

## REZUMAT

**Cuvinte-cheie:** analiză filogenetică, anticorpi antirabici, NGS, rabie, secvențiere.

Teza de doctorat intitulată *„Cercetări privind metodologia de diagnostic, supraveghere, prevenire și control în rabie”* cuprinde 199 de pagini și conform normelor în vigoare este structurată în două părți principale: prima parte, intitulată *„Stadiul actual al cunoașterii”* care cuprinde 18 pagini și partea a doua *„Contribuții personale”*, extinsă pe 133 pagini, la care se adaugă cuprinsul, introducerea, rezumatul, bibliografia aferentă și anexele.

Prima parte, *„Stadiul actual al cunoașterii”* cuprinde două capitole, ce descriu succint caracterele etiologice și epidemiologice, dar și metodologia de diagnostic, supraveghere, control și eradicare a infecției rabice la animale, cu ultimele actualizări în domeniu din literatura de specialitate atât din străinătate, cât și din țara noastră.

Partea a doua *„Contribuții personale”* este structurată în 9 capitole, fiecare prezentând detaliat rezultatele întreprinse pe durata studiilor doctorale, ultimul dintre acestea sintetizând concluziile finale aferente cercetărilor obținute.

Pentru realizarea tezei de doctorat, 59 de probe de creier (38 din nord-estul României și 21 din Republica Moldova), 72 de mandibule de vulpi din județele Moldovei, 392 de probe reprezentate de lichid toracic provenite de la vulpi și 312 de probe (seruri și lichid toracic) provenite de la mistreți au fost luate în studiu.

CAPITOLUL III ce redă *„Scopul, obiectivele tezei de doctorat și cadrul organizatoric al cercetărilor”* descrie pe scurt instituțiile și cadrele organizatorice în care s-au desfășurat cercetările tezei de doctorat, alături de scopul și obiectivele propuse.

Ținând cont de importanța bolii, dar și de puținele cercetări realizate până în prezent în țara noastră, cât și de lipsa informațiilor privind Republica Moldova (a doua țară luată în studiu), cercetările întreprinse în cadrul tezei, au avut ca scop realizarea unei anchete epidemiologice a cazurilor de rabie din nord-estul României, dar și din Republica Moldova vizând o perioadă de 7 ani, pentru o bună înțelegere a situației actuale, dar și pentru stabilirea unei prevalențe fidele a bolii în rândul animalelor domestice și sălbatice. Un alt obiectiv a fost acela de a realiza un studiu epidemiologic molecular, prin efectuarea unei analize filogenetice a tulpinilor de virus rabic din zona de studiu, cu scopul de a urmări circulația, distribuția, evoluția virusului rabic, alături de mecanismele moleculare ale adaptării virale.

CAPITOLUL IV intitulat *„Investigații epidemiologice privind prezența și prevalența infecției rabice la animale în nord-estul României și în Republica Moldova”*, prezintă rezultatele obținute în urma anchetei epidemiologice efectuate pentru perioada 2010-2016, ce au vizat cele 8 județe ale regiunii Moldova, respectiv Republica Moldova, obținând o privire de ansamblu a situației cazurilor pozitive de rabie.

Astfel, prevalența cazurilor pozitive de rabie la animalele domestice, raportată la cele 781 de probe primite la laborator cu suspiciunea de rabie, în perioada 2010-2016 în nord-estul

țării noastre a fost de 24,07%. Specia domestică cea mai afectată a fost reprezentată de către bovine cu un total de 103 cazuri (13,19%); cele mai multe cazuri pozitive de rabie la animalele domestice au fost confirmate pe raza județului Iași cu un total de 48 de cazuri (6,14%). Prevalența cazurilor pozitive de rabie la animalele sălbatice, raportată la cele 1314 probe pentru aceeași perioadă luată în studiu a fost de 23,05%. Cele mai afectate au fost vulpile cu un total de 284 de cazuri (21,61%); cele mai multe cazuri pozitive de rabie la animalele sălbatice au fost raportate în județul Suceava cu un total de 93 de cazuri (7,07%).

