

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIEȚII
"ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI PARAZITARE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. dr. Liviu MIRON**

**Doctorand,
Gabriela-Victoria MARTINESCU**

2022

IASI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
"ION IONESCU DE LA BRAD"
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALISATION: PARASITIC DISEASES

PHD THESIS

PhD coordinator,
Prof. Liviu MIRON, PhD

PhD student,
Gabriela-Victoria MARTINESCU

2022

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIEȚII
"ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI PARAZITARE**

**CERCETĂRI PRIVIND BIOECOLOGIA
CĂPUȘELOR IXODIDE ÎN ZONA DE EST A
ROMÂNIEI ȘI EPIDEMIOLOGIA BOLILOR
TRANSMISE DE ACESTEA**

**Conducător de doctorat,
Prof. dr. Liviu MIRON**

**Doctorand,
Gabriela-Victoria MARTINESCU**

2022

IASI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
"ION IONESCU DE LA BRAD"
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALISATION: PARASITIC DISEASES

**RESEARCH REGARDING THE
BIOECOLOGY OF THE IXODIDE TICKS IN
EASTERN ROMANIA AND THE
EPIDEMIOLOGY OF THE TRANSMITTED
DISEASES**

**PhD coordinator,
Prof. Liviu MIRON, PhD**

**PhD student,
Gabriela-Victoria MARTINESCU**

CUPRINS

MULȚUMIRI	vii
INTRODUCERE	ix
REZUMAT	xiii

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1: IMPORTANȚA CĂPUȘELOR IMPLICATE ÎN TRANSMITEREA BOLILOR VECTORIALE 1

1.1. Ecologia căpușelor ixodide	1
1.1.1. Climatul și activitatea sezonieră	1
1.1.2. Încălzirea globală și dinamica populațiilor de căpușe ixodide	2
1.2. Principalele specii de căpușe semnalate în România și importanța acestora asupra animalelor de companie și a sănătății umane	3
1.3. Principalele specii de căpușe semnalate în Europa – importanța acestora asupra animalelor de companie și a sănătății umane	4

CAPITOLUL 2: BOLILE VECTORIALE TRANSMISE DE CĂPUȘE LA CÂINI..... 6

2.1. Babesioza	6
2.1.1. Etiologie.....	6
2.1.2. Patogeneză și simptomatologie.....	7
2.1.3. Metode de diagnostic	8
2.1.4. Tratament	10
2.2. Hepatozoonoză.....	12
2.2.1. Etiologie.....	12
2.2.2. Patogeneză și simptomatologie.....	12
2.2.3. Metode de diagnostic	13
2.2.4. Tratament	14
2.3. Anaplasmoza și erlichioza	14
2.3.1. Etiologie.....	14
2.3.2. Patogeneză și simptomatologie.....	14

2.3.3.	Metode de diagnostic	15
2.3.4.	Tratament	16
2.4.	Borelioza	17
2.4.1.	Etiologie	17
2.4.2.	Patogeneză și simptomatologie	18
2.4.3.	Metode de diagnostic	19
2.4.4.	Tratament	20
 CAPITOLUL 3: IMPLICAȚIILE CLINICE LA CÂINII CU BABESIOZĂ ȘI CO-INFECTAȚI CU ALTE BOLI TRANSMISE DE CĂPUȘE		22
 PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII PERSONALE		
 CAPITOLUL 4: LOCUL DESFĂȘURĂRII EXPERIMENTELOR, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR		27
 CAPITOLUL 5: IDENTIFICAREA MOLECULARĂ A SPECIILOR <i>BABESIA</i> ȘI CO-INFECȚIA CU <i>HEPATOZOON CANIS</i> LA CÂINI ȘI CĂPUȘE ÎN ESTUL ROMÂNIEI		28
5.1.	Introducere	28
5.2.	Materiale și metodă	29
5.3.	Rezultate și discuții	32
5.4.	Concluzii parțiale	38
 CAPITOLUL 6: DETECTAREA CO-INFECȚIILOR CU <i>BORRELIA</i>, <i>ANAPLASMA</i> ȘI <i>EHRlichia</i> LA CÂINII INFESTAȚI CU BABESIOZĂ ÎN NORD-ESTUL ROMÂNIEI		39
6.1.	Introducere	39
6.2.	Materiale și metodă	40
6.3.	Rezultate și discuții	41
6.4.	Concluzii parțiale	47

CAPITOLUL 7: CORELAȚII PRIVIND SEMNELE CLINICE, METODELE DE DIAGNOSTIC ȘI TRATAMENTUL ÎN INFESTAȚIA CU *BABESIA CANIS*

.....	49
7.1. Introducere	49
7.2. Materiale și metodă.....	49
7.3. Rezultate și discuții	51
7.4. Concluzii parțiale	62

CAPITOLUL 8: PREVALENȚA INFESTAȚIEI CU CĂPUȘE LA CÂINI..... 64

8.1. Introducere	64
8.2. Materiale și metodă.....	65
8.3. Rezultate și discuții	66
8.4. Concluzii parțiale	73

CAPITOLUL 9: CONCLUZII FINALE 75

BIBLIOGRAFIE.....	77
ANEXA 1 – LISTA ABREVIERILOR.....	101
ANEXA 2 – LISTA FIGURILOR.....	103
ANEXA 3 – LISTA TABELELOR.....	104
ANEXA 4 – LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE.....	105

CONTENTS

ACKNOWLEDGEMENTS	viii
INTRODUCTION	xi
ABSTRACT	xix

PART I – CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CHAPTER 1: THE IMPORTANCE OF TICKS INVOLVED IN THE TRANSMISSION OF VECTOR-BORNE DISEASES 1

1.1. Ecology of ixodid ticks.....	1
1.1.1. Climate and seasonal activity.....	1
1.1.2. Global warming and dynamics of ixodid tick populations	2
1.2. The main species of ticks reported in Romania and their importance on pets and human health.....	3
1.3. The main species of ticks reported in Europe and their importance on pets and human health.....	4

CHAPTER 2: CANINE TICK-BORNE DISEASES..... 6

2.1. Babesiosis.....	6
2.1.1. Etiology.....	6
2.1.2. Pathogenesis and symptomatology	7
2.1.3. Diagnostic methods.....	8
2.1.4. Treatment	10
2.2. Hepatozoonosis	12
2.2.1. Etiology.....	12
2.2.2. Patogenesis and symptomatology	12
2.2.3. Diagnostic methods.....	13
2.2.4. Treatment	14
2.3. Anaplasmosis and ehrlichiosis	14
2.3.1. Etiology.....	14

