
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Interrelația *Parapoxvirus*-microbiom de infecție secundară-sistem imun la oi cu ectimă contagioasă

Doctorand: **Elisabeta Rafila Pastor**

Conducător de doctorat: **Prof. univ. dr. Marina Spînu**



REZUMAT

Creșterea ovinelor este o activitate tradițională, strâns legată de istoria populației românești. Păstoritul, o latură importantă a agriculturii românești, a asigurat necesarul de carne și continuitatea civilizației pe meleagurile mioritice. Carnea, produsele din lapte și pielea obținute din creșterea ovinelor asigură subzistența gospodăriilor, realizarea unor schimburi comerciale și stabilitatea forței de muncă în zona rurală. Carnea de ovine reprezintă unul din produsele de origine animală cu rată mare de export din România, sectorul de creștere a ovinelor înregistrând o dezvoltare semnificativă, prin asigurarea necesarului de consum intern și crearea de disponibilități pentru export. Varietatea produselor obținute din creșterea ovinelor a constituit și constituie un avantaj economic deosebit de important (Gulyaz și colab., 2020).

Ectima contagioasă este o boală infectocontagioasă a oilor și caprelor, cu evoluție acută, produsă de un virus epiteliotrop, caracterizată clinic prin erupție veziculopustuloasă, cu localizări predominant bucale, podale, genitale, mamare și oculare (Moga și colab., 2005, Haig și Mercer, 1998). Boala este cunoscută și sub denumirea de dermatită pustulară contagioasă, dermatită labială infecțioasă, scabby mouth disease sau orf disease (Haig, 2006). Ectima contagioasă a era cunoscută încă din secolul al XVIII-lea, în Germania, faptul că e produsă de un virus a fost menționat prima oară de către Aynar în 1923, boala fiind denumită Chancre du mouton. În țara noastră, ectima contagioasă, a fost documentată pentru prima oară de Riegler în anul 1935 lângă București, însă crescătorii de ovine o cunoșteau dinainte sub denumirea de "caș la gură". Primii care au studiat ectima contagioasă în țara noastră au fost Grigore, 1955, Verdeș și col. (1960), Ivana Filea (1968). În prezent ectima contagioasă evoluează endemic pe toate continentele, dar cu incidență mai mare în Australia și Noua Zeelandă, Asia. În Europa existența ectimei contagioase a fost semnalată în Franța, Norvegia și Grecia, în celelalte țări, inclusiv în țara noastră, înregistrându-se numai ca focare izolate (Moga, 2005). Conform Organizației Mondiale a Sănătății animalelor (OIE), ectima contagioasă este o boală infecțioasă importantă fiind o zoonoză (Nadeem și colab., 2010). Virusul este prezent în țările în care se cresc ovine și caprine în întreaga lume. La om, leziunile rămân localizate, iar infecțiile la mâini sunt relativ frecvente la persoanele care lucrează în contact strâns cu animalele în industria creșterii ovinelor (Fleming și colab., 2015). Agentul cauzal al EC este un virus epiteliotrop, care conține ADN și este încadrat în familia *Poxviridae*, genul *Parapoxvirus*, sub numele de Orf virus sau Contagious ecthyma virus, având

