

## REZUMAT

Majoritatea căpușelor ce infestază animalele de companie sunt reprezentate de specii ce se hrănesc pe trei gazde vertebrate diferite, acest lucru transformând căpușele în vectori atât de importanți în transmiterea bolilor.

Interesul tot mai crescut al cercetătorilor de a studia vectorii și bolile transmise este dat de mai mulți factori, în principal de schimbările climatice constatate, urbanizarea dar și de unii factori socio-economici.

Bolile vectoriale sunt considerate adevărate provocări pentru medicii veterinari, deoarece semnele clinice pot fi difuze sau suprapuse cu alte patologii. De asemenea, co-infestarea cu căpușe dar și co-transmiterea de agenți patogeni sunt relevante atât pentru sănătatea publică, cât și pentru sănătatea animală.

Teza de doctorat intitulată **”Cercetări privind bioecologia căpușelor ixodide din zona de Est a României și epidemiologia bolilor transmise de acestea”** este structurată în conformitate cu normele în vigoare, în două părți principale: o primă parte intitulată **”Stadiul actual al cunoașterii”**, ce conține un număr de 25 pagini și o a doua parte, **”Contribuții personale”** ce detaliază rezultatele obținute în perioada studiilor, având un număr de 51 pagini. Pe lângă aceste două părți, teza conține un cuprins, mulțumiri, o introducere, un rezumat, lista surselor bibliografice, lista abrevierilor, lista de figuri și lista tabelelor. Lucrarea prezintă conține 13 figuri și 20 tabele, fiind consultate și 317 surse bibliografice.

Prima parte, **”Stadiul actual al cunoașterii”**, este structurată în trei capitole și prezintă informații cu privire la importanța căpușelor implicate în transmiterea agenților patogeni, principalele boli vectoriale transmise de căpușe, precum și implicațiile clinice la câinii cu babesioză și co-infecțai cu alte boli transmise de căpușe.

**Primul capitol**, cu titlul **”Importanța căpușelor implicate în transmiterea bolilor vectoriale”** este împărțit în trei subcapitole și începe prin a descrie câteva aspecte ale ecologiei căpușelor ixodide, reprezentate de climatul adecvat și activitatea sezonieră a acestora, rolul încălzirii globale și dinamica populațiilor de căpușe ixodide. De asemenea, sunt oferite și informații privind principalele specii de căpușe semnalate în România și Europa, precum și importanța acestora asupra animalelor de companie și a sănătății umane.

**Cel de-al doilea capitol**, **”Bolile vectoriale transmise de căpușe la câini”** este format din patru subcapitole ce se concentrează pe descrierea principalele boli parazitare și bacteriene transmise de căpușe: babesioza, hepatozoonoza, anaplasmoza, erlichioza și borelioza. Acest capitol prezintă date generale preluate din literatură privind etiologia, patogeniza, simptomatologia, metode de diagnostic și tratamentul utilizat.

**Cel de-al treilea capitol**, **”Implicațiile clinice la câinii cu babesioză și co-infecțai cu alte boli transmise de căpușe”** descrie succint date identificate în literatură cu privire la multitudine de agenți patogeni ce pot co-infecța animalele, aceste date fiind relevante și pentru

sănătatea publică. De asemenea, co-infecțiile pot schimba manifestările clinice asociate îngreunând diagnosticul și schimbând prognosticul pacienților.

Partea a doua a tezei, ”**Contribuții personale**” este alcătuit din cinci capitole, fiecare capitol prezentând detaliat rezultatele obținute.

**Capitolul 4** prezintă locul desfășurării experimentelor, scopul și obiectivele cercetărilor. **Scopul** lucrării de doctorat ”*Cercetări privind bioecologia căpușelor ixodide în zona de Est a României și epidemiologia bolilor transmise de acestea*” este de a identifica agenții patogeni existenți și posibilele co-infecții la câinii și căpușele colectate de pe aceștia, în zona de Est a României.

