
TEZĂ DE DOCTORAT

Identificarea serologică și moleculară a tulpinilor de virus al bronșitei infecțioase aviare în România

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand: **Valentin Tudor**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Marina Spînu**



REZUMAT

Bronșita infecțioasă aviară (BI) este una dintre cele mai importante boli ale păsărilor, declarabilă la OIE, care determină pierderi masive din punct de vedere economic în industria avicolă. Boală foarte contagioasă, cauzată de un coronavirus (IBV), bronșita aviară are o evoluție clinică acută, ce afectează porțiunea superioară a aparatului respirator la găini, dar și la alte specii de păsări.

Virusul (IBV) este prezent pe întreg mapamondul, fiind transmis prin inhalare sau prin contact direct cu păsări bolnave ori dejecții contaminate, echipamente sau orice alte materiale care au intrat în contact cu virusul. Transmiterea verticală a virusului prin embrioni nu a fost identificată, însă virusul poate fi prezent pe suprafața cojii ouălor de incubație după eliminarea sa din oviduct sau tubul digestiv (Lukert, 1965).

Rata mare de replicare a virusului are ca rezultat apariția de mutații genetice sau recombinări ale genomului, ceea ce conduce la apariția de noi genotipuri virale (actualmente, peste 50) (Khataby și colab., 2011, 2020). Acest fenomen este demn de luat în considerare în cadrul gestionării focarului de boală dar și în prevenirea evenimentelor morbide ulterioare. Cu toate că vaccinurile vii atenuate s-au dovedit foarte eficiente, inducând o imunitate puternică, protecția se asigură doar în cazul intervenției genotipului prezent în vaccinul aplicat în efectiv (Dhinaker și Jones, 1997).

Pe lângă acest risc reprezentat de absența protecției încrucișate, în elaborarea programelor de preveție și control, precum și la conceperea unor noi vaccinuri, trebuie avute în vedere riscul potențial de revenire a patogenității tulpinii vaccinale, riscul reprezentat de protocoale de vaccinare inadecvate datorită interferenței anticorpilor maternali respectiv potențiale recombinări care pot avea loc (Bande și colab., 2015, 2016, Cavanagh și colab., 1998, 1999, Mockett și colab., 1987, Mondal și Naqi, 2001). În ciuda similitudinilor genetice semnalate între IBV și SARS-CoV-2 (Al-Jameel și Al-Mahmood, 2020) virusul bronșitei infecțioase aviare (IBV) nu prezintă riscuri recunoscute pentru sănătatea umană (Ignjatovic și Sapats, 2000).

La puii tineri, IBV produce leziuni ale aparatului respirator superior. În plus mai pot apărea reducerea consumului de furaj și scăderea ratei de conversie a acestuia, afectând astfel producția în cazul puilor pentru carne. Mai mult, infecția creează predispoziție pentru infecții oportuniste, secundare, ce pot determina aerosaculite, pericardite sau perihepatite (Lambrechts și colab., 1993, Loomis și colab., 1950, Lucio și Fabricant, 1990, Rosenberger și Gelb, 1987, Tottori și colab., 1997).

În efectivele de reproducători sau găini ouă consum, infecția poate determina scaderea producției de ouă cu până la 70% sau afectarea calității cojii ouălor. Virusul

se poate replica în oviduct și determina apariția de leziuni permanente la păsările imature și tineret având ca efecte reducerea producției de ouă pe o perioadă lungă de timp sau stoparea totală a producției, determinând apariția de păsări „false ouătoare”. Ouăle provenite de la efective de păsări ce produc coajă pigmentată vor fi decolorate (Crinion, 1972), iar albușul va avea o consistență apoasă. Producția de ouă își poate reveni dar poate de asemenea rămâne scăzută la efectivele cu susceptibilitate ridicată (Otsuki și colab., 1990).

Distribuția geografică în continuă schimbare a genotipurilor IBV susține importanța diagnosticului timpuriu de certitudine în unitățile de creștere a păsărilor. Astfel, de exemplu, tulpini care au apărut în China s-au răspândit apoi, ducând la pagube economice însemnate în restul continentului asiatic, în Federația Rusă, dar și în Europa (Mahmood și colab., 2011, Bochkov și colab., 2006, Beato și colab., 2005, Worthington și colab., 2008, Irvine și colab., 2010, Sigrist și colab., 2012).

Lucrarea este constituită din alăturarea unor studii publicate, incluse în lista de lucrări prezentată în teză.

Scopul acestui studiu a fost acela de a obține izolate IBV din teren, de la diferite ferme comerciale unde s-au înregistrat pierderi pe fluxul tehnologic, asociate clinic cu infecțiile de bronșită infecțioasă aviară. S-a urmărit astfel:

1. Identificarea moleculară (prin testul RT-PCR) și serologică (prin testul de virus neutralizare și testul ELISA) a genotipurilor de virus al bronșitei infecțioase aviare circulante în România și includerea acestora într-un arbore filogenetic.
2. Analiza filogenetică a izolatelor pentru determinarea relațiilor de înrudire dintre tulpinile izolate și cele de referință.
3. Identificarea eventualelor serotipuri distincte care pot fi prezente pe teritoriul României și stabilirea patotipului caruia îi aparțin.
4. Efectuarea unei hărți genogeografice a genotipurilor de virus al bronșitei infecțioase aviare identificate în România.
5. Evaluarea nivelului de protecție indusă de vaccinurile disponibile împotriva infecției cu serotipurile majoritare identificate în România.