2.3.2.	Patogenesis and symptomatology	14
2.3.3.	Diagnostic methods	15
2.3.4.	Treatment	16
2.4.	Borreliosis	17
2.4.1.	Etiology	17
2.4.2.	Patogenesis and symptomatology	18
2.4.3.	Diagnostic methods	19
2.4.4.	Treatment	20

CHAPTER 3: CLINICAL IMPLICATIONS IN DOGS WITH BABESIOSIS AND CO-INFECTED WITH OTHER DISEASES TRANSMITTED BY TICKS

22

PART II – PERSONAL CONTRIBUTIONS

CHAPTER 4: PLACE OF EXPERIMENTS, AIM AND OBJECTIVES OF THE RESEARCH

27

CHAPTER 5: MOLECULAR IDENTIFICATION OF *BABESIA* SPECIES AND CO-INFECTION WITH *HEPATOZOON CANIS* IN DOGS AND TICKS IN EASTERN ROMANIA

28

5.1.	Introduction	28
5.2.	Materials and method	29
5.3.	Results and discussions	32
5.4.	Partial conclusions	38

CHAPTER 6: DETECTION OF THE CO-INFECTIONS WITH *BORRELIA*, *ANAPLASMA* AND *EHRlichia* SPECIES IN DOGS WITH BABESIOSIS IN NORTH-EASTERN ROMANIA

39

6.1.	Introduction	39
6.2.	Materials and method	40
6.3.	Results and discussions	41
6.4.	Partial conclusions	47

CHAPTER 7: CORRELATIONS REGARDING CLINICAL SIGNS, DIAGNOSIS AND TREATMENT IN CANINE BABESIOSIS.....	49
7.1. Introduction	49
7.2. Materials and method	49
7.3. Results and discussions	51
7.4. Partial conclusions.....	62
 CHAPTER 8: PREVALENCE OF TICK INFESTATION IN DOGS	 64
8.1. Introduction	64
8.2. Materials and method	65
8.3. Results and discussions	66
8.4. Partial conclusions.....	73
 CHAPTER 9: FINAL CONCLUSIONS	 75
 REFERENCES.....	 77
ANNEX 1 – ABBREVIATION LIST	101
ANNEX 2 - FIGURES LIST	103
ANNEX 3 – TABLES LIST	104
ANNEX 4 – LIST OF PUBLISHED PAPERS	105

MULȚUMIRI

Doresc să adresez sincere mulțumiri **D-lui prof. dr. Liviu Dan MIRON**, conducătorul științific, pentru sprijinul și îndrumarea oferită pe întreaga durată a studiilor doctorale și în realizarea acestei teze de doctorat.

Mulțumesc membrilor Departamentul de Medicină Veterinară și Producție Animală din Napoli, în mod special **D-nei prof. Laura Rinaldi**, **D-lui prof. Giuseppe Cringoli**, **D-nei prof. Maria Paola Maurelli**, pentru călduroasa primire și îndrumare pe parcursul stagiului de practică.

De asemenea doresc să îi mulțumesc **D-rei dr. rezident EVPC Lavinia Ciucă** pentru oportunitatea oferită de a colabora și de a perfecționa tehnicile de biologie moleculară.

Adresez mulțumiri și sunt recunoscătoare pentru îndrumarea și sfaturile primite în decursul celor patru ani, din partea membrilor comisiei de îndrumare: **D-lui prof. dr. Mihai Mareș**, **D-nei conf. dr. Olimpia Iacob** și **D-lui șef lucr. dr. Dumitru Acatrinei**.

Sincere mulțumiri doresc să adresez și distinșilor membrii ai comisiei de doctorat pentru efortul depus în analizarea și evaluarea tezei de doctorat.

Mulțumesc întregului colectiv al disciplinei de Boli Parazitare, în mod special **D-nei șef lucr. dr. Larisa Ivănescu**, dar și colegilor doctoranzi care m-au ajutat în gestionarea cazurilor recepționate: **Dr. Raluca Mîndru**, **Dr. Constantin Roman**, **Dr. Andrei Lupu**, **Dr. Raluca Ștefănescu**.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc familiei și prietenilor pentru suportul moral, financiar și susținerea continuă pe parcursul acestor ani de studii.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks to **Prof. dr. Liviu Dan Miron**, my PhD coordinator, for the support and guidance offered throughout the doctoral studies and in the making of this PhD thesis.

I thank the members of the Department of Veterinary Medicine and Animal Production of Naples, especially **Prof. Laura Rinaldi**, **Prof. Giuseppe Cringoli**, **prof. Maria Paola Maurelli**, for the warm welcome and guidance during the internship.

I would also like to thank **Dr. EVPC resident dr. Lavinia Ciucă** for the opportunity to collaborate and improve the techniques of molecular biology.

I thank and am grateful for the guidance and advice received during the four years, from the members of the guidance committee: **Prof. dr. Mihai Mareş**, **Assoc. Prof. dr. Olimpia Iacob** and **Assist. Prof. dr. Dumitru Acatrinei**.

I would also like to express my sincere thanks to the distinguished members of the doctoral committee for their efforts in analyzing and evaluating the doctoral thesis.

Thanks to the entire staff of the Parasitic Diseases discipline, especially to the **Assist. Prof. dr. Larisa Ivănescu**, but also to my fellow PhD students who helped me in managing the cases received: **Dr. Raluca Mîndru**, **Dr. Constantin Roman**, **Dr. Andrei Lupu**, **Dr. Raluca Ștefănescu**.

Last but not least, I would like to thank my family and friends for their moral and financial support and continuous encouragement during these years of study.

INTRODUCERE

Căpușele sunt considerate cele mai frecvente artropode cu rol vectorial, pot disemina o multitudine de agenți patogeni (virali, bacterieni sau parazitari) cu implicații grave la adresa sănătății umane și animalelor domestice și sălbatice.

Temperatura globală este în continuă creștere, având drept consecință creșterea prevalenței și a distribuției geografice a populațiilor de căpușe, precum și epidemiologia bolilor transmise de acestea.

În Europa, căpușele ce aparțin genurilor *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* și *Hyalomma* infestază frecvent animalele de companie (Buczek și colab., 2021), în România fiind cunoscute 26 specii de căpușe ixodide (Andersson și colab., 2018a).

Viața animalelor infestate cu agenți patogeni transmiși de căpușe poate fi pusă în pericol dacă diagnosticul corect nu este pus la timp. Prin urmare, este important ca aceste boli să fie menținute pe lista diagnosticelor diferențiale, în special dacă animalele examinate vin din zone endemice și prezintă semne clinice compatibile.