dimensiuni de 158 x 252 nm și morfologie asemănătoare cu virusul vaccinal (Vaccinia Virus) (Moga, 2005). Virusul ectimei contagioase, a fost investigat în mod extensiv în ultimii ani, datorită caracterului său zoonotic și a potențialului de a cauza infecții încrucișate între diverse specii (Hosamani și col. 2009, Damon, 2007). Fiind o boală extrem de contagioasă, ectima contagioasă, se propagă rapid în efectiv, uneori morbiditatea atingând și 100%, măbind astfel pierderile fermierilor. Leziunile se vindecă greu, deseori complicându-se cu infecții secundare, rezultând astfel pierderi și mai mari datorită costurilor generate de antibioticoterapie (Ravi și colab., 2000). Infecția cu virusul ectimei contagioase produce o scădere a randamentului de creștere și o rată redusă de conversie a furajului la ovinele la îngrășat, iar la miei, care sunt mai susceptibili, poate duce chiar la refuzul suptului și la moarte prin inanție (Gökce și colab., 2005). În cazul formelor mamare oile pot refuza să mai alăpteze. Datorită leziunilor care pot să apară la nivelul organelor genitale externe, sezonul de reproducție poate să fie compromis, rezultând astfel mai puțini miei în anul următor. Virusul ectimei contagioase este specia-tip a genului *Parapoxvirus*, din subfamilia *Chordopoxvirinae*, familia *Poxviridae*, fiind un virus epiteliotrop (Moga și colab., 2005, Karki și colab., 2019). Dintre animalele domestice, virusul afectează, ovinele, caprinele, camelidele domestice și alte ungulate domestice, chiar și câinii (McGuire și colab., 2012). Se pare că, dintre toate speciile domestice gazdă cele mai afectate sunt caprinele, în special iezii (Buttner și colab., 2002). Cele mai sensibile sunt animalele tinere, în special în primul an de viață. Ectima contagioasă este o boală care afectează de obicei animalele domestice, fiind diagnosticată apoi și la oameni. Cu timpul, ectima contagioasă a început să apară și la specii de animale sălbatice, datorită contactului direct sau indirect cu ovine sau caprine afectate, vaccinate sau trecute prin boală. Perioada de incubație a bolii este de 6-8 zile. Ectima contagioasă debutează, de obicei, prin apariția de macule, papule, vezicule, pustule și cicatrici, care se vindecă și se desprind în termen de aproximativ 1-4 săptămâni (Pugh și Baird, 2012). S-a semnalat și o formă tipică categoriilor de vârstă de 10-21 zile, care este o formă mai ușoară și care se poate vindeca în 7 zile. La miei, evoluția bolii este uneori foarte gravă, supraacută, cu alterarea stării generale și edemul botului, urmate de o erupție veziculopustuloasă confluentă și masivă, pe buze și mucoasa bucală (Trylan și colab., 2013), cu adenopatie regională. Uneori, din cauza extinderii leziunilor pe mucoasa respiratorie și digestivă, apar simptome de bronhopneumonie sau enterită, cu sfârșit letal în 36-40 ore. De obicei însă, evoluția dermatitei pustulare contagioase este acută sau subacută, cu localizări bucale, peribucale și în mai mică măsură podale, mamare sau oculare, fără afectarea stării generale (Cargnelutti și colab., 2011). În cazul localizării masive a leziunilor pe mucoasa bucală, este utilă acordarea asistenței veterinare prin alimentarea artificială, la biberon, și badijonarea leziunilor bucale, eventual ușor raclate, cu substanțe antiseptice (tinctură de iod glicerinată 50%, albastru de metilen etc.), eventual antibioticoterapie. O importanță deosebită trebuie

acordată, în special, suprainfecțiilor cu agenți bacterieni, în acest caz recomandându-se tratamentul cu antibiotice injectabile, după testarea rezistenței la antibiotic a germenilor de suprainfecție. Similar cu alți membri ai familiei poxviridae, răspunsul imun la virusul ectimei contagioase este mediat atât de răspunsurile imune înnăscute, cât și de cele adaptative. După vaccinarea cu virusul viu, apariția anticorpilor neutralizanți se produce după prima săptămână de la vaccinare și persistă de ani de zile aceștia putând fi stimulați prin revaccinare (Bala și colab., 2018). La ovinele cu infecții recente s-a pus în evidență prezența IgM. Anticorpilor inhibanți ai hemaglutininei apar imediat după infecție, apoi scad treptat la niveluri scăzute după câțiva ani. Cu toate acestea, asocierea dintre anticorpilor circulanți titrurile acestora și nivelul de protecție împotriva virusului ectimei contagioase sunt incerte. Imunitatea mediată celular are un rol major în răspunsul imun. Se știe că parapoxvirusurile stimulează imunitatea locală răspunsurile imune mediate celulelor prezintă o mai mare importanță în eliminarea virusului din stratul dermic. Răspunsul imun în cazul ectimei contagioase este diferit de răspunsurile imune la alte infecții virale în care anticorpilor și imunitatea mediată celular joacă roluri foarte importante în timpul recuperării și protecției împotriva reinfecției. În comparație în cazul infecției cu ectima contagioasă imunitatea mediată celular a apărut înaintea anticorpilor.

