

REZUMAT

Teza de doctorat intitulată **“Epidemiologia unor parazitoze transmise de vectori la câine în România”** cuprinde mai multe studii, care au scopul de a ajuta la înțelegerea fenomenului ce a dus la creșterea prevalenței și modificarea distribuției bolilor parazitare ale câinilor, transmise de vectori. Aceste schimbări pot fi observate atât în România, cât și în restul lumii.

Teza este structurată în două părți, conform normelor uzuale: prima parte, intitulată **“Stadiul actual al cunoașterii”**, și partea a-II-a este intitulată **“Cercetări proprii”** și detaliază toate rezultatele obținute de-a lungul perioadei de studii doctorale.

Prima parte a tezei, intitulată **“Stadiul actual al cunoașterii”**, conține date generale actuale, din literatura de specialitate, despre parazitozele studiate în această teză. Fiecare capitol al primei părți prezintă informații menite să scoată în evidență impactul acestor parazitoze asupra sănătății populației canine.

Primul capitol, intitulat **“Importanța leishmaniozei canine și aspecte generale”**, este împărțit în cinci subcapitole. Subcapitolul I prezintă date din literatură menite să scoată în evidență impactul infecțiilor cu *Leishmania* spp. asupra sănătății oamenilor și a animalelor. În subcapitolul doi sunt descrise biologia și ecologia flebotomilor. Flebotomii sunt vectorii și principalii responsabili de transmiterea leishmaniozei la oameni și animale. În subcapitolul trei sunt descrise principalele metode de prevenție a leishmaniozei canine, precum și eficiența acestor metode, exemplificând cazuri când acestea au fost folosite cu mai mult sau mai puțin succes. Subcapitolul patru descrie multitudinea de semne clinice și paraclinice prezentate de câinii infectați cu *L. infantum*. Ultimul subcapitol descrie situația epidemiologică a infecțiilor cu *L. infantum*.

Capitolul II, intitulat **“Importanța babesiozei la câine”**, este împărțit în patru subcapitole și prezintă date generale, actuale din literatură. Primul subcapitol prezintă un scurt istoric al primelor studii despre infecțiile cu *Babesia* spp., iar în subcapitolul doi este prezentat ciclul vital al acestui parazit în gazda vertebrată și în cea artropodă. Subcapitolul trei descrie semne clinice și paraclinice ce pot fi prezente în infecțiile cu principalele specii de *Babesia*, care pot afecta câinii din Europa: *Babesia canis*, *Babesi vogeli*, și *Babesia gibsoni*. În subcapitolul patru este discutată epidemiologia babesiozei canine.

Capitolului III este intitulat **“Importanța hepatoozozei la câine”**, și este organizat în mod asemănător cu capitolul II. Este format din patru

subcapitole. Primul subcapitol este introductiv și este urmat de un subcapitol ce descrie ciclul vital al parazitului *Hepatozoon canis*. Subcapitolul trei descrie manifestările clinice și paraclinice întâlnite la câinii infectați, iar ultimul subcapitol prezintă epidemiologia acestui parazit.

Ultimul capitol al primei părți este intitulat “**Importanța dirofilariozei la câine**” și este împărțit în șase subcapitole. Precum în cazul capitolelor anterioare primul subcapitol este introductiv și prezintă date despre primele raportări ale paraziților din genul *Dirofilaria*, localizarea paraziților la canide, feline și om, dar și modul de transmitere a acestui parazit. Subcapitolele doi prezintă particularitățile infecțiilor cu *Dirofilaria immitis* și *Dirofilaria repens* la oameni, iar subcapitolul trei discută importanța infectării animalelor sălbatice, pentru transmiterea acestor paraziți. Subcapitolele patru și cinci descriu ciclul paraziților *D. immitis* și *D. repens* în gazda vertebrată și în artropod. Ultimul subcapitol descrie răspândirea infecțiilor cu *D. immitis* și *D. repens* în țările din vestul și estul Europei.

Partea a-II-a “**Cercetări proprii**” este compusă din 5 capitole în care sunt prezentate și discutate rezultatele cercetărilor efectuate.

Capitolul V este intitulat “**Epidemiologia leishmaniozei canine în sudul României**”. Sudul României este o regiune în care au fost efectuate, în trecut, mai multe studii ce au atestat prezența infecțiilor cu *L. infantum* la câine, dar și la om. Tot în această regiune a fost raportată prezența unor flebotomi capabili să transmită leishmanioza. După o perioadă de aproximativ 50 de ani de când această infecție a fost eradicată, au fost raportate infecții autohtone, în sudul României la câini dar și la un om și un șacal.