Bolile transmise de căpușe, cum ar fi babesioza (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni*), anaplasmoza (*Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*), erlichioza (*Ehrlichia canis*), borelioza (*B. burgdorferi*) și hepatozoonoza (*Hepatozon canis*) provoacă la nivel global boli semnificative la câini (Hii și colab., 2015). Co-infecțiile sunt frecvent observate la câinii ce trăiesc în zonele unde evoluează boli vectoriale, în special dacă densitatea vectorilor este mare.

Babesioza canină produsă de specia *Babesia canis* a fost des raportată în România, la bază stând numeroasele studii serologice și moleculare realizate.

Semnele clinice întâlnite sunt variate, iar evoluția bolii de ce mai multe ori este sub-clinică sau cronică, excepție făcând babesioza canină necomplicată, care se manifestă acut prin anemie moderată, trombocitopenie, hemoglobinurie, febră, letargie, hepatomegalie și splenomegalie (Day, 2016). Forma complicată a babesiozei este mult mai agresivă, afectând mai multe organe, prognosticul fiind rezervat în astfel de cazuri, în special dacă tratamentul nu este instituit rapid.

Diagnosticul acestor boli se realizează prin coroborarea semnelor clinice și a examenelor paraclinice (examene citologice, hematologice, biochimice și imagistice, teste serologice, culturi celulare și teste de moleculare).

Tratamentul bolilor transmise de căpușe este divers, acesta fiind adaptat în funcție de agentul patogen implicat, precum și de patologiiile asociate ale pacienților, care de cele mai multe ori se agreavează secundar. Astfel, istoricul medical al fiecărui pacient prezentat și anamneza detaliată sunt foarte importante.

Prevenția infestărilor cu ectoparaziți a animalelor de companie rămâne cea mai importantă armă a medicilor veterinari în lupta cu aceste boli.

Un aspect interesant îl reprezintă simbioza microbiomului căpușelor, care sunt tot mai des detectați și studiați.

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.

Scopul acestei lucrări de doctorat a fost 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**.

INTRODUCTION

Ticks are considered to be the most common vector arthropods, they can disseminate a multitude of pathogens (viral, bacterial or parasitic) with serious implications for human, domestic and wild animals health.

Global temperature is constantly increasing, resulting in an increase in the prevalence and geographic distribution of tick populations, as well as the epidemiology of diseases transmitted by them.

In Europe, ticks belonging to the genera *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* and *Hyalomma* frequently infest pets (Buczek et al., 2021) and in Romania 26 species of ixodid ticks are known (Andersson et al., 2018a).

The lives of animals infected with pathogens transmitted by ticks can be endangered if the correct diagnosis is not made in time. It is therefore important for these diseases to be maintained on the list of differential diagnoses, especially if the examined animals come from endemic areas and present compatible clinical signs.

Tick-borne diseases such as babesiosis (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni*), anaplasmosis (*Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*), ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*), borreliosis (*B. burgdorferi*) and hepatozoonosis (*Hepatozoon canis*) provides globally significant diseases in dogs (Hii et al., 2015). Co-infections are commonly seen in dogs living in areas where vector diseases develop, especially if the vector density is high.

Canine babesiosis produced by *Babesia canis* was often reported in Romania, based on numerous serological and molecular studies.

Clinical signs are varied, and the evolution of the disease is more often sub-clinical or chronic, with the exception of uncomplicated canine babesiosis, which manifests acute, through moderate anemia, thrombocytopenia, hemoglobinuria, fever, lethargy, hepatomegaly and splenomegaly (Day, 2016). The complicated form of babesiosis is more aggressive, affecting several organs, the prognosis being reserved in such cases, especially if treatment is not rapidly established.

The diagnosis of these diseases is made by corroborating the clinical signs and paraclinical exams (cytological, haematological, biochemical and imaging exams, serological tests, cell cultures and molecular assays).

The treatment of tick-borne diseases is diverse, being adapted to the pathogen involved, as well as the associated pathologies of patients, which often worsen secondarily. Thus, the medical history of each patient presented and detailed anamnesis is very important.

The prevention of ectoparasites infestations of pets remains the most important weapon of veterinarians in the fight against these diseases.

An interesting aspect is the symbionts of the tick microbiom, which are increasingly detected and studied.

Little molecular studies of tick-borne pathogens in dogs and possible co-infections have led to this thesis, which brings new elements to the veterinary community and public health.

The **aim** of this PhD thesis was to identify existing pathogens and possible co-infections in dogs and ticks collected from them in the eastern Romania.

The **first objective** of the thesis consisted in the morphological and molecular identification of the main parasitic and bacterial pathogens found in the blood of dogs infested with ticks, presented at the Parasitic Diseases Clinic with specific symptoms for infestation with *Babesia* spp.

The **second objective** was to collect and morphologically identify the ticks attached to the dogs' bodies, as well as the molecular identification of the main parasitic and bacterial pathogens, in order to evaluate the microbial load and possible co-infections to which dogs were exposed.

The **third objective** was to detect co-infections found in dogs in Eastern Romania.

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-infecții 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 principalelor boli parazitare și bacteriene transmise de căpușe: babesioza, hepatozoonoza, anaplasmoza, erlichioza și borelioza. Acest capitol prezintă date generale preluate din literatură privind etiologia, patogenitatea, simptomatologia, metode de diagnostic și tratamentul utilizat.

Cel de-al treilea capitol, **”Implicațiile clinice la câinii cu babesioză și co-infecții cu alte boli transmise de căpușe”** descrie succint date identificate în literatură cu privire la

multitunea 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 constatat 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 simbiiontului *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 pechinez – 11.9% (5/42) iar rasele Husky, Ciobănesc German și Ciobănesc Caucazian – 7.14% (3/42). În ceea ce privește genul câinilor, **numărul infestațiilor la masculi a fost mai mare (66.66%), comparativ cu infestațiile 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 medicii veterinari.

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.

ABSTRACT

Most of the ticks that infest companion animals are species that feed on three different vertebrate hosts, making them such important vectors in the transmission of diseases.

The growing interest of researchers in studying vectors and vector-borne diseases is due to several factors, mainly climate change, urbanization, but also some socio-economic factors.

Vector-borne diseases are considered real challenges for veterinarians, as the clinical signs may be diffuse or overlapping with other pathologies. Also, co-infestation with ticks but also co-transmission of pathogens are relevant for both public and animal health.