Teza intitulată **“Interrelația Parapoxvirus-microbiom de infecție secundară-sistem imun la oi cu ectimă contagioasă”** este structurată în două mari părți și anume: stadiul actual al cunoașterii care cuprinde trei capitole și cercetări proprii care cuprinde nouă capitole. Lucrarea conține 159 pagini, incluzând 46 de tabele, 57 de figuri și 221 referințe bibliografice. Prima parte, Stadiul actual al cunoașterii, prezintă informații din literatura actuală de specialitate, prezentând generalități despre ectima contagioasă cum ar fi etiopatogenia virusului, varietățile care circulă în natură, tratament și profilaxie, metode de diagnostic, elemente de imunologie. **Capitolul I** prezintă informații virusologice (etiologie și taxonomie), caracteristici structurale, metode de diagnostic și evidențiere a virusului ectimei contagioase. **Capitolul II** cuprinde date despre speciile gazdă ale virusului, tulpinile care circulă la nivel mondial, patogeneza, tratament, profilaxie, combatere și producerea de vaccinuri. Tot în acest capitol este tratat și subiectul infecțiilor secundare (bacteriene, virale sau parazitare). **Capitolul III** descrie particularități ale sistemului imun și ale efectorilor imunologici la ovine respectiv răspunsul imun în cazul infecției cu virusul ectimei contagioase. În acest capitol sunt prezentate componentele sistemului imun care intervin în răspunsul imun, respectiv modificările pe care le declanșează virusul odată pătruns în organism. Tot aici sunt prezentate și mecanismele prin care virusul ectimei contagioase ocolește sistemul de apărare al organismului gazdă.

Partea a doua, Cercetări proprii, structurată pe nouă capitole, începe cu scopul lucrării (**Capitolul IV**), aici fiind prezentată motivația cercetării și descrierea motivelor pentru care s-au folosit anumite determinări din cadrul cercetărilor proprii. În **Capitolul V** este prezentat studiul epidemiologic: structura efectivelor de ovine de la care s-au recoltat probele necesare realizării prezentei teze de doctorat, prezentându-se categoriile de vârstă și sex afectate, gravitatea semnelor clinice. Vârsta, sexul și gravitatea semnelor clinice s-au evaluat și din punct de vedere statistic, predominând infecțiile la femele, vârsta ovinelor afectate fiind variabilă. Semnele clinice care au predominat au fost cele ușoare, însă din punct de vedere statistic tendința de evoluție era spre forme medii. Tot în acest capitol se abordează și contextul în care a apărut boala și situația sanitară veterinară a efectivului. Măsurile care s-au luat au fost cele generale de izolare a ovinelor bolnave și acordarea tratamentului simptomatic respective antibioticoterapia după caz. Materialul biologic utilizat la realizarea tezei de doctorat a provenit de la 96 ovine cu semne clinice 18 probe de la un lot considerat lot martor. În **Capitolul VI** sunt prezentate materialele biologice utilizate la fiecare determinare după cum urmează:

- pentru determinările microbiologice s-au folosit tampoane îmbibate în ser fiziologic steril iar probele în număr de 96 s-au depozitat în recipient sterile.

- pentru testul PCR s-au recoltat tot 96 de probe, reprezentate de cruste de pe leziunile de ectimă contagioasă.

- pentru microscopia electronică s-au folosit crustele recoltate pentru tehnica PCR care au ieșit pozitive pentru ectima contagioasă.