Studiile prezentate în cadrul tezei au fost efectuate pe perioada doctoratului (2013-2017), în cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca, Facultatea de Medicină Veterinară, Departamentul de Boli Infecțioase, laboratoarele GD Animal Health Laboratory, Deventer, Olanda.

Teza intitulată “ Identificarea serologică și moleculară a tulpinilor de virus al bronșitei infecțioase aviare în România” este structurată în două părți principale: stadiul actual al cunoașterii ce acoperă două capitole și contribuția personală care cuprinde 8 capitole. Teza se extinde pe 114 pagini, incluzând 17 de tabele, 25 de figuri și 245 de referințe bibliografice.

Prima parte a tezei (Stadiul actual al cunoașterii), rezumă informații din literatura de specialitate despre caracteristicile virusului bronșitei infecțioase aviare, despre impactul economic și etiopatogeneza bolii, precum și despre diagnosticul și strategiile de control ale bolii. **Capitolul 1** conține informații despre istoricul IBV, etiologie și taxonomie, caracteristicile generale ale coronavirusurilor, interacțiunea IBV cu sistemul imun, tabloul clinic și lezional și tehnici de diagnostic imunologic și biochimic. **Capitolul 2** prezintă date din literatură în ceea ce privește diversitatea genetică a tulpinilor circulante de IBV pe diferite continente și în țări diferite.

A doua parte (Contribuția personală) e structurată în 8 capitole și include motivația, obiectivele și modelul de studiu (**Capitolul 3**), urmate de Metodologia generală a cercetării (**Capitolul 4**) și 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 245 de titluri.

Dacă în țările învecinate studiile au dovedit atât prezența genotipurilor majore dar și au fost identificate genotipuri specifice, este posibil ca și în România unde industria avicolă este foarte dezvoltată să se petreacă aceeași succesiune de evenimente. Aplicarea testelor moderne de diagnostic direct (identificarea virusului) și indirect (identificarea anticorpilor anti IBV) sunt esențiale pentru implementarea corectă a protocoalelor de prevenție și de control al bolii pe termen scurt, mediu și lung.

Capitolul 3 prezintă modelul de studiu care încadrează cercetările efectuate, prezentate în capitolele ulterioare. Modelul include obiectivele generale ale studiului, elucidate prin implementarea protocolului de prelevare a probelor și a testelor serologice și biochimice de diagnostic (Fig.1). Aplicarea acestui model a permis circumscrierea etapelor de lucru și stabilirea interrelației dintre acestea, cu monitorizarea continuă a eficienței măsurilor preventive și de control pe parcursul efectuării întregii cercetări.

Metodologia de prelevare a probelor, astfel încât datele obținute să fie acoperitoare pentru întregul teritoriu al României sau fost elaborate în **Capitolul 4**. Probele corespunzătoare pentru identificarea IBV este necesar să fie recoltate cât mai aproape de momentul apariției semnelor clinice. Lanțul frigorific de la pasăre la congelator trebuie menținut în condiții corespunzătoare care să asigure persistența virusului până la testare. Probele au fost prelevate în decurs de trei ani consecutivi (2013-2015) de la ferme din România care s-au confruntat cu episoade de bronșită infecțioasă aviară.