În ceea ce privește situația cazurilor de rabie din Republica Moldova, din totalul celor 1150 de probe provenite de la animalele domestice din perioada 2010-2016, 573 au fost pozitive, iar diferența de 577 negative, înregistrându-se o prevalență totală de 49,82%. Cele mai multe cazuri au fost confirmate la bovine cu un total de 255, reprezentând 22,17%. Din totalul celor 305 probe provenite de la animalele sălbatice din Republica Moldova, 191 au fost confirmate pozitive și 114 negative, înregistrându-se o prevalență totală de 62,62%. Specia sălbatică cea mai afectată a fost vulpea, cu un total de 158 de cazuri pozitive (51,80%).

**CAPITOLUL V „Confirmarea diagnosticului de rabie prin metoda de imunofluorescență directă”** a avut ca scop reconfirmarea diagnosticului de rabie al probelor colectate pentru studiul nostru, înaintea caracterizării moleculare a acestora, în vederea corelării rezultatelor, dar și de a evidenția conjugatul optim în vederea obținerii de rezultate precise și valide, fiind testate în acest sens 3 conjugate prin comparare.

Astfel, din totalul celor 59 de probe retestate, 43 dintre acestea au fost pozitive și 16 negative la tehnica de IFD. Probele DR1016, DR1199, DR1202, DR1344, DR1354 și DR1355, considerate pozitive în cadrul laboratoarelor din cadrul cărora au fost colectate, în urma testărilor noastre, acestea au fost negative, atât la IFD, cât și la tehnicile ulterioare (RTCIT, RT-PCR convențional, Real time qRT-PCR, nefiind detectat ARN viral).

Rezultatele noastre subliniază importanța utilizării unui conjugat calitativ în stabilirea unui diagnostic corect și precis. În majoritatea cazurilor, calitatea probelor de testat alături de cea a conjugatului implementat au o importanță majoră în obținerea unui rezultat valid, nerespectarea acestor recomandări ducând la posibilitatea aparițiilor de rezultate fals pozitive sau fals negative. Chiar dacă, un rezultat fals pozitiv nu are consecințe severe, unul fals negativ în schimb, poate avea consecințe tragice atunci când sunt implicate și victime umane.

În cadrul studiului comparativ privind cele 3 tipuri de conjugate utilizate, cele mai bune rezultate au fost obținute cu ajutorul conjugatului Bio-Rad, rezultate superioare celorlalte două, acesta oferind o intensitate crescută a semnalului fluorescent și un fundal întunecat, fiind capabil să identifice antigenul viral în 100% din câmpurile microscopice examinate într-un număr crescut de probe.

**Capitolul VI „Confirmarea diagnosticului de rabie prin tehnica de izolare a virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT)”** este structurat pe 3 subcapitole și a avut ca scop confirmarea diagnosticului de rabie prin intermediul RTCIT, ca metodă alternativă pentru proba biologică pe șoareci, de a evidenția linia celulară optimă, dar și sistemul ideal în vederea izolării, respectiv multiplicării virusului rabic.

Astfel, cercetările întreprinse în cadrul subcapitolului „**Izolarea virusului rabic pe culturi celulare (RTCIT) ca metodă alternativă pentru proba biologică pe șoareci**” au fost

realizate pentru toate cele 59 de probe luate în studiu din ambele țări, utilizând linia celulară de referință N2a (neuroblastome murine), la concentrația de  $8 \times 10^5$  celule/ml, în cameră Labtek, cu ajutorul conjugatului Bio-Rad, rezultatele fiind în concordanță cu cele obținute în cadrul IFD și cu cele raportate în literatura de specialitate. Ținând cont de faptul că, rabia are un impact medical major în rândul oamenilor, chiar dacă rezultatele fals negative nu sunt comune în cazul tehnicii de imunofluorescență directă, o metodă alternativă care să fie rapidă, specifică și sensibilă trebuie să fie disponibilă ca și back-up, RTCIT îndeplinind toate aceste criterii.

Al doilea subcapitol, „**Studiu comparativ privind sensibilitatea a două linii celulare distincte N2a și BHK-21 utilizate pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare**” a fost realizat cu scopul de a evidenția și confirma linia celulară optimă pentru izolarea și multiplicarea virusului rabic pe culturi celulare. Astfel, un total de 20 de probe au fost luate în studiu, fiind utilizate două linii celulare diferite: N2a (neuroblastome murine) și BHK-21 (celule renale de pui de hamster). În ceea ce privește linia celulară N2a, din cele 20 de probe testate, toate (100%) au fost pozitive pentru perioada de incubație de 48 de ore și 19 (95%) pentru cea de 72 de ore, în timp ce pentru linia celulară BHK-21, 19 probe (95%) au fost pozitive pentru perioada de incubație de 48 de ore (cu excepția probei DR1032) și doar 14 probe (70%) pentru cea de 72 de ore (cu excepția probelor DR1020, DR1022, DR1027, DR1029, DR1030 și DR1036).