- pentru testele imunologice s-au recoltat 96 de probe în vacutainere sterile, testându-se doar probele nehemolizate, în număr de 48 de probe. În paralel s-au recoltat probe și de la lotul martor, 40 de probe, supunându-se testării 18 probe nehemolizate.

Toate probele s-au recoltat evitându-se traumatizarea suplimentară a animalelor și s-au împățit pe loturi în funcție de turma de la care provin, etichetându-se astfel încât să se poată face legătura dintre animal, probă și rezultat. Transportul probelor s-a realizat evitându-se șocul termic sau de altă natură, în condiții de refrigerare, depozitându-se apoi în condiții potrivite probelor. Loturile de la care provin probele sunt în număr de 5 plus lotul martor.

Tehnicile la care s-au supus probele sunt prezentate în **Capitolul VII**, pentru determinările microbiologice folosindu-se metodele clasice bacteriologice și bacterioscopice urmărindu-se caracteristicile coloniilor izolate, caracteristicile biochimice (testul, catalazei, fermentarea manitolului, prezența lecitinazei etc.), și modul în care se prezintă bacteriile în câmpul microscopului. Pentru diagnostic s-a folosit testul PCR și microscopia electronică prin transmisie. În cadrul determinărilor imunologice s-au utilizat metodele spectrofotometrice de cuantificare ale nivelelor complexelor immune circulante (Metoda Haskova) și ale imunoglobulinelor totale

(metoda cu reactiv Șerb). Analizele statistice s-au realizat cu ajutorul programului GraphPad Prism 8, urmărindu-se evoluția și tendințele de evoluție ale parametrilor testați. S-au efectuat și antibiograme prin metoda Kirby-Bauer folosindu-se microcomprimate cu gntamicină, trimetoprim, cefuroxim, amoxicilină cu acid clavulanic, enrofloxacină, ciprofloxacină și penicilină.

Capitolul VIII abordează rezultatele tehnicilor de diagnostic folosite în cadrul lucrării. La tehnica PCR 33 probe au reacționat pozitiv pentru ectima contagioasă. Determinarea s-a realizat în baza prezenței fracțiunii B2L-gena capsidară. Din probele testate pozitiv s-a efectuat microscopia electronică, prezența virusului fiind detectată doar în două probe. Tot în acest capitol se tratează diferența dintre tehnicile PCR și microscopia electronică, evidențiindu-se avantajele și dezavantajele fiecăreia. Tehnica PCR s-a dovedit a fi mai avansată prin prisma cheltuielilor, timpului de lucru și sensibilității, totuși pozitivarea a doar 33 probe indicând existența unei cantități infime de material genetic viral, ceea ce poate denota faptul că boala era în faza de remisie. Numărul mic de probe pozitive la microscopia electronică evidențiază unul din neajunsurile acestei tehnici și anume necesitatea prezenței virusului intact. Oricum prezența unui număr mare de bacterii indica faptul că virusul a dispărut din țesuturi fiind înlocuit de floră de suprainfecție.

În **Capitolul IX** sunt prezentate rezultatele testelor microbiologice și a determinărilor particularităților biochimice efectuate și teste de diferențiere față de alte bacterii cu caracteristici asemănătoare. S-au evidențiat bacteriile *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Au predominat infecțiile secundare cu *S.aureus* (58%), iar dintre probele analizate 41,67% prezentau infecții secundare. S-au identificat și probe infectate cu două specii bacteriene (30 din totalul de 40 de probe cu infecții secundare). S-a evaluat și ponderea probelor cu infecții secundare pe loturi experimentale cele mai multe probe suprainfectate provenind de la turma nr.1.