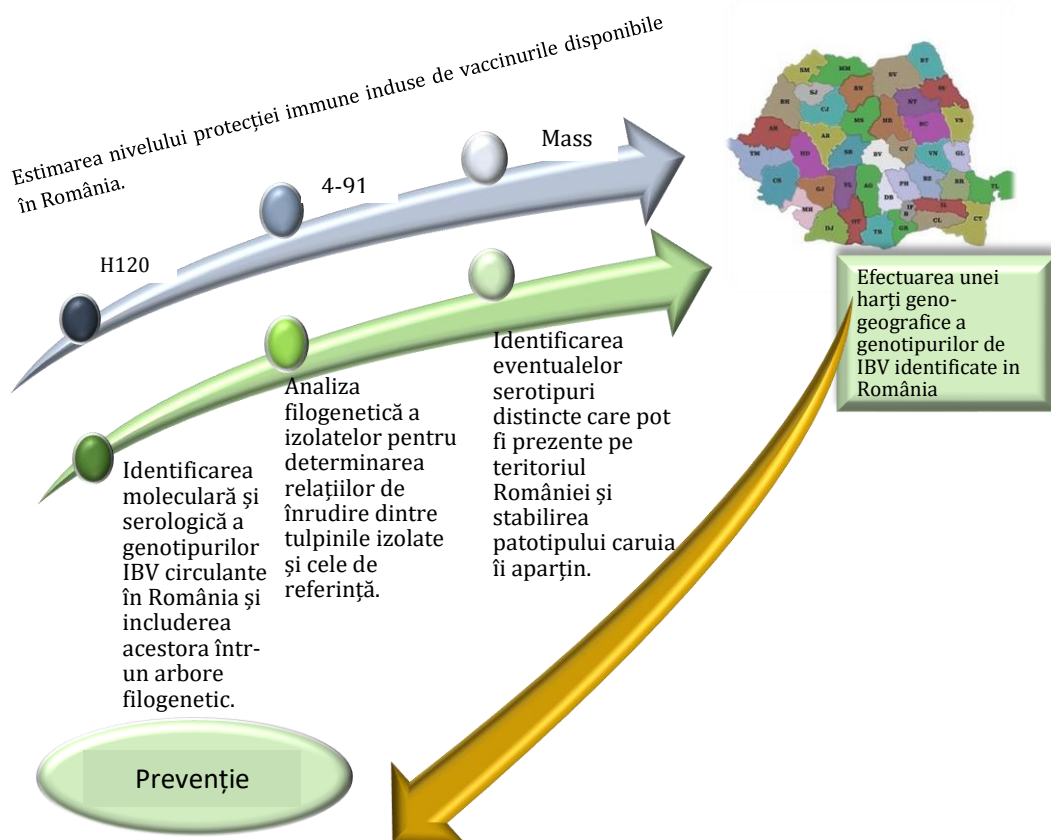


Fig. 1. Model de integrare a genotipurilor circulante de IBV în România

Ulterior, cercetarea a fost reluată la nivelul anului 2017. Pentru facilitarea prelucrării datelor și a evaluării comparative a distribuției IBV în teritoriu, în cadrul acestei cercetări doctorale au fost luate în considerare patru zone principale, după cum urmează: Q1-Nord Vest, Q2-Nord Est, Q3- Sud Est și Q4-Sud Vest (Fig. 2). Au fost prelucrate în total 5903 probe.

Au fost recoltate tampoane cloacale, traheale și probe din rinichi, atât de la pui de găină cât și de la păsări adulte, localizate în cele patru regiuni și 33 de ferme. Fermele au diferit prin categoria de vârstă și tehnologia de creștere aplicată. În toate aceste ferme, la păsările bolnave au fost observate semne clinice precum respirație șuierătoare (weezing), strănut, și raluri bronhiale, pierdere în greutate, scăderea producției de ouă, modificări apărute la nivelul cojii ouălor. În unele cazuri, simptomatologia a fost necaracteristică, necesitând investigații suplimentare de laborator în direcția prezenței unor agenți bacterieni sau virali asociați.

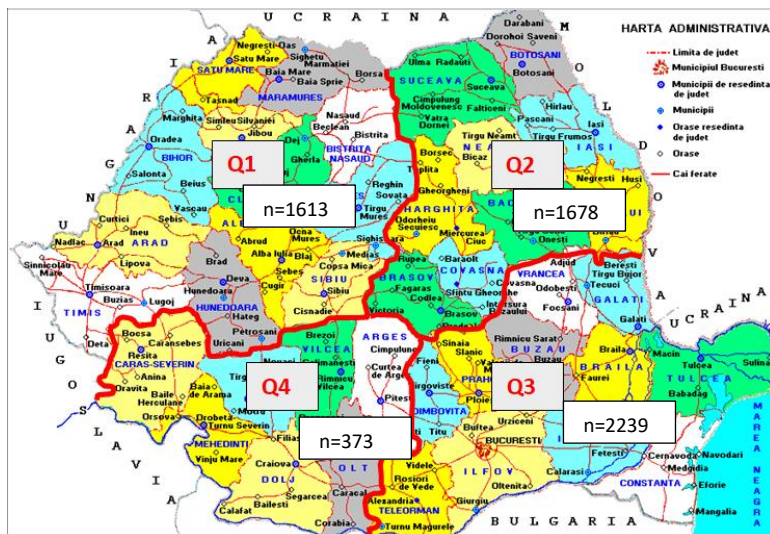


Fig.2. Zone majore de prelevare probe din ferme în care a evoluat IBV

Capitolul 5 descrie distribuția regională a tulpinilor de virus al bronșitei infecțioase în România. Pentru scopurile acestui experiment, probele au fost prelevate în 2017, de pe întregul teritoriu al României, divizat în patru regiuni principale: Q1- Nord Vest (n=78), Q2- Nord Est (n=68), Q3- Sud Est (n=173) și Q4- Sud Vest (n=53). Au fost recoltate tampoane cloacale, traheale și probe din rinichi, atât de la pui de găină cât și de la păsări adulte, localizate în 33 de ferme. Fermele au diferit prin categoria de vârstă exploatată și tehnologia de creștere aplicată. În toate aceste ferme, la păsările bolnave au fost observate semne clinice precum respirație șuierătoare (*wheezing*), strănut, și raluri bronhiale, pierdere în greutate, scăderea producției de ouă, modificări apărute la nivelul cojii ouălor.