Evaluând rezultatele obținute pentru cele 2 linii celulare, N2a este mult mai sensibilă pentru multiplicarea virusului rabic decât BHK-21, fiind preferată perioada de incubație de 48 de ore. Cu toate că, ambele linii celulare sunt de referință pentru virusul rabic, linia N2a rămâne cea mai sensibilă, rezultatele fiind superioare celor obținute pentru linia BHK-21.

Ultimul subcapitol „**Utilizarea a două sisteme diferite pentru izolarea virusului rabic pe culturi celulare**” a avut ca scop realizarea RTCIT utilizând 2 sisteme diferite, și anume: microplăcile de titrare ( $n=96$  godeuri de plastic) și camerele de sticlă Labtek ( $n=8$  căsuțe) în ideea de a observa și de a stabili dacă virusul rabic se multiplică la fel de bine în ambele tipuri de suport. Aceste cercetări au fost efectuate pe un total de 16 probe, utilizând linia celulară N2a cu concentrații diferite pentru cele 2 sisteme menționate anterior.

Astfel, în cadrul sistemului de sticlă LabTek, a fost utilizată o singură concentrație celulară de  $8 \times 10^5$  celule/ml, cu o perioadă de incubație de 48h, toate cele 16 probe (100%) testate fiind pozitive, acest sistem fiind de regulă utilizat în tehnica RTCIT pentru confirmarea diagnosticului de rabie.

Cea de-a doua procedură în microplăci ELISA a fost realizată utilizând 2 concentrații celulare diferite, și anume  $5 \times 10^5$  celule/ml și  $2,5 \times 10^5$  celule/ml, cu o perioadă de incubație de 72h, fiecare probă fiind inoculată în duplicat. Astfel, pentru concentrația celulară de  $5 \times 10^5$  celule/ml, din cele 16 probe testate, 6 (37,5%) au fost negative și 10 (62,5%) pozitive, aceeași situație înregistrându-se și pentru concentrația  $2,5 \times 10^5$  celule/ml. Probele DR1025, DR1027, DR1028, DR1030 and DR1032 au fost negative pentru ambele concentrații celulare. Pentru alte 2 probe, rezultatele au fost diferite. Astfel, DR1029 a fost pozitivă pentru prima concentrație celulară, dar negativă pentru cea de-a doua. În mod opus, proba DR1031 a fost negativă pentru  $5 \times 10^5$  celule/ml, dar pozitivă pentru  $2,5 \times 10^5$  celule/ml.

Cele mai bune rezultate au fost obținute în cadrul sistemului LabTek, concentrația celulară de  $8 \times 10^5$  celule/ml fiind considerată a fi optimă pentru o bună izolare și multiplicare a virusului rabic. În ceea ce privește microplăcile de plastic, rezultatele au fost inconstante, obținând rezultate satisfăcătoare pentru concentrațiile celulare per ml de  $5 \times 10^5$  și  $2,5 \times 10^5$ , dar nu și pentru cele sub  $2 \times 10^5$  celule/ml, întrucât numărul redus de celule nu a permis izolarea, respectiv multiplicarea virusului, nefiind recomandată utilizarea acestora. Rezultatele obținute pentru microplăci este posibil să fi fost influențate de către congelările și decongelările repetate, alături de condițiile de depozitare ale acestora, ceea ce a dus la o pierdere a infectivității.

CAPITOLUL VII intitulat „**Confirmarea diagnosticului de rabie prin tehnicile de biologie moleculară real time PCR și RT-PCR convențional**” a fost realizat cu scopul de a confirma rezultatele obținute în cadrul tehnicilor de referință și prin intermediul celor de biologie moleculară, în vederea utilizării acestora ca și instrument adițional de detecție a lyssavirusurilor.