The PhD thesis entitled "**Research regarding the bioecology of the ixodid ticks in Eastern Romania and the epidemiology of transmitted diseases**" is structured accordingly to the general rules, in two main parts: a first part entitled "**Current state of knowledge**", which contains a number of 25 pages and a second part, "**Personal contributions**" detailing the results obtained during the studies, with a number of 51 pages. In addition to these two parts, the thesis contains a table of contents, acknowledgements, introduction, abstract, bibliography, list of abbreviations, list of figures and a list of tables. This paper contains 13 figures and 20 tables and 317 bibliographic sources have been consulted.

The first part, "**Current state of knowledge**", is structured in three chapters and presents information on the importance of ticks involved in the transmission of pathogens, the main tick-borne diseases and the clinical implications in dogs with babesiosis and co-infected with other tick-borne diseases.

The first chapter, entitled "**The importance of ticks involved in the transmission of vector-borne diseases**" is divided into three subchapters and begins by describing some aspects of the ecology of ixodid ticks, represented by the appropriate climate and their seasonal activity, the role of global warming and the dynamics of ixodid tick populations. It also provides information on the main species of ticks reported in Romania and Europe, as well as their importance in pets and in human health.

The second chapter, "**Canine tick-borne diseases**" consists of four subchapters focusing on the description of the main parasitic and bacterial diseases transmitted by ticks: babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis, erlichiosis and borreliosis. This chapter presents general data taken from the literature regarding the etiology, pathogenesis, symptomatology, diagnostic methods and treatment used.

The third chapter, "**Clinical implications in dogs with babesiosis and co-infected with other diseases transmitted by ticks**" briefly describes data identified in the literature regarding the multitude of pathogens that can co-infest animals, these data being relevant also

for public health. Co-infections can also change the associated clinical manifestations making it difficult to diagnose and they can change the prognosis of patients.

The second part of the thesis, "**Personal contributions**" consists of five chapters, each chapter presenting in detail the results obtained.

Chapter 4 presents the place of the experiments, aim and objectives of the research. The **aim** of this PhD thesis was to identify existing pathogens and possible co-infections in dogs and ticks collected from them in the eastern Romania.

The first objective of the thesis consisted in **the morphological and molecular identification of the main parasitic and bacterial pathogens found in the blood of dogs infested with ticks**, presented at the Parasitic Diseases Clinic with specific symptoms to infestation with *Babesia* spp.

The second objective was **to collect and morphologically identify the ticks attached to the dogs' bodies, as well as the molecular identification of the main parasitic and bacterial pathogens** in order to evaluate the microbial load and possible co-infections to which dogs were exposed.

The third objective was to **detect co-infections found in dogs in Eastern Romania**.

Little molecular studies of tick-borne pathogens in dogs and possible co-infections have led to this thesis, which brings new elements to the veterinary community and public health.

The originality of this PhD thesis consists in:

- ④ the first identification of *B. rossi* in two symptomatic dogs in Romania, for which we consider that additional studies are needed to confirm the presence of this pathogen and its vector in Europe and in Romania.
- ④ the first report of the symbiote *Candidatus Midichloria mitochondria* in the blood of dogs and ticks collected from them, requiring further investigation to better understand the role and possible implications for animals and public health.

Chapter 5 of the thesis, entitled "**Molecular identification of *Babesia* species and co-infection with *Hepatozoon canis* in dogs and ticks in eastern Romania**" begins with an introduction, description of materials and methods used to conduct the study. This study included 90 dogs which were presented to the Clinics with signs compatible with canine babesiosis (hyperthermia, hemolytic anemia, thrombocytopenia, jaundice and hemoglobinuria) (Irwin, 2009), whole blood samples (EDTA) were collected from them in order to be able to analyze microscopically the thin blood smears, stained by the Romanowsky (Diff-Quick) method. The remaining blood samples were stored at -20°C until DNA was extracted for molecular detection of *Babesia* spp. and *H. canis*.

Each dog was submitted to a clinical examination, and all detectable ticks were collected for species identification by standard taxonomic keys (Estrada-Pena et al., 2004; Dantes-Torres et al., 2013). Collected ticks were stored in 70% ethanol and separated by

individual animal for morphological detection. **All identified ticks (No.=182) were divided into No. = 100 sub-samples** (nine composed by pools of three ticks, 64 by pools of two ticks, and 27 sub-samples individually analysed) comprised of specimens collected from the same dog, and homogeneous species that were screened for *Babesia* species and *H. canis* using molecular analyses.

Thirty-five dogs (38.9%; 95% CI = 29.0–49.8) showed mild clinical signs and 55 (61.1%; 95% CI = 50.2–71.0) expressed the acute form, attributable to babesiosis. All 90 of the sampled dogs that tested positive for the babesial parasites using a stained thin blood smear were positive for the general piroplasmid PCR. Three *Babesia* species were found in dogs: ***B. canis*** (85/90 = 94.4%; 95% CI = 86.9–97.9) (99.1–100% identity with GenBank Accession numbers: MK571831), ***B. vogeli*** (3/90 = 3.3%; 95% CI = 0.9–10.1) (100% identity with GenBank Accession number: KY290979), and ***B. rossi*** (2/90 = 2.2%; 95% CI = 0.4–8.6) (100% identity with GenBank Accession Number: MT740273). All the dogs resulted **negative for *H. canis***.

Additionally, the dogs that expressed acute clinical signs were positive for *B. canis* with the prevalence of 58.9% (95% CI = 48.0–69.0) and *B. rossi* with the prevalence of 2.2% (95% CI = 0.4–8.6). The dogs that showed mild clinical signs were positive for *B. canis* with the prevalence of 35.6% (95% CI = 25.9–46.4) and *B. vogeli* with the prevalence of 3.3% (95% CI = 0.9–10.1).

Moreover, five dogs have died (5.6%, four infected with *B. canis* and one with *B. rossi*) and for three of them the follow-up remains unknown. Overall, 91.1% of the dogs have recovered.

Dogs that presented with ticks during the routine visit were 33.6% of the total (38/113; 95% CI = 25.1–43.2). Briefly, 71.1% (27/38; 95% CI = 53.9–84.0) of dogs showed low infestation, 21.1% (8/38; 95% CI = 10.1–37.8) showed moderate infestation and 7.9% (3/38; 95% CI = 2.1–22.5) showed high infestation. **A total of 182 ticks were collected from dogs**; of these, 58 ticks were found on 15/90 (16.7%; 95% CI = 9.9–26.3) symptomatic dogs and 124 ticks on another 23 dogs previously analysed for piroplasmosis (as above described). Specifically, 179 adults (113 engorged females and 66 males), 2 nymphs, and 1 larva were found.

