (S/P% > 300%), și VMRD (PI% > 50%); ii) 100 de probe individuale negative care provin de la capre identificate anterior ca fiind negative în toate kiturile ELISA (aplicate probelor de ser): IDVet (S/P% > 300%), IDEXX (S/P% > 300%), și VMRD (PI% > 50%). Astfel, au fost create 101 probe artificiale de lapte « de tanc », cu un procent crescător de probe individuale pozitive (de la 0% la 100%, crescând pentru fiecare probă cu câte 1%). Din fiecare probă individuală de lapte, s-au utilizat câte 10 μ l pentru a obține probe colective de câte 1 ml volum (10 μ l x 100 probe). În plus, pentru a determina cea mai bună limită pentru testarea probelor colective, au fost create alte 94 de probe artificiale negative. În acest scop, au fost selectate 169 de probe individuale de lapte care provin de la capre identificate anterior ca fiind negative în toate kiturile ELISA (efectuate pe ser): IDVet (S/P% < 50%), IDEXX (S/P% < 110%) și VMRD (PI% < 35%). De fiecare dată s-au ales în mod aleatoriu câte 10 probe de lactoser și s-au extras câte 40 μ l pentru a crea probe artificiale negative de lapte colectiv de 400 μ l (40 μ l x 10 probe). Studiul nostru a indicat o corelație puternică și semnificativă ($p < 0.001$) între concentrația anticorpilor anti-SRLV în probelor individuale de lactoser și rezultatul numeric (S/P% și PI%) al tuturor celor trei ELISA efectuate pe probe colective de lapte din tanc. Cea mai bună corelație a fost găsită în cazul kitului ELISA IDVet ($r=0.93$), urmat de IDEXX ($r=0.87$) și VMRD ($r=0.84$). Funcția exponențială a descris această relație considerabil mai bine decât funcția liniară. Această observație a permis estimarea prevalenței infecției cu SRLV în cadrul efectivului folosind rezultatele testelor ELISA efectuate pe probe de lapte din tanc, ceea ce reprezintă o abordare nouă care permite nu numai detectarea infecției în efectiv, ci și identificarea (cu un oarecare grad de incertitudine) procentului de animale infectate.

Având în vedere lipsa datelor epidemiologice cu privire la prevalența AEC la caprele din România, scopul **Capitolului 8** a fost de a obține date epidemiologice (prevalența din cadrul efectivului, precum și prevalența la nivel de turmă) cu privire la infecția cu SRLV prin detectarea anticorpilor din probe de lapte colectiv (din tanc) de la

efective de capre din Transilvania și zonele limitrofe. Pentru aceasta, a fost utilizat un test ELISA indirect (IDVet) pentru detectarea anticorpilor anti-SRLV din probe de lapte colectiv. Studiul a fost realizat în perioada 2019-2020 în Transilvania, una dintre cele mai importante regiuni pentru producția de lapte de capră. În total au fost colectate, în mod aleator 25 de probe de lapte din tanc de la turme de capre, provenind din 8 județe (Bihor, Bistrița-Năsăud, Brașov, Cluj, Maramureș, Mureș, Sălaj, Vâlcea). Situația acestor efective în ceea ce privește AEC nu era cunoscută. Detectarea anticorpilor anti-SRLV din probele de lapte din tanc a fost realizată cu ajutorul unui kit ELISA comercial (ID Screen® MVV/CAEV Indirect, IDVet – Innovative Diagnostics, Grabels, France), urmând instrucțiunile producătorului. Pe baza rezultatele obținute în studiul anterior (**Capitolul 7**), limita de detecție a kitului ELISA IDVet efectuată pe probe de lapte din tanc a fost de 5.9%. La această valoare, Se a fost de 100% (CI 95%:96.3%, 100%) și Sp a fost de 97.9% (CI 95%: 92.6%, 99.4%). Teoretic, fiecare probă de lapte din tanc cu o valoare a S/P% mai mică de 5.9, provine cu certitudine din turme negative. Prevalența din cadrul efectivului a fost estimată folosind ecuația exponențială: $P_{SRLV} = 0.0603 \times \exp(0.0093 \times S/P\%)$. Infecția cu SRLV a fost identificată la 20 din 25 de efective, ceea ce indică o prevalență aparentă la nivel de turmă de 80.0% (CI 95%: 60.9%, 91.1%) și o prevalență adevărată de 79.8% (CI 95%: 60.6%, 91.0%). Anticorpi specifici anti-SRLV au fost identificați în probe provenind din 5 județe (62.5%) din cele 8 investigate. Prevalența în cadrul efectivelor a variat între 6.4% și 100%. Acesta este cel mai extins studiu efectuat în România pentru detectarea infecției cu SRLV la capre, și este prima investigație privind infecția cu SRLV în această parte a țării. Rezultatele au arătat că testul kitul ELISA IDVet efectuat pe probe de lapte colectat din tanc ar putea fi o variantă potrivită pentru supravegherea și monitorizarea infecției cu SRLV la nivel de turmă (pozitiv sau negativ). Testarea laptelui din tanc ar putea fi utilizată și pentru a estima prevalența infecției cu SRLV la efectivele de capre de lapte.