Evaluarea rezistenței la antibiotice a relevat infecția unor antibiotice utilizate în mod curent în tratamentele animalelor (penicilina sau amoxicilina cu acid clavulanic). Eficiența antibioticelor a fost abordată și din punct de vedere statistic efectuându-se analize de statistic descriptivă. S-a constatat că o valoare medie a diametrului zonelor de inhibiție nu caracterizează în totalitate eficiența unui antibiotic. Urmărindu-se valori cum ar fi deviația standard sau coeficientul de variabilitate s-a ajuns la concluzia că la un nivel de probabilitate de 95% mediile obținute nu caracterizau tendințele de evoluție din punct de vedere statistic. Această evaluare s-a realizat și în cadrul turmelor luate separat și s-a observat că valorile diametrelor zonelor de inhibiție variază de la o turmă la alta, ajungându-se la concluzia că valorile obținute trebuie analizate și interpretate separat pentru fiecare turmă deoarece și

distribuția florei de suprainfecție diferea de la o turmă la alta. Cele mai stabile rezultate s-au obținut la testarea gentamicinei și trimetoprimului. Pentru evaluarea rezistenței multiple la antibiotice s-a calculat indicele MAR, reprezentând raportul dintre numărul de antibiotice la care a fost testată rezistentă o bacterie și numărul total de antibiotice utilizate pentru testare. Valorile medii ale indicelui MAR s-au situat în jurul rezistenței la două antibiotice cu excepția *P.aeruginosa* care prezenta rezistență la 3 antibiotice. Analizând din punct de vedere statistic deviațiile standard și coeficienții de variabilitate indicau cu o probabilitate de 95% tendința de a fi rezistente la 2-3 antibiotice a bacteriilor izolate, respectiv 3-4 bacterii în cazul tulpinilor de *P.aeruginosa* izolate. Compararea caracteristicilor individuale ale ovinelor de la care provin probele (sex, vârstă, semne clinice) cu indicii MAR au demonstrat că nu există corelație între aceste caracteristici și indicii MAR, ceea ce denotă faptul că indicii MAR sunt influențați strict de caracteristicile bacteriilor izolate.

În **Capitolul X** sunt descrise evoluția CIC și Ig totale în cadrul turmelor cu și fără infecții secundare folosindu-se indicii de corelație și testul t. În urma investigațiilor statistice s-a ajuns la concluzia că nu există diferențe între evoluția CIC și Ig totale la ovinele cu și fără infecții secundare, valorile medii fiind apropiate la fel și tendințele lor de evoluție. Ceea ce înseamnă că valorile acestor doi parametri imunologici nu sunt date de prezența florei de suprainfecție.

Apoi, s-a abordat și evoluția acestor parametri și în cadrul celor 4 turme experimentale luate în calcul pentru dozarea CIC și Ig totale. În fiecare turmă ca și în turma martor acești doi parametri prezentau o variabilitate mare, din acest motiv am realizat corelația dintre vârstă semnele clinice și sexul ovinelor pentru care am dozat CIC și Ig totale. S-au efectuat corelații, teste t și teste ANOVA pentru toate turmele. S-au observat corelații între sexul animalelor și Ig, astfel valorile Ig aveau tendința de a fi mai ridicate în cazul femelelor. Valorile Ig totale și CIC comparate cu turma martor nu au returnat existența unei diferențe semnificative ceea ce indica faptul că ori turma martor a mai avut contact cu virusul ori turmele experimentale se aflau în faza de debut a bolii când virusul a dispărut din țesuturi, boala fiind în faza de remisie. O diferență semnificativă s-a observat în cazul comparării valorilor dintre turmele 1 și 2 cu turma nr.4, la fel între turma nr.4 și turma martor, ceea ce indică faptul că există posibilitatea ca turma nr.4 să fie în faza de debut a bolii. Faptul că Ig totale prezentau variații nesemnificative subliniază încă odată slaba implicare a imunoglobulinelor în mecanismul de apărare împotriva ectimei contagioase, ele apărând tardiv în țesuturile afectate și dispărând la fel de rapid. Știind că în cazul ectimei contagioase, conform studiilor actuale, imunitatea locală joacă un rol important în apărarea împotriva virusului (Hajkazemi și colab., 2016, Haig și colab., 2006) și ținând cont și de faptul că imunitatea sistemică împotriva virusului ectimei contagioase este de foarte scurtă durată (Karki și colab., 2019), în mod normal nivelul de Ig totale ar trebui să rămână constant și să crească până după trecerea prin boală, orice modificare privind creșterea