Probele au fost prelucrate prin tehnica RT-PCR. Din toate prelevatele s-au realizat probe comune (grupate câte 5) și acestea au fost transferate și prelucrate apoi pentru diagnostic în laboratoarele GD Animal Health Laboratory, Deventer, Olanda. S-a efectuat extracția acidului nucleic cu High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics, USA) conform instrucțiunilor producătorului.

Pentru testul RT-PCR propriu zis și secvențierea ulterioară au fost utilizate două teste reverstranscriptazice, un RT-PCR genotip specific pentru D1466 și un RT-PCR general care a dus la generarea unui fragment de aproximativ 350 perechi de baze (bp) ale genei S1 cu primerii XCE1+ (CACTGGTAATTTTTCAGATGG) și XCE3- (CAGATTGCTTACAACCACC) (Cavanagh și Davis, 1992, Cavanagh și colab., 2007). Ampliconii S1 au fost separați într-un gel de agaroză de 1% și vizualizați cu ajutorul

colorației utilizând bromură de ethidiu ($0.50 \mu\text{g mL}^{-1}$) și transluminare în lumină UV. Ampliconii purificați au fost secvențiați (BaseClear, Leiden, Netherlands) folosind atât primerii XC1+ cât și XCE3-. Datele obținute prin secvențiere au fost aliniate prin utilizarea unui computer software Bio Numerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)(Tudor și colab., 2017, Saadat și colab., 2017).

Simultan, pe probele prelevate din unitățile de creștere au fost efectuate teste bacteriologice specifice, pentru verificarea prezenței agenților din familiile *Enterobacteriaceae*, genul *Salmonella* și *Mycoplasmataceae*, genul *Mycoplasma*.

Întocmirea bazei de date și prelucrarea rezultatelor preliminară s-au efectuat în programul Microsoft® Office – Excel. Variabilele cu distribuție normală au fost caracterizate de medie și deviație standard. Pentru evaluarea semnificației statistice a diferențelor între regiuni în prevalența diferitelor variante de tulpini identificate s-a recurs la testul t Student. S-au alocat scoruri de prevalență variantelor IBV izolate pe regiuni (Q1-Q4), pentru facilitarea interpretării matematice a rezultatelor. Astfel, tipului celui mai frecvent identificat i s-a atribuit scorul 4, celui mai rar identificat, 1, iar absența a fost notată cu 0.

Corelația între regiuni a fost calculată folosind programul Excel iar pentru verificarea proporționalității directe sau inverse dintre variabile, a gradului de dependență dintre acestea, s-a folosit coeficientul de corelație Pearson. Semnificația diferențelor a fost interpretată conform tabelului de valori critice pentru corelația Pearson.

Testele bacteriologice au indicat prezența simultană a genurilor *Salmonella* și *Mycoplasma*, cel mai probabil din speciile *S. gallinarum/pullorum* și *M. gallisepticum*, a căror implicare în patologia aviară este recunoscută, apărând în mod obișnuit tulburări ale ouatului în fermele de păsări crescute cu acest scop. În zona de NV a României (Q1, n=78) 33 de probe (42,3%) au fost pozitive pentru prezența IBV. Procentele globale de seropozitivitate din Q1 au indicat faptul că tulpinile IBV 4-91/793B (n=9)(27,27%/33 probe; 11,54%/78 probe) și 1/96 (n=6)(18,18%/33 probe; 7,7%/78 probe) au avut incidența cea mai mare.

Din totalul de 18 probe pozitive la RT-PCR, 9 au prezentat omologie 100% cu tulpina 4-91/793B, 4 probe au prezentat omologie 99.4% cu tulpina 4-91/793B și 5 probe 98.5% omologie cu 4-91/793B. Prevalența tulpinii QX (D388) a fost de 96.0% (n=5). Incidența tulpinii IBV Massachusetts (M41) a fost de 99.1%.

În zona de NE a României (Q2) 42, din probele testate pentru IBV au fost 100% pozitive. Prevalența globală combinată a IBV 4-91/793B a fost de 100%.

Similar, în zona de SE a României (Q3), 35 dintre probele testate au fost pozitive pentru prezența IBV, înregistrându-se o prevalență de 100% (n=5, 14,28%/35 probe; 2,9%/173 probe), dar pentru tulpina 1/96. Șase din probe au prezentat 99,7% omologie cu IBV 4-91/793B (17,14%/35 probe; 3,47%/173 probe) iar alte 6 probe

99,1% omologie cu IS/1494/06 (17,14%/35 probe; 3,47%/173 probe). Prevalența IBV Massachusetts a fost de 97.6% (n=7)(20%/35 probe; 4,05%/173 probe).

În zona de SV a României (Q4), din totalul de 53 probe, 58% (n=31 probe) au fost pozitive pentru prezența IBV. Zece probe au demonstrat omologie de 100.0% cu tipul 4-91/793B, 8 probe omologie de 99.7% cu 4-91/793B, 5 probe în amestec: 97.0% omologie cu 4-91/793B și 99.4% omologie cu QX, în timp ce 5 probe au prezentat omologie de 100.0% cu 1/96 iar 5 probe, omologie de 98.3% cu Xindadi (Tabel 1). Corelațiile calculate între zone sunt prezentate în tabelul 2.