BIBLIOGRAFIE

1. ADJADJ, N.R., VICCA, J., MICHIELS, R., REGGE, N.D., 2019, (Non-)Sense of Milk Testing in Small Ruminant Lentivirus Control Programs in Goats. Comparative Analysis of Antibody Detection and Molecular Diagnosis in Blood and Milk, *Viruses*, 12(3):1-14
2. BALBIN, M.M., MINGALA, C.N., 2017, Caprine Arthritis-Encephalitis, In: BAYRY, J., (editor), *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock*, Springer, 191-213
3. BRINKHOF, J.M.A., HOUWERS, D.J., MOLL, L., DERCKSEN, D., VAN MAAREN, C., 2010, Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing, *Vet Microbiol*, 142:193-198
4. CIRONE, F., MAGGIOLINO, A., CIRILLI, M., SPOSATO, A., DE PALO, P., CIAPPETTA, G., PRATELLI, A., 2019, Small ruminant lentiviruses in goats in southern Italy: Serological evidence, risk factors and implementation of control programs, *Vet Microbiol*, 228:143-146
5. COST ACTION (834), 2002, Lentiviruses of sheep and goats: pathogenesis, diagnosis and prevention. Available at: <http://cost.eu>
6. CZOPOWICZ, M., SZALUS-JORDANOW, O., MICKIEWICZ, M., MOROZ, A., WITKOWSKI, L., MORKOWSKA-DANIEL, I., RECYNSKA, D., BAGNICKA, E., KABA, J., 2018, Decline in maternal antibodies to small ruminant lentivirus in goat kids, *Anim Sci J*, 89:1364-1370
7. GARCIA-PEREZ, A.L., ASTOBIZA, I., BARANDIKA, J.F., ATXAERANDIO, R., HURTADO, A., JUSTE, R.A., 2009, Short communication: Investigation of Coxiella burnetii occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination, *J Dairy Sci*, 92:1581-1584
8. GAZZONIS, A.L., ZANZANI, S.A., STRADIOTTO, K., OLIVIERI, E., VILLA, L., MANFREDI, M.T., 2018, Toxoplasma Gondii Antibodies in Bulk Tank Milk Samples of Caprine Dairy Herds, *J Parasitol*, 104(5):560-565
9. HERRMANN-HOESING, L.M., 2010, Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses, *J Vet Diagn Invest*, 22:843-855
10. MINGUIJON, E., REINA, R., PEREZ, M., POLLEDO, L., VILLORIA, M., RAMIREZ, H., LEGINAGOIKOA, L., BADIOLA, J.J., GARCIA-MARIN, J.F., de ANDRES, D., LUJAN, L., AMORENA, B., JUSTE R.A., 2015, Small ruminant lentivirus infections and diseases, *Vet Microbiol*, 181: 75-89
11. MOTHA, J.M.X., RALSTON, J.C., 1994, Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk, *Vet Microbiol*, 38:359-367
12. OIE (World Animal Health Organisation), World Animal Health Information Database – WAHIS Interface, Paris, France. Available at: <http://www.oie.int/>
13. PERK, K., 1995, Characteristics of Ovine and Caprine lentivirus infections, *Leukemia*, 9:98-100
14. PETERHANS, E., GREENLAND, T., BADIOLA, J., HARKISS, J., BERTONI, G., AMORENA, B., ELIASZEWICZ, M., JUSTE, R.A., KRASSNIG, R., LAFONT, J.P., LENIHAN, P., PETURSSON, G., PRITCHARD, G., THORLEY, J., VITU, C., MORNEX, J.F., PEPIN, M., 2004, Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes, *Vet Res*, 35(3):257-274

15. PLAZA, M., SANCHEZ, A., CORRALES, J.C., DE LA FE, C., CONTRERAS, A., 2009, Caprine arthritis encephalitis virus diagnosed by ELISA in lactating goats using milk samples, *Small Rum Res*, 81:189-192
16. POTARNICHE, A.V., CERBU, C.G., CZOPOWICZ, M., SZALUS-JORDANOW, O., KABA, J., SPINU, M., 2020, The epidemiological background of small ruminant lentivirus infection in goats from Romania, *Vet World*, 13(7):1344-1350
17. ROTOLO, M.L., MAIN, R.G., ZIMMERMAN, J.J., 2018, Herd-level infectious disease surveillance of livestock populations using aggregate samples, *Anim Health Res Rev*, 19(1):53-64
18. RUIZ-FONS, F., ASTOBIZA, I., BARANDIKA, J.F., JUSTE, R.A., HURTADO, A., GARCIA-PEREZ, A.L., 2011, Measuring antibody levels in bulk-tank milk as an epidemiological tool for search for the status of *Coxiella burnetti* in dairy sheep, *Epidemiol Infect*, 139(10):1631-1636
19. SEKIYA, M., ZINTL, A., DOHERTY, M.L., 2013, Bulk milk ELISA and the diagnosis of parasite infections in dairy herds: a review, *Irish Vet J*, 66(14):1-12
20. SMITH, M.C., SHERMAN, D.M., 2009, *Goat Medicine 2nd edition*, Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 96-106