Astfel, au fost realizate în acest sens, extracții ARN, al tuturor celor 59 de probe luate în studiu, urmate de cuantificarea acizilor nucleici prin intermediul tehnicii *One step Real time SYBRGreen qRT-PCR* utilizând un ciclor în timp real, obținând un total de 43 de probe pozitive și 16 negative, rezultate aflate în concordanță cu cele obținute la tehnicile de referință. În cazul probelor testate, coeficientul de determinare  $R^2$  a avut o valoare cuprinsă între 0,98-0,99, fiind considerată satisfăcătoare, iar eficacitatea PCR-ului a înregistrat o valoare cuprinsă între 1-1,04, fiind ideală pentru curba standard. Semnalul fluorescent emis de către SYBRGreen alipit de produsul PCR al probelor testate a fost emis între ciclurile 6-14, valorile Ct obținute au variat între 13,71 și 23,64 pentru probele pozitive confirmate, iar numărul de copii/reacție s-a încadrat între  $1,37 \times 10^5$  și  $1,34 \times 10^8$ . Aceste valori ne indică faptul că unele probe sunt mult mai concentrate în virus rabic decât altele, concentrația probelor fiind reflectată și în diferența numărului necesar de cicluri pentru a dobândi semnalul fluorescent.

Următorul pas a constat în amplificarea parțială a genei N a virusului rabic prin intermediul unui *Heminested RT-PCR convențional*, utilizând perechile de primeri JW12/JW6 și JW12/JW10, ce permit amplificarea specifică a nucleoproteinei pentru toate cele 15 specii de virus rabic, fiind obținut un produs de amplificare de 606-pb. În urma testării a 47 de probe din totalul celor 59 incluse în studiul nostru, 43 au fost pozitive și 4 negative, rezultate aflate în concordanță cu IFD și RTCIT.

În vederea realizării secvențierii genei complete N, aceasta a fost amplificată, utilizând de asemenea un *Heminested RT-PCR convențional*, cu ajutorul primerilor JW12 / PVN8bis și M13-20JW12 / M13RevPVN8bis, pe un număr de 43 de probe, obținând un total de 41 de probe pozitive și 2 negative.

Ultimul pas în cadrul acestui capitol a constat în efectuarea tehnicii *TaqMan Real time qRT-PCR*, ce a avut ca și obiectiv încadrarea probelor într-unul din genotipurile 1 (RABV), 5 (EBLV-1) și 6 (EBLV-2), ce se regăsesc pe teritoriul Europei, prin utilizarea de sonde fluorescente LysGt1, LysGt5 și LysGt6, ce permit o amplificare specifică a nucleoproteinei rabice genotipurilor aferente.

Pentru detecția genotipului 1 RABV, tehnica a fost realizată în cazul a 47 de probe (DR1016-DR1036, DR1187-DR1202, DR1331-DR1336, DR1343-DR1358), 43 dintre acestea fiind pozitive și 4 negative, valorile Ct variind între 19,57 și 26,97. Pentru detecția genotipurilor 5 EBLV-1 și 6 EBLV-2, tehnica a fost realizată pentru primele probe luate în studiu în anul 2015, și anume DR1016-DR1036, toate probele fiind negative, cu excepția controalelor pozitive care s-au încadrat în standard.

Rezultatele pozitive obținute pentru primul genotip și cele negative pentru genotipurile 5 și 6, confirmă și încadrează izolatele de virus rabic în cadrul primului genotip RABV.

**CAPITOLUL VIII „Caracterizarea moleculară a tulpinilor de virus rabic izolate din nord-estul României și din Republica Moldova”** a fost realizat cu scopul de a efectua o secvențiere, respectiv o analiză filogenetică a genei parțiale și complete N. În acest sens, au fost luate în considerare probele pentru care s-a reușit amplificarea atât pentru gena parțială N, cât și pentru cea totală. Din totalul probelor trimise pentru secvențiere în cadrul Companiei Genoscreen din Lile, Franța, s-a reușit secvențierea a 39 de probe pentru gena parțială N, respectiv 37 de probe pentru gena totală N.

Pentru realizarea analizei filogenetice, variabilitatea genetică a diferitelor izolate incluse în studiul nostru a fost apreciată utilizând metoda Neighbour Joining (NJ), respectiv PhyML alături de alte programe și soft-uri.

Un arborele filogenetic a fost realizat pentru gena parțială și completă N cu scopul de a determina dacă arborele generat prezintă aceeași topologie. Astfel, acesta a fost efectuat comparând secvențele obținute în cadrul studiului pentru gena parțială (n=39) și completă (n=37) N cu secvențe nucleotidice de referință extrase din baza de date internațională GenBank. A fost evaluată pentru toți arborii generați prin intermediul metodei NJ, confidența arborilor. Cea mai utilizată metodă statistică, bootstrap a fost calculată în programul de analiză filogenetică (MEGA6, opțiunea bootstrap).