nivelului de Ig sau al CIC datorându-se altor factori. În urma calculelor statistice efectuate și a rezultatelor obținute mai sus putem conluziona faptul că nivelul complexelor imune circulante a fost mai mare la ovinele cu infecții secundare decât la ovinele fără infecții secundare, tendința fiind de obținere a unor valori mai mari în cazul infecțiilor secundare. Dacă luăm în considerare și faptul că majoritatea ovinelor luate în calcul la testare nu depășeau vârsta de un an (31 de ovine) și ectima contagioasă nu a mai evoluat în zona de unde s-au recoltat probele de mulți ani, putem ajunge la concluzia că nivelul crescut al complexelor imune circulante se asociază cu existența infecțiilor secundare. Putem susține acest fapt și datorită caracteristicilor unice ale virusului ectimei contagioase de a se "camufla" în celulele epiteliale afectate evitând mecanismele de apărare ale organismului, momentul în care are loc un răspuns sistemic din partea organismului fiind unul destul de tardiv iar producția de anticorpi se instalează în momentul în care nivelul virusului scade local, complexe imune circulante prezente în sânge sunt produsul infecțiilor secundare. Oricum faptul că ovinele sunt clinic sănătoase nu exclude faptul că acestea să fi avut forme ușoare de ectimă contagioasă și să se fi vindecat fără sechele sau să fie purtătoare ale virusului. Evaluarea nivelurilor Ig totale și CIC nu reprezintă o metodă de diagnostic, compararea acestor valori cu valori ale unei turme martor sau cu valori obținute la ovine cu infecții secundare ne poate însă furniza informații privind stadiul bolii și asupra faptului că modificările nivelurilor acestora se datora sau nu prezenței virusului ectimei contagioase.

În **Capitolul XI** și **XII** sunt prezentate concluziile generale respectiv originalitatea și inovativitatea tezei de doctorat. Astfel, tendința de a se infecta cu virusul ectimei contagioase au prezentat-o îndeosebi femelele. Toate categoriile de vârstă au fost afectate indicând faptul că animalele se pot reinfecta chiar și după ce au trecut prin boală. O frecvență mai mare a evoluției ectimei contagioase s-a constatat la femele și la tineret. Tendința spre o evoluție moderată indică faptul că ovinele nu au mai trecut prin boală. Dacă e să ținem cont de declarațiile proprietarilor probabil că efectivele se aflau la prima infecție. Având în vedere numărul mare de bacterii ca s-au observat în câmpul microscopului electronic și faptul că doar din două probe s-a decelat prezența virusului putem spune că boala se afla în stadiu de remisie a infecției virale și de suprainfecție cu bacterii. Se confirmă informațiile din literatură conform cărora infecțiile secundare în cazul infecției cu virusul ectimei contagioase sunt frecvente, virusul creând porți de intrare pentru bacteriile oportuniste. Compararea celor două metode de diagnostic PCR și microscopia electronică a conirmat superioritatea sensibilității testării PCR față de microscopia electronică. În ceea ce privește infecțiile secundare și rezistența la antibioticoterapie se confirmă faptul că rezistența multiplă la antibiotice este încă o provocare pentru medicina modernă.