Primul **obiectiv** al tezei a constat în **identificarea morfologică și moleculară a principalilor agenți patogeni parazitari și bacterieni din sângele câinilor infestați cu căpușe**, prezentați în cadrul Clinicii de Boli Parazitare cu simptomatologie specifică infestației cu *Babesia* spp.

Al doilea **obiectiv** a urmărit **colectarea și identificarea morfologică a căpușelor atașate pe corpul câinilor și identificarea moleculară a principalilor agenți patogeni parazitari și bacterieni**, pentru a evalua încărcătura microbiană și posibilele co-infecții la care au fost expuși câinii.

Al treilea **obiectiv** a vizat **detectarea co-infecțiilor întâlnite la câini în zona de Est a României**.

Studiile moleculare reduse a patogenilor transmiși de căpușe la câini și a posibilelor co-infecții au condus la realizarea tezei, care aduce elemente noi în comunitatea veterinară și sănătatea publică.

Originalitatea acestei teze de doctorat constă în:

- ☉ prima identificare a speciei *B. rossi* la doi câini simptomatici din România, pentru care mai considerăm că sunt necesare studii suplimentare pentru a confirma prezența acestui agent patogen și a vectorului său în Europa și în România.
- ☉ prima raportare a simbiotului *Candidatus Midichloria mitochondrii* în sângele câinilor și în căpușele colectate de pe aceștia, necesitând investigații suplimentare pentru a înțelege mai bine rolul și posibilele implicații asupra animalelor și a sănătății publice.

**Capitolul 5** al tezei, intitulat ”**Identificarea moleculară a speciilor *Babesia* și co-infecția cu *Hepatozoon canis* la câini și căpușe în estul României**” începe cu o introducere, descrierea materialelor și metodelor utilizate pentru realizarea studiului. În acest studiu au fost incluși 90 de câini ce s-au prezentat în cadrul Clinicilor cu semne compatibile cu babesioză canină (hipertermie, anemie hemolitică, trombocitopenie, icter și hemoglobinurie) (Irwin, 2009), fiind recoltate probe de sânge integral (EDTA) pentru a putea fi analizate microscopic frotiurile de sânge subțiri, colorate prin metoda rapidă Romanowsky (Diff-Quick). Restul probelor de sânge au fost depozitate la – 20°C până când a fost extras ADN-ul pentru detectarea moleculară a *Babesia* spp. și *H. canis*.

Fiecare câine a fost supus unei examinări clinice, iar toate căpușele detectabile au fost colectate pentru identificarea speciilor prin chei taxonomice standard (Estrada-Pena și colab., 2004; Dantes-Torres și colab., 2013). Căpșele colectate au fost depozitate în etanol 70% și separate individual în funcție de fiecare animal, pentru identificarea morfologică. **Toate căpușele identificate (Nr.=182) au fost împărțite în Nr.=100 de eșantioane** (nouă eșantioane compuse din trei căpușe, 64 de eșantioane formate din două căpușe și 27 eșantioane individuale) compuse din specimene colectate de la același câine și specii omogene, care au fost testate pentru speciile *Babesia* și *H. canis* folosind analize moleculare.

**Treizeci și cinci de câini (38.9%; 95% CI = 29.0–49.8) au prezentat semne clinice ușoare și 55 (61.1%; 95% CI = 50.2–71.0) au exprimat forma acută, atribuită babesiozei.** Cele 90 de probe prelevate de la câini au fost testate pentru *Babesia* spp. folosind un frotiu subțire de sânge colorat și teste moleculare (PCR), toate probele fiind pozitive la ambele metode. La câini au fost găsite trei specii *Babesia*: ***B. canis*** (85/90 = 94.4%; 95% CI = 86.9–97.9) (99.1–100% identitate cu numere de acces GenBank: MK571831), ***B. vogeli*** (3/90 = 3.3%; 95% CI = 0.9–10.1) (identitate 100% cu numărul de acces GenBank: KY290979) și ***B. rossi*** (2/90 = 2.2%; 95% CI = 0.4–8.6) (identitate 100% cu numărul de acces GenBank : MT740273). Toți câinii testați au fost testați **negativ** pentru *H. canis*.