One hundred tick sub-samples were prepared and identified as follows: ***Ixodes ricinus*** (64%; 95% CI = 53.7–73.2), ***Dermacentor reticulatus*** (33%; 95% CI = 24.1–43.2), and the ***Rhipicephalus sanguineus* group** (3%; 95% CI = 0.8–9.1). ***Babesia canis*** (MIR = 81%; 95% CI = 71.7–87.9) (99.8–100% identity with GenBank Accession numbers: MK571831, accessed on 1 March 2021), ***B. vogeli*** (MIR = 3%; 95% CI = 0.78–9.6) (100% identity with GenBank Accession number: KY290979, accessed on 1 March 2021) and ***B. microti-like piroplasm*** (MIR = 1%; 95% CI = 0.1–6.2) (100% identity with GenBank Accession number: MN355504,) **was found in ticks**. In addition, **15 ticks were positive for *H. canis*** (MIR = 15%; 95% CI = 8.9–23.9), **six were co-infected with *B. canis***, and **one with *B. microti-like piroplasm***.

We herein report the first comprehensive molecular survey of *Babesia* spp. and *H. canis* in owned dogs and in their ticks from the eastern part of Romania. Over 90% of dogs and over 80% of ticks collected from symptomatic dogs were positive for *B. canis*.

Chapter 6, entitled "**Detection of the co-infections with *Borrelia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in dogs with babesiosis in north-eastern Romania**" is structured identically to the previous chapter, this time trying to identify possible co-infections with bacterial pathogens. The study was performed by analyzing the whole blood of 66 dogs that were confirmed with babesiosis in the previous chapter, while the attached ticks detected during the general clinical examination of the dogs, were removed and placed in separate tubes with 70% ethanol.

Both blood and tick samples were tested for possible co-infections with bacterial pathogens carried by ticks: *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp.

The analyzed blood samples (n = 66) were collected from dogs of different breeds and aged between 3 months and 13 years, from Iași and the surrounding areas. **15/66 (22.7%) dogs were positive for *Borrelia burgdorferi* s.l., 0/66 for *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.** according to the results obtained from the PCR test. To date, the symbiote *Candidatus Midichloria mitochondria* has been identified only in ticks, this being the first report of molecular identification of the bacterium in the blood of dogs. In the present study, ***Candidatus Midichloria mitochondria* was identified in 2/66 (3%) of dogs** included, positive also with *Borrelia burgdorferi* s.l. *Candidatus Midichloria mitochondria* DNA was amplified by primers used to amplify *Anaplasma*/*Ehrlichia* species, and was identified after sequencing.

A total of 99 adult ixodid ticks were collected from dogs during the clinical examination. The ticks were identified as *Ixodes ricinus* - 48.5% (48/99 - 32 females and 16 males) and *Dermacentor reticulatus* - 51.5% (51/99 - 34 females and 17 males). The most commonly detected pathogenic species in ticks was *Candidatus Midichloria mitochondrii* (25.8%) without clinical significance, followed by *Borrelia burgdorferi* s.l. (12.9%) and **co-infection with *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Candidatus Midichloria mitochondria* (6.5%)**.

Even if the *Anaplasma* and *Ehrlichia* species were not detected in the analyzed blood and tick samples, we consider that their pathogenicity is expressed due to the report by other authors (Matei et al., 2017b; Hamel et al., 2012; Morar et al., 2015).

Chapter 7, entitled "**Correlation regarding clinical signs, diagnosis and treatment in canine babesiosis**" presents the materials and methods used to perform this study, which consisted of collecting two samples of peripheral blood (EDTA and without anticoagulant) from each patient suspected of babesiosis, for the following investigations: microscopic examination of the blood smear, hematology examination, blood biochemistry examination and two serological tests: SNAP 4DX Plus (IDEXX), respectively *Babesia gibsoni* antibody test (WellTest).

The results of this study showed that **the most affected dogs among those analyzed were those of common or mixed breed - 40.48% (17/42)**, followed by Pekingese - 11.9%

(5/42) and Husky, German Shepherd and Shepherd Caucasian - 7.14% (3/42). Regarding the gender of dogs, **the number of infestations in males was higher (66.66%), compared to infestations in females (33.34%)**. According to the data obtained from the anamnesis, we found that **76.19% (32/42) of the study participating dogs had not acaricidal treatment**, according to the veterinarians recommendations. **The most common clinical signs** found in the 42 dogs studied were: **fever - 37/42 (88.1%), pale mucous membranes - 31/42 (73.8%) and hemoglobinuria - 31/42 (73.8%)**, followed by dehydration 11/90%) and jaundice (4.76%).

For all blood samples collected, 3-5 smears were performed and at least 50 microscopic fields were examined using the x1000 objective. **All blood samples were positive for *Babesia canis***. Hematological changes found - **moderate to severe anemia** (decreased erythrocyte count, hematocrit and hemoglobin) and **thrombocytopenia** - 40/42 canine patients, as well as **changes in renal and hepatic parameters**, resulting from biochemistry tests of the blood.

We also identified ***Babesia gibsoni* antibodies in 2/42 blood samples** positive for canine babesiosis, which showed a moderate form of infestation with *Babesia canis* and responded to treatment with Imidocarb dipropionate.

Chapter 8, entitled “**Prevalence of tick infestation in dogs**” aims to establish the preponderance of tick infestations in the canine patients included in the study and investigate possible changes in the activity periods of the species identified.

The results of this study showed that most of the ticks collected from dogs were adults (99.54%), with different feeding status, morphologically identifying three species of ticks: ***Dermacentor reticulatus* (57.7%; 251/435), *Ixodes ricinus* (41.6%; 181/435), and *Rhipicephalus sanguineus* complex (0.69%; 3/435)**.

The species ***Dermacentor reticulatus* was dominant, with two peaks of activity in spring**, in March (52 specimens: 21 males; 31 females), April (138 specimens: 53 males; 85 females) and **autumn** - September (19 specimens: 10 males; 9 females), October (9 specimens: 6 males; 3 females). We also found **2 specimens of *D. reticulatus* male, in January**, outside the normal period of activity.

The second species identified ***Ixodes ricinus*, shows three peaks of activity, with a decreasing trend in the colder months**, having the most intense period of activity in the **spring** months (March, April), followed by a decrease in May. The second peak is found in **summer**, in June, and the third in **autumn**, in September and October.

The prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* complex is low, of only **0.69%** of the total ticks collected from dogs, being active in April and May.