Numărul mare de tulpini cu rezistență la 2-3 antibiotice a reprezentat o provocare în orientarea tratamentului. Pentru a institui o schemă de antibioticoterapie corectă trebuie să ținem cont și de caracteristicile turmelor afectate. Astfel propun ca tratamentul să se facă cu respectarea caracteristicilor de evoluție a antibiogramelor diferențiat. Tendința de evoluție a andicilor MAR comparativ între speciile de bacterii izolate a fost aceeași cu excepția *P.aeruginosa* confirmându-se faptul că această specie de bacterie trebuie tratată cu precauție. Clacularea în sine doar a indicilor MAR și a diametrelor zonelor de inhibiție trebuie evaluată și din punct de vedere statistic, indicatorii statistici fiind valoroși în ceea ce privește tendințele de evoluție a diametrelor zonelor de inhibiție și a indicilor MAR. În final putem să concluzionăm că testarea sensibilității la antibiotice și calcularea indicilor MAR nu reprezintă o informație sigură în ceea ce privește instituirea unui tratament, astfel dacă se întâlnește o bacterie rebelă la tratament suplimentar, este indicat să se testeze și tulpina incriminată, din punct de vedere genetic. Aceste testări genetice necesită mult timp și costuri ridicate cea mai la îndemână metodă de prevenire multirezistenței la antibiotic fiind utilizarea judicioasă a antibioticelor, strict în urma unei prescripții medicale.

Având în vedere caracteristicile unice ale reacției sistemului imun la invazia cu virusul ectimei contagioase și frecvența ridicată a infecțiilor secundare după cum se relatează în literatura de specialitate Karki și colab., 2019, Kumar și colab., 2015, Zhang și colab., 2010, prezenta lucrare și-a propus să efectueze un studiu privind variabilitatea valorilor complexelor imune circulante și a imunoglobulinelor totale la grupurile de ovine la care s-au izolat bacterii de suprainfecție comparativ cu grupurile de ovine care nu prezintă floră de suprainfecție. În literatura de specialitate nu am găsit o astfel de abordare astfel am considerat oportună urmărirea evoluției acestor parametri. Ca o concluzie generală putem să spunem că nivelurile acestor doi parametri (Ig totale și CIC), pot fi influențate de caracteristicile individuale ale ovinelor afectate de ectima contagioasă și variază în comparație cu animalele clinic sănătoase.

Vârsta animalului la care se determină Ig totale poate influența nivelurile acestora, valori mai mari apărând la tineret. Oricum faptul că ovinele sunt clinic sănătoase nu exclude faptul că acestea să fi avut forme ușoare de ectimă contagioasă și să se fi vindecat fără sechele sau să fie purtătoare ale virusului. Evaluarea nivelurilor Ig totale și CIC nu reprezintă o metodă de diagnostic, compararea acestor valori cu valori ale unei turme martor sau cu valori obținute la ovine cu infecții secundare ne poate însă furniza informații privind stadiul bolii și asupra faptului că modificările nivelurilor acestora se datora sau nu prezenței virusului ectimei contagioase.

Originalitatea tezei constă în următoarele:

- În raport cu bibliografia disponibilă, lucrarea reprezintă prima abordare la nivel mondial a interdependenței dintre indicatorii epidemiologici (sex,

vârstă), clinici (gravitatea leziunilor) și indicii MAR ai florei microbiene de suprainfecție la ovinele cu ectimă contagioasă.

- Pentru prima oară la nivel mondial, în această teză de doctorat s-a dovedit prin cuantificarea funcțională a fiecărei categorii de mecanisme implicate în producerea bolii (prezența virală, bacteriomul de infecție secundară, răspunsul imun umoral nespecific) că profilul etiopatogenetic complex lezional, microbial și imunologic este susținut statistic.
- Lucrarea este primul studiu la nivel mondial care susține statistic relația dintre parametri imunologici (nivelele Ig totale, CIC), indicatorii epidemiologici (sexul, vârsta animalelor) și anatomo-clinici (gravitatea leziunilor) la animalele bolnave de ectimă contagioasă.
- Lucrarea abordează comparativ, în premieră națională, cu evidențierea avantajelor și dezavantajelor, două metode de diagnostic al ectimei contagioase - PCR și microscopia electronică.
- Studiul prezent a abordat în premieră națională evaluarea corelativă a rezultatelor testelor PCR cu semne clinice de ectimă contagioasă și cu prezența florei de suprainfecție, oferind orientare diagnostică și terapeutică.