În plus, câinii care au exprimat semne clinice acute au fost pozitivi pentru *B. canis* cu o prevalență de 58.9% (95% CI = 48.0–69.0) și *B. rossi* cu o prevalență de 2.2% (95% CI = 0.4–8.6). Câinii care au prezentat semne clinice ușoare au fost pozitivi pentru *B. canis* cu o prevalență de 35.6% (95% CI = 25.9–46.4) și *B. vogeli* cu o prevalență de 3.3% (95% CI = 0.9–10.1).

Mai mult, cinci câini au murit (5.6%, patru infestați cu *B. canis* și unul cu *B. rossi*) iar pentru trei dintre ei evoluția post-tratament rămâne necunoscută. În general, 91.1% dintre câini și-au revenit.

Câinii care au prezentat căpușe în timpul vizitei de rutină au fost 33.6% din total (38/113; 95% CI=25.1–43.2). Pe scurt, 71.1% (27/38; 95% CI=53.9–84.0) dintre câini au prezentat infestație scăzută, 21.1% (8/38; 95% CI = 10.1–37.8) au prezentat o infestație moderată și 7.9% (3/38; 95%; CI = 2.1–22.5) a prezentat o infestație ridicată. **Un total de 182 de căpușe au fost colectate de la câini**; dintre acestea, 58 de căpușe au fost găsite la 15/90 (16.7%; 95% CI = 9.9–26.3) câini simptomatici și 124 de căpușe la alți 23 de câini testați anterior pentru babesioză (așa cum este descris mai sus). Mai exact, au fost găsite 179 căpușe adulte (113 femele hrănite și 66 de masculi), 2 nimfe și 1 larvă.

Au fost analizare o sută de eșantioane de căpușe și identificate după cum urmează: ***Ixodes ricinus*** (64%; 95% CI = 53.7–73.2), ***Dermacentor reticulatus*** (33%; 95% CI = 24.1–43.2) și **grupul *Rhipicephalus sanguineus*** (3%; 95% CI = 0.8–9.1). ***Babesia canis*** (MIR = 81%; 95% CI = 71.7–87.9) (99.8–100% identitate cu numere de acces GenBank: MK571831, accesat la 1 martie 2021), ***B. vogeli*** (MIR = 3%; 95% CI = 0.78 –9.6) (identitate 100% cu numărul de acces GenBank: KY290979, accesat la 1 martie 2021) și ***B. microti-like*** (MIR = 1%; CI 95% = 0.1–6.2) (identitate 100% cu numărul de acces GenBank: MN355504), **au fost**

**găsite în căpușe.** În plus, **15 căpușe au fost pozitive pentru *H. canis*** (MIR = 15%; 95% CI = 8.9–23.9), **șase au fost co-infectate cu *B. canis* și una cu *B. microti-like*.**

Acest studiu este cuprinde primul studiu molecular al *Babesia* spp. și *H. canis* la câinii cu proprietari și la căpușele colectate de pe aceștia, din partea de Est a României. Peste 90% dintre câini și peste 80% dintre căpușele colectate de la câini simptomatici au fost pozitive pentru *B. canis*.

**Capitolul 6**, intitulat ”**Detectarea co-infecțiilor cu *Borrelia*, *Anaplasma* și *Ehrlichia* la câinii infestați cu babesioză în Nord-Estul României**” este structurat identic cu capitolul anterior, de această dată încercându-se să se identifice posibilele co-infecții cu agenții patogeni bacterieri. Studiul a fost realizat prin analizarea sângelui integral a 66 de câini care au fost confirmați cu babesioză în capitolul anterior, iar căpușele atașate detectate în timpul examinării clinice generale a câinilor, au fost îndepărtate și plasate în tuburi separate cu 70% etanol.