În acest capitol prezentăm un studiu epidemiologic al infecțiilor canine cu *L. infantum* în sudul României cu scopul de a determina riscul ca leishmanioza să reapară în România.

Au fost recoltate probe de ser, sânge și secreții oculare de la 300 de câini din județele Mehedinți, Dolj, Teleorman și Ialomița. Din probele de sânge au fost extrași acizi nucleici, ce au fost testați prin qPCR. Probele de ser au fost folosite pentru testul ELISA.

Toate probele analizate în acest studiu au fost negative, dar în ciuda rezultatelor din acest studiu încă există riscul ca leishmanioza canină să redevină endemică în România.

Capitolul VI este intitulat “**Studiu seroepidemiologic al leishmaniozei canine în sud-estul României**” și studiază tot epidemiologia infecțiilor canine cu *L. infantum*, dar în sud-estul României. După cum este menționat mai sus, există mai multe studii istorice și recente ce raportează prezența infecțiilor cu *L.*

infantum în sudul României, dar niciun studiu despre prezența acestei infecții în sud-estul României. Acest studiu are motivația de a înțelege dacă câinii din această regiune sunt expuși infecțiilor cu *L. infantum*.

Au fost colectate probe de ser de la 110 câini din județele Călărași și Galați. Probele au fost analizate folosind un test ELISA și 5/110 probe au fost pozitive pentru anticorpi anti-*L. infantum*. Toate probele pozitive au fost din județul Galați, iar prevalența totală a fost de 4.54%. Acest studiu ne arată că în sud-estul României câinii sunt expuși infecțiilor cu *L. infantum*.

Capitolul VII este intitulat **“Distribuția și prevalența babesiozei și hepatozoozei canine în sudul României”** și este un studiu epidemiologic ce acoperă regiunea studiată la capitolul V, dar ce tratează epidemiologia infecțiilor canine cu *Hepatozoon canis* și *Babesia* spp..

În România au fost publicate mai multe studii ce raportează infecții canine cu *Babesia* spp., dar a existat nevoia pentru un studiu epidemiologic exhaustiv, pe această temă, pentru a determina epidemiologia acestei infecții importante pentru medicina veterinară. Hepatozoonoza canină este o infecție foarte puțin cunoscută în România, fapt ce a motivat și studiul acestei boli.

Au fost folosite probe de sânge colectate de la 300 de câini, din județele menționate la capitolul V pentru a extrage acizii nucleici. Acești acizi nucleici au fost testați cu o tehnică PCR aspecifică, menită să amplifice ADN ce provine de la *Babesia* spp., dar și *Hepatozoon* spp. Toate probele pozitive au fost testate încă o dată folosind o tehnică PCR specifică pentru *Babesia* spp. și una pentru *H. canis*. Probele pozitive prin testele PCR specifice au fost secvențiate pentru a confirma diagnosticul.

Acest studiu raportează o prevalență totală de 47.6% pentru *H. canis* și 9.6% pentru *Babesia* spp. (*B. canis* 7% și *B. vogeli* 2.6%). Au fost observate și diferențe de prevalență între județe. Cele mai mari prevalențe ale infecțiilor cu *H. canis* și *B. vogeli* au fost observate în vestul regiunii studiate, iar cea mai mare prevalență a infecțiilor cu *B. canis* a fost observată în județele cele mai estice.

Studiul filogenetic a arătat o asemănare între secvențele din acest studiu și altele ce au fost raportate tot în România sau în țări apropiate, cum sunt Ungaria, Turcia sau Slovacia.

Acest studiu raportează o prevalență surprinzător de crescută a infecțiilor cu *H. canis* în sudul României și infecțiile cu *Babesia* spp. în județele din sudul României. Credem că aceste informații vor fi utile pentru veterinarilor din această regiune.

Capitolul VIII este intitulat **“Epidemiologia dirofilariozei la câinii din adăposturi din sudul României”**. Acesta este ultimul capitol din partea a-II-a ce

este bazat pe un studiu epidemiologic. Regiunea studiată este cea în care au avut loc și studiile de la capitolele V și VII. Ca și în cazul parazitozelor prezentate anterior, dirofilarioza canină este o boală vectorială importantă pentru medicina veterinară din România. În România au fost publicate mai multe studii despre prezența infecțiilor cu *D. repens* și *D. immitis* la câini. Majoritatea acestor studii s-au bazat pe identificarea morfologică a microfiliariilor sau identificarea anticorpilor anti-*D. immitis*. Studiul nostru caută să evalueze prevalența acestor infecții, profitând de sensibilitatea și specificitatea metodei qPCR.