În urma analizei filogenetice realizate în studiul nostru pe probe provenite din nord-estul României, dar și din Republica Moldova, s-a arătat apartenența la un singur grup filogenetic, și anume NEE (North-Eastern Europe).

Acest grup are o distribuție geografică amplă, fiind identificat de-a lungul anilor în diferite țări precum Polonia, Estonia, Lituania, Bulgaria, estul Slovaciei, Ucraina și Rusia, așa cum a fost demonstrat de către Bourhy ș.a., 1999, Kuzmin ș.a., 2004, McElhinney ș.a., 2006, Picard ș.a., 2012, Robardet ș.a., 2013. În aceste țări, izolatele au provenit atât de la vulpi, cât și de la ratoni, ceea ce evidențiază faptul că, ambele specii sunt rezervoare pentru această variantă de virus. În studiul nostru, grupul NEE a fost identificat la toate speciile testate și anume: câine, pisică, bovină, vulpe, lup, căprior și dihor, ceea ce demonstrează faptul că, această variantă se poate adapta la diferite specii de animale.

Până în prezent, la noi în țară nu a mai fost realizată secvențierea completă a nucleoproteinei virusului rabic, implicit o analiză filogenetică aferentă, acestea fiind primele date raportate până în prezent. Referitor la rezultatele obținute pentru probele din Republica Moldova, acestea sunt singulare, până în momentul de față nefiind întreprins nici un studiu epidemiologic molecular.

În ceea ce privește analiza filogenetică realizată pentru partea de N-E a țării noastre, a fost identificat grupul filogenetic NEE, fiind semnalată pentru prima dată prezența acestuia în județele Botoșani, Iași, Vaslui, Galați și Vrancea.

CAPITOLUL IX intitulat „**Secvențierea completă a genomului virusului rabic**” a avut ca scop caracterizarea întregului genom a virusului rabic, folosind secvențierea de nouă generație pe un număr selectiv de probe, în vederea identificării existenței unor posibile modificări de patogenitate la nivel de specie animală, dar și pentru o mai bună înțelegere a diversității lyssavirusurilor. Aplicarea secvențierii de nouă generație în studiul virusurilor va conduce către o nouă eră a descoperirii și caracterizării acestora, revoluționând studiile filogeografice în domeniul virologiei.

Secvențierea de nouă generație a fost realizată pentru prima dată atât în țara noastră, cât și în Republica Moldova pe probe provenite de la animale domestice și sălbatice.

Analiza similarităților secvențelor nucleotidice și aminoacizilor ale celor 5 gene ale virusului rabic au înregistrat următoarele procentaje de similarități: gena N 96-100%, gena P 96-100%, gena M 96-100%, gena G 97-100%, iar gena L 97-99%.

Consecutiv studierii pozițiilor de aminoacizi ale genei G a virusului rabic, cunoscute ca fiind implicate în patogenitate, nu au fost identificate modificări care pot sugera diferențe de patogenitate la nivel de specie animală.

Pentru o mai bună înțelegere a diversității lyssavirusurilor, respectiv a diferențelor de patogenitate sunt necesare studii aprofundate care să implice un areal geografic mai extins, dar și un număr mai ridicat de probe.

CAPITOLUL X „**Cercetări privind strategia de supraveghere și control a infecției rabice la animale în nord-estul României**” a avut ca scop verificarea eficacității campaniilor de supraveghere din nord-estul țării noastre prin determinarea anticorpilor antirabici postvaccinali, respectiv determinarea marketului vaccinal la vulpi. De asemenea, în ideea de a confirma sau nu ipoteza conform căreia mistreții ar constitui potențiali competitori pentru aceste momeli, o serie de probe au fost colectate și testate în acest sens.

În cadrul primului subcapitol „**Detecția anticorpilor antirabici postvaccinali și determinarea markerului vaccinal - tetraciclina - la vulpi**”, zona de studiu a fost reprezentată de cele 8 județe din regiunea Moldovei a țării noastre, alături de județele Maramureș și Buzău, zone unde s-a desfășurat vaccinarea antirabică orală la vulpi, în acest sens fiind testate 392 de probe de lichid toracic și 72 probe de mandibule.