Atât probele de sânge, cât și de căpușe au fost testate pentru posibilele co-infecții cu agenți patogeni bacterieni transportați de căpușe: *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp. și *Ehrlichia* spp.

Probele de sânge analizate (n=66) au fost recoltate de la câini de diferite rase și cu vârsta cuprinsă între 3 luni și 13 ani, din municipiul Iași și zonele limitrofe. **15/66 (22.7%) câini au fost pozitivi pentru *Borrelia burgdorferi* s.l. și 0/66 pentru *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.**, conform rezultatelor obținute în urma testării PCR. Până în prezent, simbiiontul *Candidatus Midichloria mitochondrii* a fost identificat doar în căpușe, aceasta fiind prima raportare de identificare moleculară a bacteriei în sângele câinilor. În studiul prezent, ***Candidatus Midichloria mitochondrii* a fost identificat la 2/66 (3%) din câinii** incluși, pozitivi și cu *Borrelia burgdorferi* s.l. ADN-ul *Candidatus Midichloria mitochondrii* a fost amplificat de primerii utilizați pentru amplificarea speciilor *Anaplasma/Ehrlichia*, fiind identificat după secvențiere.

Un total de 99 de căpușe ixodide adulte au fost colectate de la câini în timpul examinărilor clinice. Căpușele au fost identificate ca specii după cum urmează: *Ixodes ricinus* – 48.5% (48/99 – 32 femele și 16 masculi) și *Dermacentor reticulatus* – 51.5% (51/99 – 34 femele și 17 masculi). Specia patogenă cel mai frecvent detectată la căpușe a fost *Candidatus Midichloria mitochondrii* (25.8%) fără semnificație clinică, urmată de *Borrelia burgdorferi* s.l. (12.9%) și co-infecția cu *Borrelia burgdorferi* s.l. și *Candidatus Midichloria mitochondrii* (6.5%).

Chiar dacă nu au fost detectate speciile *Anaplasma* și *Ehrlichia* în probele de sânge și de căpușe analizate, considerăm că patogenitatea acestora este exprimată datorită semnalării și de alți autori (Matei și colab., 2017b; Hamel și colab., 2012; Morar și colab., 2015).

**Capitolul 7**, intitulat ”**Corelații privind semnele clinice, metodele de diagnostic și tratamentul în infestația cu *Babesia canis***” prezintă materialele și metodele utilizate pentru realizarea acestui studiu ce au constat în recoltarea a câte două probe de sânge periferic (EDTA și fără anticoagulant) de la fiecare pacient suspect de babesioză, pentru următoarele

investigații: examenul microscopic al frotiului de sânge, examen hematologic, examen biochimic sangvin și două teste serologice: SNAP 4DX Plus (IDEXX), respectiv test de anticorpi *Babesia gibsoni* (WellTest).

Rezultatele acestui studiu au arătat că **cei mai afectați câini dintre cei analizați au fost de cei din rasă comună sau mixtă – 40.48%** (17/42), urmați de pechinezii – 11.9% (5/42) iar rasele Husky, Ciobănesc German și Ciobănesc Caucazian – 7.14% (3/42). În ceea ce privește genul câinilor, **numărul infestărilor la masculi a fost mai mare (66.66%), comparativ cu infestările la femele (33.34%)**. Conform datelor obținute din anamneza, am constatat că **76.19% (32/42) dintre câinii participanți la studiu nu au fost deparazitați extern** conform recomandărilor medicilor veterinari. **Cele mai frecvente semne clinice găsite la cei 42 de câini studiați au fost: febră – 37/42 (88.1%), mucoase palide – 31/42 (73.8%) și hemoglobinurie – 31/42 (73.8%),** urmate de deshidratare (11/90%) și icter (4.76%).