Au fost extras acizii nucleici din probe de sânge de la 300 de câini. Acești acizi nucleici au fost folosiți pentru un screening inițial folosind tehnica qPCR. Toate probele pozitive au fost testate și cu o tehnică PCR clasică pentru a permite obținerea unor ampliconi de o lungime mai mare pentru secvențiere. Probele coinfectate au fost testate cu o a treia metodă PCR clasică, cu amorse specifice pentru *D. immitis* și pentru *D. repens*. Ampliconii reacțiilor PCR clasice au fost purificați și secvențiați.

Raportăm o prevalență de 11.66% (35/300) a infecțiilor cu *D. repens*, 4.66% (14/300) a infecțiilor cu *D. immitis* și 1.33% (4/300) pentru infecțiile cu *A. reconditum*. Nu au fost observate diferențe semnificative din punct de vedere statistic între diverse zone ale regiunii studiate.

Acest studiu ne oferă o imagine clară a prevalenței infecțiilor canine cu *Dirofilaria*. Această informație este utilă medicilor veterinari, dar având în vedere potențialul zoonotic al acestei infecții, poate prezenta interes și pentru medicii umani.

Capitolul IX este numit **“Folosirea tehnicii MALDI-TOF pentru identificarea speciei de flebotomi”**. Acesta este ultimul capitol al acestei teze și studiază colectarea și identificarea flebotomilor folosind tehnica de spectrometrie de masă MALDI-TOF.

Tehnica MALDI-TOF a fost folosită pentru mult timp în microbiologie ca o alternativă ieftină, eficientă și rapidă pentru a identifica diverse microorganisme cum sunt bacteriile sau fungi. Cu timpul au fost descoperite diverse aplicații pentru această tehnologie printre care și utilizarea acesteia în domeniul entomologiei.

Flebotomii sunt insecte importante pentru răspândirea leishmaniozei canine, aceștia reprezentând principalul mod de transmitere a *Leishmaniei infantum*. Studiul biologiei și ecologiei acestor insecte capătă importanță sporită datorită acestei abilități de a transmite *L. infantum*.

Nu toate speciile de flebotomi pot să transmită leishmanioza, iar din acest motiv identificarea de specie este importantă. Pentru foarte mult timp flebotomii

au fost identificați morfologic, dar această metodă necesită personal specializat și cu experiență. Au fost folosite și tehnici bazate pe biologia moleculară, ca PCR, dar această tehnică are un cost crescut. Tehnica MALDI-TOF oferă o alternativă ieftină și eficientă de a identifica flebotomi.

Capcanele de tip “CDC light trap” sunt indispensabile pentru studiul insectelor hemofage cu fototropism pozitiv, dar au un cost semnificativ și există puțini producători la nivel mondial, fapt pentru care de cele mai multe ori există și un cost semnificativ de transport. Din acest motiv, au fost construite capcane tip “CDC light trap” din materiale autohtone ce au fost folosite pentru colectarea de flebotomi din 21 de puncte de colectare, din patru regiuni din nordul Greciei. Au fost identificați morfologic 110 flebotomi (44 femele și 66 masculi), dintre care: 48 *Phlebotomus tobbi*, 21 *Sergentomya minuta*, 25 *Phlebotomus neglectus*, 13 *Phlebotomus perfiliewi*, 1 *Phlebotomus papatasi* și 2 *Phlebotomus simici*.

Omogenizarea probelor este un pas important pentru analiza MALDI-TOF, dar omogenizarea manuală a probelor necesită mai mult timp și poate să producă rezultate neomogene din punct de vedere al calității. Din acest motiv am dezvoltat o metodă de omogenizare automată a flebotomilor.

O parte din spectrele obținute în urma analizei MALDI-TOF au fost folosite pentru crearea unei baze de date necesară identificării. Baza de date a fost creată pentru speciile *Phlebotomus tobbi*, *Sergentomya minuta*, *Phlebotomus neglectus*, și *Phlebotomus perfiliewi*. Pentru speciile *Phlebotomus papatasi* și *Phlebotomus simici* nu a fost posibilă crearea unei baze de date datorită numărului mic de exemplare. Aceste ultime două specii au fost identificate doar morfologic.

Acest ultim studiu și-a îndeplinit obiectivul de a facilita cercetarea flebotomilor, optimizând metodele de capturare și identificare a acestora.

Obiectivul final al acestei teze este de a completa informațiile despre epidemiologia leishmaniozei, babesiozei, hepatozoonozei și dirofilariozei din sudul României, în contextul unei schimbări ale prevalenței și distribuției bolilor vectoriale la nivel mondial.