Tabel 1. Distribuția tulpinilor identificate pe regiuni

Regiuni/ Regions	Probe comasate Pooled samples	Total P	Total N	P%	N%	Tulpini IBV identificate/IBV strains identified
Q1 (NW)	78	33	45	43%	57%	QX; 4-91/793B; 1/96; Mass
Q2 (NE)	42	42	0	100%	0	4-91/793B
Q3 (SE)	173	117	11	68%	32%	Mass, 4-91/793B; 1/96; IS/1494/06
Q4 (SW)	53	30	20	58%	42%	4-91/793B; 4-91+QX; 1/96; Xindadi

Tabel 2. Semnificația statistică a coeficienților de corelație r între tulpinile izolate, pe regiuni

Q	Q1Q2	Q1Q3	Q1Q4	Q2Q3	Q2Q4	Q3Q4
R	0.7**	0.15*	0.66**	0.29*	0.52*	-0.56**

*-0.01, **-0.001

Prin aplicarea a două tipuri de RT-PCR și evaluarea tulpinilor din 33 de ferme, s-a constatat dominanța tipului 4/91.

Cu toate acestea, patotipuri precum Xindadi – neîntâlnite anterior în România și probabil importat din Turcia, sau tipul D1466, menționate în alte țări europene, nu s-au suprapus peste tulpinile vaccinale utilizate în România, ducând la o exprimare clinică a bolii cu grade diferite de gravitate, susținând caracterul versatil al IBV și potențiale recombinații în curs, în ciuda “afilierii” geografice a unor variante.

În **Capitolul 6** au fost evaluate alterările tiparelor patologice prin intervenția a diferitelor patotipuri IBV la găinile din România. Pentru aceasta, materialul biologic a provenit din în mai multe ferme de pui, în care păsările au fost vaccinate cu tulpina H120. În aceste locații, leziunile macroscopice relevate la necropsie au fost atipice

pentru infecția cu IBV, incluzând aerosaculită și congestie a mucoasei intestinale, plămâni congestivi, oviduct chistic, leziuni renale, involuția ovarului și mortalitate crescută. Probele au fost supuse investigării prin testul de virus neutralizare conform Manualului de diagnostic al OIE, precum și testării prin RT-PCR, așa cum s-a descris anterior (**Capitolul 5**). Testul de neutralizare a virusului a indicat prezența anticorpilor împotriva IBV M41, o tulpină patogenă comună pe continentul nord-american și a IBV 793B (4/91), comună pentru Europa, în timp ce anticorpul IBV 1/96, D388 și Italia-02 sub limita pozitivă. Testul RT-PCR a identificat prezența tulpinilor vaccinale M41 și 793B (4/91), o tulpină IBV recombinantă, situată între IBV 4/91 velogen și IBV QX, precum și omologie de masă și Xindadi. S-a sugerat că tulpina IS/1494/06 identificată provine din Turcia.

Urmărind dinamica izolatelor pe zone și pe ani de studiu, se poate observa că pentru zona Q1, în anul 2014, singurul în care s-a efectuat PCR, s-a observat o omologie ridicată, 98-99%, cu tulpina patogenă clasică, respectiv cu tulpina vaccinală 793B (4/91) a izolatelor.

Dacă în primul an (2013), în zona Q2 nu se detectează IBV prin PCR, în anul următor apare o omologie de 99% cu tulpina patogenă 4/91, de 98% cu tulpina patogenă Massachusetts și de 99% cu tulpina patogenă D274, indicând o potențială cauză pentru varietatea simptomatologiei înregistrate. Profilul tulpinilor întâlnite se modifică în ultimul an, locul tulpinilor menționate anterior fiind preluat de tulpina velogenă IB-Q1 chineză.

Pentru zona Q3, similar zonei Q2, primul an se caracterizează prin absența izolatelor IBV, în timp ce în al doilea an apare o multitudine de tulpini prezentând omologie de: 97-99% cu tulpina vaccinală D388, nedepistată prin VN, 100% cu tulpina vaccinală 4/91 și 99% cu tulpina vaccinală Massachusetts. Și în cazul acestei zone, dinamica circulației tulpinilor este modificată în al treilea an al studiului, fiind identificate omologii de 99-100% cu tulpina vaccinală H120, respectiv de 98% cu tulpina vaccinală Clone D274. În zona Q4 nu s-a efectuat testul PCR în perioada inclusă în studiu.

Cercetările efectuate postvaccinal au indicat eșecul tulpinii vaccinale H120 utilizate în unele circumstanțe de a oferi o protecție încrucișată eficientă împotriva tulpinilor patogene ale bolii detectate în zona respectivă și subliniază necesitatea continuării studiilor aprofundate privind corelațiile potențiale ale diferitelor teste de diagnostic cu tabloul clinic atipic al bolii.

În **Capitolul 7** a fost investigată, în cadrul unui studiu de caz, prevalența patotipurilor/protectotipurilor IBV într-o fermă de pui din nord-vestul Transilvaniei.