Pentru toate probele de sânge recoltate au fost efectuate 3-5 frotiuri și au fost examinate cel puțin 50 de câmpuri microscopice, utilizând obiectivul x1000. **Toate probele de sânge au fost pozitive pentru *Babesia canis***. Modificările hematologice constatate – **anemie moderată până la severă** (scăderea numărului de eritrocite, a hematocritului și a hemoglobinei) și **trombocitopenie** – 40/42 pacienți canini, precum și **modificări ale parametrilor renali și hepatici**, rezultate în urma examenului biochimic al sângelui.

De asemenea, am identificat **anticorpi *Babesia gibsoni* în 2/42 de probe de sânge pozitive la babesioza canină**, care au arătat o formă moderată de infestare cu *Babesia canis* și au răspuns la tratamentul cu Imidocarb dipropionat.

**Capitolul 8**, intitulat **”Prevalența infestației cu căpușe la câini”** are ca scop determinarea preponderenței infestațiilor cu căpușe a pacienților canini incluși în studiu și identificarea posibilelor modificări a perioadelor de activitate a speciilor identificate.

Rezultatele acestui studiu au arătat că majoritatea căpușele colectate de pe câini au fost adulte (99.54%), cu statusul de hrănire diferit, identificând morfologic trei specii de căpușe: *Dermacentor reticulatus* (57.7%; 251/435), *Ixodes ricinus* (41.6%; 181/435), și *Rhipicephalus sanguineus complex* (0.69%; 3/435).

Specia *Dermacentor reticulatus* a fost dominantă, cu două vârfuri ale activității **primăvara**, în lunile martie (52 exemplare: 21 masculi; 31 femele), aprilie (138 exemplare: 53 masculi; 85 femele) și **toamna** – septembrie (19 exemplare: 10 masculi; 9 femele), octombrie (9 exemplare: 6 masculi; 3 femele). De asemenea, am **constatat 2 exemplare *D. reticulatus* masculi, în luna ianuarie**, în afara perioadei normale de activitate.

A doua specie identificată *Ixodes ricinus*, **prezintă trei vârfuri de activitate, cu un trend descendent în lunile mai reci**, având cea mai intensă perioadă de activitate în lunile de **primăvară** (martie, aprilie), urmată de o scădere în luna mai. Al doilea vârf este constatat **vara**, în luna iunie, iar cel de-al treilea **toamna**, în lunile septembrie și octombrie.

**Prevalența speciei *Rhipicephalus sanguineus complex* este redusă**, de doar **0.69%** din totalul căpușelor colectate de pe câini, fiind activă în lunile aprilie și mai.

De asemenea, la examenul clinic al pacienților, am constatat faptul că cei mai mulți pacienți canini – **41.2% erau infestați cu o singură căpușă**, la 23.3% am observat două căpușe, iar 20.6% trei căpușe. De asemenea, **la pacienții canini de pe care am colectat mai mult de două căpușe (58.7%)**, am întâlnit: fie **ambele specii (*Ixodes ricinus* + *Dermacentor reticulatus*)** la **20.7%** (23/111) câini, fie **doar o specie**, astfel: *Ixodes ricinus* – 32/111 (**28.8%**) și *Dermacentor reticulatus* – 56/111 (**50.5%**).

Efectele parazitismului cu căpușe asupra animalelor de companie și ale proprietarilor acestora pot fi limitate prin aplicarea periodică a diferitelor metode de protecție, recomandate de medicina veterinară.

Ultimul capitol, **capitolul 9 – ”Concluzii finale”** însumează concluziile cercetării noastre, creând o viziune de ansamblu asupra rezultatelor tezei de doctorat. Rezultatele acestui studiu oferă date noi cu privire la identificarea unei noi specii de patogen la câini, precum și detectarea unui simbiot puțin studiat, în această regiune.