Also, at the clinical examination of the patients, we found that most canine patients - **41.2% were infested with a single tick**, in 23.3% we noticed two ticks, and in 20.6% three ticks. Also, **in the canine patients from which we collected more than two ticks (58.7%)**, we found: **either both species (*Ixodes ricinus* + *Dermacentor reticulatus*) in 20.7%**

(23/111) dogs, or **only one species: *Ixodes ricinus*** - 32/111 (28.8%) and ***Dermacentor reticulatus*** - 56/111 (50.5%).

The effects of tick parasitism on companion animals and their owners can be limited by the regular application of various methods of protection recommended by veterinarians.

The last chapter, Chapter 9 - "**Final Conclusions**" summarizes the conclusions of our research, creating an overview of the results of the PhD thesis. The results of this study provide new data on the identification of a new species of pathogen in dogs, as well as the detection of a little studied symbiont in this region.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

PART I – CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL 1: IMPORTANȚA CĂPUȘELOR IMPLICATE ÎN TRANSMITEREA BOLILOR VECTORIALE

CHAPTER 1: THE IMPORTANCE OF TICKS INVOLVED IN THE TRANSMISSION OF VECTOR-BORNE DISEASES

Căpușele sunt artropode ectoparazite hematofage a vertebratelor ce aparțin ordinului Ixodida, fiind considerate cei mai importanți ectoparaziți la nivel mondial (Estrada-Pena și colab., 2013). În anul 2019 au fost raportate 956 specii de căpușe aparținând acestui ordin, repartizate în patru familii: trei familii existente (*Ixodidae* – 736 specii; *Argasidae* – 218 specii și *Nuttalliellidae* – o specie) și o familie dispărută (*Deinocrotonidae* – o specie) (Dantes-Torres și colab., 2019). Aproximativ 10% dintre speciile identificate sunt foarte importante din punct de vedere medical deoarece prin mecanismul de hrănire pot transmite o varietate de agenți patogeni (protozoare, bacterii, virusuri) (Cabezas-Cruz și colab., 2017).

1.1. Ecologia căpușelor ixodide

La nivel global, clima a suferit modificări și va continua să se schimbe în următorul secol din cauza gazelor cu efect de seră, cum ar fi dioxidul de carbon, metanul și protoxidul de azot din atmosfera Pământului, ceea ce a dus la creșterea temperaturii medii (Rossati, 2017). Datorită ciclului biologic al căpușelor, clima este esențială pentru transmiterea agenților patogeni (Ogden și colab., 2020).

Relieful României este complex și variat, având în componență munți (28%), dealuri și podișuri (42%) precum și câmpii (30%), rezultând astfel variații ale climei, faunei sau florei (Ioniță, 2019) cu un impact semnificativ asupra populațiilor de căpușe existente pe teritoriul țării.

1.1.1. Climatul și activitatea sezonieră

Adulții speciei *Dermacentor reticulatus* posedă o bună toleranță la schimbările de mediu, adaptându-se să supraviețuiască mai mult de o lună în bazinele râurilor, în ape contaminate cu reziduri organice sau în apă curată mai mult de 100 zile (Földvári și colab., 2016). În habitatele umede, *Dermacentor reticulatus* apare adesea simpatric cu *Ixodes ricinus* (Rubel și colab., 2016).

În condiții de laborator, s-a demonstrat că *D. reticulatus* are capacitatea de a tolera temperaturi de până la -10°C timp de 150 zile, fapt ce demonstrează activitatea acestora pe timpul iernii în multe zone în care *Ixodes ricinus* este considerat în aceeași perioadă inactiv (Földvári și colab., 2016).

În studiul realizat de Frederic Beugnet și colaboratorii în anul 2009, parametrii biologici a trei specii de căpușe (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* și *Rhipicephalus sanguineus*) au fost analizați, dezvoltând o matrice a activității acestora în raport cu

temperatura și umiditatea locațiilor din Europa, corectate în baza celor 3 tipuri de biotopuri stabilite: zone urbane și suburbane; zone rurale; zone neexploatate sau împădurite (Beugnet și colab., 2009). Se observă o activitate maximă a căpușelor *Dermacentor reticulatus* în intervalul climatic 15-25°C și umiditatea relativă cuprinsă între intervalele 80-90% și >90%. În cazul speciei *Ixodes ricinus*, umiditatea relativă sub 40% sau temperaturile aproape de îngheț, descresc activitatea sau chiar o inactivează. Se observă o activitate maximă a căpușelor *Ixodes ricinus* în intervalul climatic 10-20°C și umiditatea relativă între 80-90% și >90%. De asemenea, se mai constată și faptul că umiditatea relativă sub 50% iar temperaturile sub 5°C sau peste 30°C, inactivează specia *Ixodes ricinus*.

În același context, alți autori consideră clima este principalul factor restrictiv a distribuției speciei *Ixodes ricinus* la limita nordică a continentului european, cu toate că această specie este surprinzător de rezistentă la temperaturi scăzute: pot supraviețui maxim 24 ore la temperaturi între -14.4°C și -18.9°C iar efectele letale ale frigului apar la expunerea timp de 30 zile la temperaturi de până la -10°C (Gray și colab, 2009), dar mortalitatea crește rapid la temperaturi de aproximativ 30°C, chiar și cu umiditatea relativă mare (> 80%) (Braks și colab., 2016; Beugnet și colab., 2009).

Alte studii au cuantificat date privind faptul că activitatea căpușelor este inhibată de temperaturile scăzute precum și cu deficite mari în saturația de oxigen (Braks și colab., 2016).

Speciile *Ixodes ricinus* și *Ixodes persulcatus* sunt deosebit de sensibile la condițiile de mediu, întrucât în faza prelungită non-parazitară acestea necesită ca umiditatea relativă a microclimatului să fie minim 80% pentru a evita deshidratarea (Gray și colab, 2009).

Temperaturile mai ridicate pot duce la o abundență a căpușelor *Ixodes ricinus*, iar temperaturile scăzute din timpul iernii pot fi deosebit de importante, afectând distribuția acestora (Walker, 2019). De asemenea, clima este mai rece în zonele umbrite, cum ar fi versanții orientați spre Nord (Braks și colab., 2016).

Cu toate că supravegherea și raportarea schimbărilor în distribuția populațiilor de căpușe este în general inadecvată, unele rapoarte bine documentate susțin expansiunea lentă, dar aparent continuă a frontierelor istorice ale unor specii de căpușe în zone în care acestea au fost anterior absente (Estrada-Peña, 2012).

Sub 5°C apare pragul critic de temperatură pentru *Ixodes ricinus*, devenind inactiv. Această temperatură poate fi considerată izotermă ecologică, fapt ce poate explica fenologia acestei specii (Braks și colab., 2016).