Probele au fost colectate dintr-o fermă de pui de carne cu o producție de 2,5 milioane de pui/serie. Vaccinarea împotriva IB a fost efectuată utilizând într-o perioadă de aproximativ 4,5 ani înainte de efectuarea prezentei cercetări, a tulpinilor de vaccin Ma5 și 4/91 administrate în prima zi de viață, cu rezultate bune în protecția

păsărilor vaccinate. Din motive economice, s-a recurs la modificarea tulpinilor de vaccin selectate de către fermier, modificare ce a declanșat evenimentele morbide ulterioare.

În timpul episodului patologic descris în acest capitol, păsările au prezentat semne clinice neconcludente pentru o anumită boală infecțioasă și de aceea s-a recurs la efectuarea unui diagnostic complex, incluzând testări în direcția IBV, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* și *S. gallinarum*, *Mycoplasma synoviae* și *M. gallisepticum*, virusului bolii Gumboro, virusului bolii Newcastle și reovirusului. Ca teste de diagnostic au fost aplicate în acest studiu RT-PCR și secvențierea pentru detectarea IBV, precum și virus neutralizarea prin metoda beta, deja descrisă (**Capitolul 6**). Pentru detectarea celorlalți potențiali agenți de infecție secundară s-a utilizat testul ELISA pentru *M. synoviae* și *M. gallisepticum* (Idexx Mg / Ms Ab Test), reovirus (Idexx Reo Ab Test), boala Gumboro (Idexx Ibd Ab Test), *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* și *S. gallinarum* ((Salm Gp D) Salmonella Group D Antibody test kit, BioCheck, UK)) pentru detectarea anticorpilor față de infecția cu virus ND a fost utilizată reacția de inhibare a hemaglutinării. PCR a fost, de asemenea, utilizat pentru detectarea *M. synoviae* și *M. gallisepticum* respectiv a salmonelelor.

Rezultatele neutralizării virusului au indicat prezența IBV M41, o tulpină patogenă comună pentru continentul nord-american și a IBV 4/91, comună pentru Europa și, de asemenea, o tulpină vaccinală, în timp ce anticorpii IBV anti-D388 și Italia-02 au fost sub limita pozitivă.

Prin această tehnică, titrurile pentru IB D388 precum și cele pentru IB Italia 02 s-au situat în totalitate sub valoarea 7. În cazul IBV 4/91, titrurile au fost mai mari pentru 8 eșantioane decât pentru tulpinile anterioare și similare cu cele pentru IB D388 și cele pentru IB Italia 02, pentru alte două. Deși IBV 4/91 a fost folosit anterior ca tulpină vaccinală în fermă, timpul scurs post-vaccinal nu a justificat prezența sa în timpul studiului. Toate tipurile întâlnite ar putea fi considerate mai degrabă patotipuri decât protectotipuri, tulpina vaccinală utilizată în fermă fiind diferită de serotipurile izolate și în prezența unor semne clinice sugestive. RT-PCR nu a detectat IBV D1466 sau altele în probe comasate. Testul PCR efectuat pe aceleași probe care au fost utilizate pentru VN a furnizat rezultate negative pentru probele comasate pentru detectarea IBV. Tulpinile IBV au fost comparate cu arborele filogenetic furnizat de Mark Jackwood (<http://www.infectious-bronchitis.com/phylogenetic-tree.pdf>). Este de asemenea evidentă prezența unui număr mare de agenți patogeni asociați, ducând la complicarea/agravarea tabloului clinic și leziunilor anatomopatologice înregistrate pe parcursul episodului. Astfel, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* și *S. gallinarum*, *M. synoviae* au fost prezente împreună cu un reovirus, virusul bolii Newcastle și virusul bolii Gumboro. Cu toate acestea, *M. gallisepticum* a fost absentă atât în testul ELISA, cât

și prin tehnica moleculară PCR. Patotipurile prezente în efectivul studiat nu au fost superpozabile peste potențialele protectotipuri, ci mai probabil au fost reprezentate de serotipurile sălbatice, împotriva cărora vaccinarea aplicată nu a asigurat o protecție eficientă.

Ultimul capitol al tezei, **Capitolul 8**, a avut ca scop investigarea prevalenței reale a IBV în două ferme, la găinile și părănții de pui broiler, unde problemele de sănătate par să fie cauzate de un complex de cauze variate. Cercetările au fost efectuate în doi pași, primul (A) incluzând o fermă de pui broiler, unde vaccinarea s-a efectuat cu combinația de tulpini Ma5 și 4/91, iar al doilea, pasul (B), o fermă de găini ouătoare, unde vaccinarea s-a efectuat cu IB Primer, IB Ma5, IB 4/91, vaccinul anti-IBV monovalent inactivat în perioada creșterii și vaccinarea anti-IBV la fiecare 2 luni în perioada de producție. Rezultatele au fost interpretate în ambele ferme pe baza examenelor clinice și a morfopatologiei macroscopice, în concordanță cu rezultatele PCR pentru a confirma cauzele microbiene și succesiunea lor în episodul morbid și pentru a elabora programul de control optim personalizat pentru fiecare dintre cele două ferme.