BIBLIOGRAFIE

1. Bala J., Balakrishnan K., Abdullah A., Mohamed R., Haron A. W., Firdaus F., Noordin M. M., Mohd L., Mohd L. (2018). The re-emerging of orf virus infection: A call for surveillance, vaccination and effective control measures. *Microbial Pathogenesis*. 120. 10.1016/j.micpath.2018.04.057.
2. Buttner M. , Rziha H.G. (2002) Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome, *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public health*, 49:7-16.
3. Cargnelutti J.F., Masude E.K., Martins M., Diel D.G., Rock D.L., Weiblen R., Floeres E.F. (2011). Virological and clinico-pathological features of orf virus infection in experimentally infected rabbits and mice, *Microbial Pathogenesis*, 50(1):56-62.
4. Damon I. (2007) Poxviridae and their replication. In *Fields Virology* Raven Press Ltd. New York:2079-2081.
5. Fleming S.B., Wise L.M., Mercer A.A. (2015). Molecular genetic analysis of orf virus: A poxvirus that has adapted to skin, *Viruses* 7(3), 1505–1539.
6. Gokce H.I., Genc O., Gokce G. (2005). Sero-prevalence of Contagious Ecthyma in Lambs and Humans in Kars, Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29: 95-101.
7. Gülyaz V., Sarac F., Hasoksuz M., Uzar S. (2020). The use of rabbits in studies of immunity and safety of Contagious Ecthyma (CE) vaccine. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.* 2020; 31 (1): 75-81.
8. Haig D.M. (2006). Orf virus infection and host immunity, *Curr Opin Infect Dis*, 19(2):127–131.
9. Haig, D. M. & Mercer, A. A. (1998). Orf. *Vet Res* 29, 311–326. 2. Haig DM: Orf virus infection and host immunity. *Curr Opin Infect Dis* 2006, 19(2):127–131.

10. HOSAMANI M., SCAGLIARINI A., BHANUPRAKASH V., MCINNES C.J. & SINGH R.K. (2009). ORF: An update on current research and future perspectives. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7, 879-893
11. Karki M., Venkatesan G., Kumar A., Kumar P. Bora D. (2019). Contagious ecthyma of sheep and goats: A comprehensive review on epidemiology, immunity, diagnostics and control measures. *Veterinarski Arhiv*. 89. 393-423. 10.24099/vet.arhiv.0208.
12. Kumar R., Trivedi R.N., Bhatt P., Khan S.U.H., Khurana S.K., Tiwari R., Karthik K., Malik Y.S., Dhama K., Chandra R. (2015). Contagious Pustular Dermatitis (Orf Disease) – Epidemiology, Diagnosis, Control and Public Health Concerns, *Adv. Ani. Vet. Sci.* 3, (12), 649.
13. McGuire M.J., Johnston S.A., Sykes K.F. (2012). Novel immune-modulator identified by a rapid, functional screen of the parapoxvirus ovis (Orf virus) genome, *Proteome Sci.* 2012; 10: 4.
14. Nadeem M, Curran P, Cooke R, Ryan CA, Connolly K. (2010) Orf: contagious pustular dermatitis. *Ir Med J.* May;103(5):152-3. PMID: 20666089.
15. Pugh D.G., Baird N., (2012). *Sheep and goat medicine*, Saunders, Elsevier imprint, Maryland heights, Missouri.
16. R. M. MOGA (2005) Boli virotice și prionice ale animalelor, Ed. Brumar, Timișoara, pp 201-205.
17. Ravi K.M., Surender P., Balakrishnan K. (2000). Contagious ecthyma in small ruminants. *Intas Polivet* 1:223.
18. Trylan M., Klein J., Berge T., Josefsen T.D., Das Neves C.G., Oksanen A., Asbakk K. (2013). Experimental parapoxvirus infection (contagious ecthyma) in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*), *Veterinary Microbiology*, 162(2-4):499-506.
19. Zhang K., Zhongxin, L., Shang, Z., Zheng, H., Jin, Y., He, J., Liu, X. (2010). Diagnosis and phylogenetic analysis of Orfvirus from goats in China: a case report *Virology Journal*, 7:78.