1.1.2. Încălzirea globală și dinamica populațiilor de căpușe ixodide

Încălzirea globală accelerată cu care planeta se confruntă, în special datorită influenței antropice, afectează de asemenea ecologia și epidemiologia bolilor transmise de căpușe (Rizzoli și colab., 2014).

Schimbările climatice sunt implicate în modificarea arealului de distribuție pe altitudine și latitudine a căpușelor, fiind considerate un factor deosebit de important și în

extinderea altor vectori în Europa, precum *Aedes albopictus* ce transmite virusul Zika, febra dengue sau specii de flebotomi ce transmit leishmanioza (Semenza și colab., 2018).

În Nordul Europei s-a constatat o creștere a temperaturilor medii cu 1.5-2.5°C, influențând ciclurile biologice ale căpușelor, creșterea sau scăderea activității, schimbări ale densității populațiilor sau în distribuția acestora. Această încălzire favorizează iernarea stadiilor imature și prelungește perioada de activitate a adulților, favorizând astfel răspândirea căpușelor în zone noi, unde predomină condițiile nefavorabile (Karbowski, 2014).

În zonele montane, căpușele pot fi găsite la altitudini mai mari de 1.450 m unde limita de distribuție este determinată în mare parte de temperatură, iar activitatea sezonieră este mai limitată decât în zonele mai joase (Braks și colab., 2016).

Urbanizarea, schimbările climatice și modificarea modelelor de utilizare a terenurilor, împreună cu factorii socio-economici (sporturi practicate în aer liber, grădinărit, creșterea numărului de animale de companie sau a celor de lângă așezările umane) acționează creând condiții favorabile pentru creșterea expunerii oamenilor la căpușe, favorizând astfel transmiterea patogenilor în zonele urbane și peri-urbane (Rizzoli și colab., 2014).

Pe lângă efectele schimbărilor climatice asupra zonelor geografice de distribuție ale căpușelor, unele studii au evaluat modul în care schimbările climatice pot afecta debutul sau durata activității, precum și impactul asupra zoonozelor transmise, cum ar fi boala Lyme. Se constată astfel, că sezonul activității căpușelor începe, în general, mai devreme în cursul anului și este potențial mai lung (Ogden și colab., 2020).

1.2. Principalele specii de căpușe semnalate în România și importanța acestora asupra animalelor de companie și a sănătății umane

Primul studiu exhaustiv (*Fauna of the Popular Republic of Romania. Suprafamily Ixodoidea. Ticks*) privind morfologia, distribuția, ciclurile biologice și gazdele căpușelor ixodide în România a fost publicat în anul 1965 de către Feider Zicman.

În România sunt cunoscute 26 specii de căpușe ixodide, dintre care 12 aparțin genului *Ixodes* (Andersson și colab., 2018a), dar au mai fost raportate și specii aparținând genurilor *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* și *Boophilus* (Mihalca și colab., 2012; Ioniță și colab., 2017).

Conform literaturii de specialitate, *Ixodes ricinus* este considerată cea mai răspândită specie de căpușe din țară (Feider, 1965; Ioniță, 2003; Mihalca și colab., 2012; Pavel și colab., 2014), urmată de specia *Dermacentor marginatus* și *Haemaphysalis punctata* (Ioniță și colab., 2017; Mihalca și colab., 2012).

În Sudul României sau izolat în restul țării s-au identificat specii precum *Dermacentor reticulatus*, *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis* spp., *Boophilus* spp. (Ioniță și colab., 2017). În estul României a fost raportată prezența a trei specii de căpușe în zona urbană și sub-urbană a municipiului Iași: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* și *Haemaphysalis punctata* (Pavel și colab., 2014). Căpușele ixodide sunt considerate vectorii principali în transmiterea babesiozei, însă persistența

patogenilor în natură se realizează prin intermendiul vertebratelor mici-rezervor și a vectorilor-căpușelor (Onyiche și colab., 2021; Kalmar și colab., 2020).

De asemenea, este cunoscută acțiunea spoliatoare și toxică a căpușelor, exercitate asupra gazdelor (Ioniță, 2019). Cea mai importantă parazitoză transmisă de căpușe cu acțiune spoliatoare este considerată babesioza.

Ixodes ricinus este considerată specia care poate transmite cea mai mare varietate de patogeni, datorită multitudinii de gazde vertebrate, inclusiv omul (Răileanu și colab., 2018; Ioniță, 2019).

Pentru sănătatea omului, Boala Lyme (Borelioza) produsă de specia *Borrelia burgdorferi sensu lato* și transmisă de *Ixodes ricinus* este considerată cea mai importantă boală transmisă prin intermediul căpușelor. Într-un studiu publicat în anul 2020 privind agenții patogeni identificați în căpușele *Ixodes ricinus* colectate de la oameni, prevalența speciei *Borrelia* a fost de 14.18%, ADN-ul fiind detectat în toate stadiile de dezvoltare (Kalmar și colab., 2020). De asemenea, în studiul realizat de Ioniță și colab. (2013), au fost identificate în căpușele *D. marginatus* două specii de rickettsii cu o importanță majoră pentru sănătatea publică: *R. slovaca* și *R. raoultii* (Ioniță și colab., 2013).

Babesioza a devenit o preocupare și pentru sănătatea publică în ultimii ani deoarece s-au constatat infestări accidentale cu una dintre speciile: *Babesia microti*, *Babesia divergens* sau *Babesia venatorum* (Onyiche și colab., 2021). Recent, Kalmar și colab., 2020 au identificat două specii de babesia în căpușele colectate de la oameni: *B. microti* – 2.11% și *B. venatorum* – 0.77%.

1.3. Principalele specii de căpușe semnalate în Europa – importanța acestora asupra animalelor de companie și a sănătății umane

În Europa, animalele de companie sunt parazitare de căpușe ce aparțin genurilor *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* și *Ixodes*, în funcție de climă, astfel: în Nordul, Vestul și centrul continentului, animalele de companie sunt adesea parazitare de speciile *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *I. canisuga* sau *Dermacentor reticulatus*; în Nord-Estul Europei a fost identificată *I. persulcatus* iar în sud, *Rhipicephalus sanguineus* și *Rhipicephalus turanicus*. Sporadic au fost raportate speciile *H. concinna*, *D. marginatus* sau *I. acuminatus* iar în zona Mediteraneană, *Hyalomma marginatum*, *H. lusitanicum* și *I. trianguliceps* (Buczek și colab., 2021).