În ferma A, leziunile au fost atipice pentru IB, constând din semne de gravitați diferite la anumite păsări (inflamația sacilor aerieni, de la o ușoară congestie a intestinului la enterită catarală și hemoragică etc). La unele dintre păsări, au fost prezente infecții secundare exprimate prin leziuni macroscopice traduse prin depozite mai mult sau mai puțin abundente de fibrină, întâlnite în infecția cu *E. coli* (Smith și colab., 1985), leziuni distrofice la nivelul rinichiului și tulburări respiratorii. Examinările virusologice și PCR repetate au dus în cele din urmă la identificarea unei tulpini recombinantă de IBV, rezultând ca o încrucișare între IBV 4/91 velogenic și IBV QX.

În Ferma B, rezultatul examinărilor clinice a indicat scăderea bruscă a producției de ouă cu aproximativ 10 până la 15% la toate grupele de vârstă (30 de săptămâni, 50 de săptămâni și 68 de săptămâni), cu modificări ale aspectului și consistenței cojii ouălor. Testul PCR a indicat prezența unei tulpini IB care prezintă o omologie de 96% cu tulpina IB QX.

În fermele investigate, pe fundalul protocoalelor de vaccinare aplicate în conformitate cu tehnologia de exploatare specifică, modificările patologice complexe care au apărut au inclus ca și cauză microbiană tulpini sălbatice de virus IBV (QX), susținând caracterul său versatil și potențialele recombinații care apar în ciuda unicității tulpinilor afiliate diferitelor zone geografice.

În baza rezultatelor obținute se poate concluziona (**Capitolul 9**) că variantele IBV depistate prin prin RT-PCR în România, sunt răspândite pe întregul teritoriu, cu dominanța tipului 4/91, fiind obținute informații utile pentru îmbunătățirea măsurilor preventive și de control ale bolii, individualizate pentru fiecare zonă în parte. Similar, personalizarea protocoalelor de vaccinare pe ferme, dependent de regiunea unde sunt

localizate, permite upgradarea strategiilor globale de control al bolii la nivel național. Cu toate că tulpina 4/91 este prevalentă, patotipuri precum Xindadi – neîntâlnite anterior în România și probabil importat din Turcia, sau tipul D1466, menționate în alte țări europene, nu s-au suprapus peste tulpinile vaccinale utilizate în România. S-a stabilit că patotipurile nou detectate în România duc la o exprimare clinică cu grade diferite de gravitate a bolii, susținând caracterul versatil al IBV și potențiale recombinații în curs, în ciuda „afilierii” geografice a unor variante.

Identificarea a multiple tulpini vaccinale sau patogene în teritoriul investigat, cu modificări anuale în structura viromului IBV, dependente și de zonă (Q1-Q3), pledează pentru asocierea tabloului clinic atipic și variabil cu patotipurile prezente, tulpinile sălbatice inducând o patologie mai gravă. În cadrul studiului clinic, după testele de laborator, etiologia s-a dovedit a fi mult mai complexă, multimicrobiană, incluzând genurile *Salmonella*, *Mycoplasma* dar și *E. coli*. Cercetările efectuate postvaccinal au indicat eșecul tulpinii vaccinale H120 de a oferi o protecție încrucișată eficientă împotriva tulpinilor patogene ale bolii detectate în zona respectivă iar patotipurile responsabile de exprimarea clinică nu au fost superpozabile peste potențialele protectotipuri, ci mai probabil au fost reprezentate de serotipurile sălbatice (QX), împotriva cărora vaccinarea aplicată nu a asigurat o protecție eficientă. Acestea modificări în dinamica IBV pun în pericol rezultatul vaccinărilor și ar implica elaborarea unor protocoale de prevenție adecvate și personalizate fiecărui tip de efectiv.

BIBLIOGRAFIE

1. BANDE F., ARSHAD S.S., BEJO M.H., MOEINI H., OMAR A.R. 2015. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J Immunol Res.*2015:424860. doi: 10.1155/2015/424860.
2. BANDE F., ARSHAD S.S., OMAR A.R., HAIR-BEJO M., ABUBAKAR M.S., ABBAY. 2016. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis *Advances in Virology*, olume 2016, Article ID 4621659
3. BEATO M. S., DE BATTISTI C., TERREGINO C., DRAGO A., CAPUA I., ORTALI G. 2005. Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy, *Veterinary Record*, 156(22):720
4. BOCHKOV Y. A., BATCHENKO G. V., SHCHERBAKOVA L. O., BORISOV A. V., DRYGIN V. V. 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia, *Avian Pathology*, 35(5): 379–393
5. CAVANAGH D, CASAIS R, ARMESTO M, HODGSON T, IZADKHASTI S, DAVIES M, LIN F, TARPEY I, BRITTON P. 2007. Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins. *Vaccine*. ;25:5558–5562.