Detecția și titrarea anticorpilor antirabici pentru cele 392 de probe a fost realizată prin intermediul metodei imunoenzimatică ELISA de blocare, 345 dintre acestea fiind lucrate cu ajutorul kit-ului *BioPro Rabies ELISA Ab Kit*, (*BioPro, Prague, Czech Republic*), iar restul de 47 cu ajutorul kit-ului *Platelia<sup>TM</sup> Rabies II Kit ad usum veterinarium (BioRad. Franța)*.

Astfel, în cadrul primului kit, din totalul celor 345 de probe de vulpi, 98 au fost pozitive (28,40%) și 247 negative (71,60%). Din totalul celor 345 de probe de vulpi lucrate, 247 (71,60%) au înregistrat un procentaj de blocare (PB) <40%, 47 (13,62%) s-au încadrat în categoria unui PB de 40-70%, iar restul de 51 (14,78%) în ultima categorie cu un PB >70%. O probă este considerată pozitivă dacă PB este egal sau mai mare de 40% și negativă dacă PB

este mai mic de 40%, în scopul evaluării eficacității campaniilor de vaccinare, fiind recomandată ca și referință valoarea PB-ului  $\geq 40\%$ .

În urma testării celor 47 de probe prin intermediul kit-ului Platelia Rabies, 14 dintre acestea au fost pozitive și 33 negative la detecția anticorpilor antirabici. Din totalul celor 47 de probe testate prin intermediul acestui kit, nici una dintre probe nu s-a încadrat în prima categorie de  $>4$  EU/ml, iar pentru 24 dintre acestea nu s-a înregistrat nici un semnal de seroconversie, fiind situate sub valoarea de 0,125 EU/ml. Un nivel insuficient de anticorpi antirabici a fost detectat în cazul a 9 probe, cu valori cuprinse între 0,125-0,5 EU/ml, considerat a fi unul neprotectiv în cazul unei infecții cu virusul rabic. Doar 14 probe s-au încadrat în categoria 0,5-4 EU/ml, cu un titru de anticorpi suficient pentru a contracara o eventuală infecție cu virusul rabic.

În ceea ce privește determinarea markerului vaccinal tetraciclina din dinții, respectiv mandibulele vulpilor, din totalul celor 72 de probe testate, 60 dintre acestea au fost pozitive și 12 negative. În cadrul probelor noastre, au fost detectate linii fluorescente în ciment, doar în cazul a 2 probe din totalul celor 72, în dentină un număr de 33 de probe, iar în os, 60 de probe. În ceea ce privește intensitatea semnalului fluorescent detectat, aceasta a variat de la + pentru 17 probe, ++ pentru 13 probe și +++ pentru 30 de probe.

Cel de-al doilea subcapitol „*Detecția anticorpilor antirabici la mistreți*” a fost realizat în ideea de a stabili dacă mistreții intervin asupra eficacității acestor campanii, prin consumul necontrolat al momelilor vaccinale, în acest sens fiind testate 312 probe (ser și lichid toracic), provenite din campaniile de vânatoare, realizate în perioada 2014-2016.

Astfel, din totalul celor 312 probe de mistreți testate, 132 au fost pozitive (42,30%) și 180 negative (57,70%) prin intermediul metodei serologice ELISA. Pentru a evalua sensibilitatea testului ELISA, 56 dintre probele confirmate pozitive în cadrul acestui test, au fost testate în paralel și prin intermediul tehnicii de referință FAVN, înregistrându-se o sensibilitate de 96,43%. Pentru 2 din cele 56 de probe testate prin intermediul FAVN-ului, titrul de anticorpi a fost de 0,02 UI/ml, respectiv 0,22 UI/ml, rezultate aflate în discordanță cu cele obținute la ELISA.

Detecția anticorpilor antirabici din probele de mistreți prin testul ELISA a evidențiat un număr surprinzător de probe pozitive (132/312), acestea fiind primele date raportate la această specie până în prezent în țara noastră. Rezultatele noastre scot în evidență faptul că, aceste animale sălbatice reprezintă un adevărat pericol pentru buna desfășurare a campaniilor de vaccinare orală a vulpilor, fiind principalii competitori pentru consumul momelilor.

În încheierea acestor cercetări, sunt prezentate succint un număr de 24 concluzii finale.