6. CAVANAGH D., MAWDITT K., BRITTON P., NAYLOR C. J. 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions, *Avian Pathology*, 28:6, 593-605
7. CAVANAGH, D., DAVIS P. J., COOK J. K. A. 1992. Infectious bronchitis virus: Evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathol* 21:401—408.
8. CAVANAGH, D., MAWDITT K., GOUGH R., PICAULT J. F., BRITTON P.. 1998. Sequence analysis of strains of the 793/B genotype (CR88, 4/91) of IBV isolated between 1985 and 1997. In E. F. Kaleta and U. Heffels-Redman (eds.). *Proceedings of an international symposium on infectious bronchitis virus and pneumovirus infections in poultry*. Giessen: University of Giessen.
9. CRINION, R. A. P., HOFSTAD M. S.. 1972. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Dis* 16:351—363.
10. DHINAKER R., G., R. C. JONES. 1997. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol* 26:677—706.
11. IGNJATOVIC J, SAPATS S. 2000. Avian infectious bronchitis virus. *Rev Sci Tech*. 19(2): 493-508.
12. IRVINE R. M., COX W. J., CEERAZ V., REID S.M., ELLIS R., JONES R.M., ERRINGTON J., WOOD A.M., MCVICAR C., CLARK M.I. 2010. Poultry health: detection of IBV QX in commercial broiler flocks in the UK, *Veterinary Record*, 167(22):877–879
13. KHATABY K., KASMI Y., SOUIRI A., LOUTFI C., ENNAJI M.M. 2020. Avian Coronavirus: Case of Infectious Bronchitis Virus Pathogenesis, Diagnostic Approaches, and Phylogenetic Relationship Among Emerging Strains in Middle East and North Africa Regions. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*;729-744.
14. KHATABY K., SOUIRI A., KASMI Y., LOUTFI C., ENNAJI M.M. 2016. Current situation, genetic relationship and control measures of infectious bronchitis virus variants circulating in African regions, *The Journal of Basic & Applied Zoology*,76:20–30
15. LAMBRECHTS, C., M. PENSART, AND R. DUCATELLE. 1993. Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strains and Belgian nephropathogenic isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 22:577—590.
16. LOOMIS, L. N., C. H. CUNNINGHAM, M. L. GRAY, AND F. THORP, JR. 1950. Pathology of the chicken embryo infected with infectious bronchitis virus. *Am J Vet Res* 11:245—251.
17. LUCIO, B. AND J. FABRICANT. 1990. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 34:865—870.
18. LUKERT, P. D. 1965. Comparative sensitivities of embryonating chicken's eggs and primary chicken embryo kidney and liver cell cultures to infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 9:308—316.
19. MAHMOOD Z. H., SLEMAN R. R., UTHMAN A. U. 2011. Isolation and molecular characterization of Sul/01/09 avian infectious bronchitis virus, indicates the emergence of a new genotype in the Middle East, *Veterinary Microbiology*, 150(1-2):21–27

20. MOCKETT, A. P. A., J. K. A. COOK, M. B. HUGGINS. 1987. Maternally-derived antibody to infectious bronchitis virus: Its detection in chick trachea and serum and its role in protection. *Avian Pathol* 16:407—416.
21. MONDAL, S. P., S. A. NAQI. 2001. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: Its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Vet Immunol and Immunopath* 79:31—40.
22. OTSUKI, K., M. B. HUGGINS, J. K. A. COOK. 1990. Comparison of the susceptibility to infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of White Leghorn chickens. *Avian Pathol* 19:467—475.
23. ROSENBERGER, J. K., J. GELB, JR. 1987. Response of several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 22:95—105.
24. SAADAT Y., BOZORGMEHRI FARD M. H., CHARKHKAR S., HOSSEINI H., SHAIKHI N., AKBARPOUR B. 2017. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler flocks in Bushehr province, Iran: 2014 – 2015. *Veterinary Research Forum*, 8 (3) 195 - 201
25. SIGRIST B., TOBLER K., SCHYBLI M., KONRAD L., STOKLI R., CATTOLI G., LUESCHOW D., HAFEZ H.M., BRITTON P., HOO R.K., VOGTLIN A. 2012. Detection of Avian coronavirus infectious bronchitis virus type QX infection in Switzerland, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(6): 1180–1183
26. TOTTORI, J., R. YAMAGUCHI, Y. MURAKAWA, M. SATO, K. UCHIDA, AND S. TATEYAMA. 1997. Experimental production of ascities in broiler chickens using infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *Avian Dis* 41:214—220.
27. Tudor V., Brudașcă, G. H. F., Niculae, M., Páll, E., Șandru, C. D., Negruțiu, V., Spînu, M. 2017. Changes in post infectious bronchitis vaccination immunity lead to modified clinical and pathology patterns in broilers and layers. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară Vol. XI, Timișoara 2017*, 50 (4): 161-167
28. WORTHINGTON K. J., CURRIE R. J. W., JONES R. C. 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006, *Avian Pathology*, 37(3):247–257
29. <http://www.infectious-bronchitis.com/phylogenetic-tree.pdf>
30. *** OIE Terrestrial Manual 2018, Chapter 2.3.2.- Avian infectious bronchitis, p. 1-14