Dermacentor reticulatus este raportată ca fiind a doua cea mai importantă specie din Europa după *Ixodes ricinus* (Chițimia-Dobler, 2015; Rubel și colab., 2016). Este cunoscut faptul că cele două specii dermacentor (*D. reticulatus* și *D. marginatus*) sunt endemice în Europa, însă limitele de distribuție ale celor două specii nu sunt bine cunoscute (Rubel și colab., 2016).

Dermacentor reticulatus este distribuit la scară largă în toate zonele temperate ale Eurasiei. Această distribuție nu este continuă, fiind divizată în două părți: partea estică Europeană, ce cuprinde Polonia (zona estică), Slovacia, Ucraina, Ungaria (zona estică),

România, Belarus, Rusia și Siberia și partea vestică Europeană: Franța și Germania (Dumitrache și colab., 2014; Karbowiak, 2014). Privind expansiunea de la Nord la Sud în Europa, *D. reticulatus* a fost observat între 41°N și 57°N latitudine (Kohn și colab., 2019).

Peste 78% din studiile realizate de cercetătorii europeni, au identificat ADN-ul speciei *Babesia canis* în căpușele *D. reticulatus*, care se găsește frecvent în biotopurile urbane din Europa (Onyiche și colab., 2021), aceștia indicând și o expansiune teritorială a speciei datorită încălzirii globale, creșterii numărului de animale sălbatice sau introducerii unor noi specii de căpușe, consecutiv turismului (Kohn și colab., 2018; Karbowiak, 2014).

Informațiile curente indică faptul că distribuția speciei *Ixodes ricinus* se extinde atât spre Nordul continentului, cât și în zonele montane (Estrada-Peña și colab., 2018). Asemenea ca în multe alte zone ale Europei, gestionarea pădurilor are ca scop creșterea ponderii pădurilor de foioase și mixte, fapt ce creează habitate favorabile căpușelor *Ixodes ricinus*, principalul vector din Europa ce transmite *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Tack și colab., 2012).

S-a constatat prezența populațiilor de căpușe *Ixodes ricinus* în zonele verzi urbane europene care au relevanță pentru sănătatea publică datorită expunerii oamenilor și a animalelor domestice la potențialele căpușe infectate (Rizzoli și colab., 2014).

Bolile transmise de căpușe la câini reprezintă pentru veterinari o provocare substanțială a diagnosticului, deoarece de cele mai multe ori semnele clinice sunt atenuate sau se suprapun altor patologii (Andersson și colab., 2017a).

Majoritatea gazdelor de întreținere a căpușelor sunt clasificate ecologic ca specii generaliste și în multe cazuri acestea servesc ca rezervoare pentru un număr mare de agenți patogeni zoonotici emergenți, inclusiv cele transmise de specia *Ixodes ricinus* (Rizzoli și colab., 2014).

CAPITOLUL 2: BOLILE VECTORIALE TRANSMISE DE CĂPUȘE LA CÂINI

CHAPTER 2: CANINE TICK-BORNE DISEASES

2.1. Babesioza

Babesioza infestază animale sălbatice și domestice, provocând boli care pun viața în pericol, în special animalelor de companie (Colwell și colab., 2008). Babesioza canină este o boală vectorială, prin intermediul căpușelor fiind transmiși paraziții *Babesia* spp. care afectează câinii la nivel global (Ioniță, 2012).

La sfârșitul secolului XIX-lea, medicul român Victor Babeș a identificat în hematiile unor bovine și ovine aceste microorganisme parazite, fiind denumite ulterior *Babesia bovis*, respectiv *Babesia ovis*. Numele de gen (*Babesia*) a fost pus după numele persoanei care a realizat descoperirea (Solano-Gallego și colab., 2016).

Cazurile de babesioză umană au fost raportate sporadic, în Europa (*Babesia divergens*, *Babesia venatorum*, *Babesia microti*) și America de Nord (Gray și colab., 2021).

La nivel global, prevalența *Babesia* spp. la căpușele nehrănite (*questing*) a fost estimată la 2.1% conform unei analize complexe publicată recent (Onyiche, 2021).

2.1.1. Etiologie

Babesia este un protozoar parazit care aparține încregăturii *Apicomplexa*, clasa *Piroplasma*, ordinul *Piroplasmida*, genul *Babesia* ce infestază globulele roșii ale mamiferelor și oamenilor (Baneth și colab., 2020a).

Identificarea morfologică a speciilor de babesii este cea mai utilizată metodă de diagnostic, astfel încât merozoizii mari identificați (3-4μm) sunt atribuiți speciei *Babesia canis*, iar cei de dimensiuni mici (0.5-2.5 μm), speciei *Babesia gibsoni* (Lempereur și colab., 2017; Baneth, 2018). Pentru determinarea speciei, dimensiunea paraziților mai poate fi corelată cu specificitatea gazdei sau a vectorului, precum și cu susceptibilitatea la medicamente (Petra și colab., 2018).

Dintre numeroasele specii care infestază animalele, doar câteva dintre *Babesia* spp. (Tabelul 2.1.) pot provoca probleme grave la câini.

Tabelul 2.1/Table 2.1

Speciile *Babesia* identificate la câini și vectorii acestora
Babesia species identified in dogs and their vectors

Dimensiune	Specie	Vector	Referințe
Mari 3-5 μm	<i>Babesia canis canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Petra și colab., 2018
	<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	
	<i>Babesia canis rossi</i>	<i>Haemaphysalis leachi</i> <i>Haemaphysalis elliptica</i>	
Mici 0.5-2.5 μm	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>Haemaphysalis bispinosa</i> <i>R. sanguineus</i>	Gray și colab., 2018
	<i>Babesia conradae</i>	necunoscut	Day, 2016; Bajer și colab., 2021
	<i>Babesia vulpes</i>	<i>Ixodes hexagonus</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes canisuga</i> <i>Dermacentor reticulatus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Baneth și colab., 2019
	<i>Babesia negevi</i> n. sp.	Necunoscut	
			Baneth și colab., 2020b

2.1.2. Patogeneză și simptomatologie

Severitatea babesiozei canine variază de la anemie ușoară până la disfuncții organice și moarte. Cauza principală a variabilității patogenezei este reprezentată de specia sau subspecia parazitului *Babesia* (Saari și colab., 2018; Day, 2016). De asemenea, cele două mecanisme dominante în patogeneza bolii sunt reprezentate de: i) invazia și liza eritrocitelor; ii) răspunsul imun al gazdei la parazitemie (Petra și colab., 2018).

Afectarea directă a hematiilor indusă de paraziți, fragilitatea osmotică crescută a celulelor infestate, leziunea oxidativă și secundar, atacul median imun al membranei eritrocitare duc la o combinație de hemoliză intravasculară și extravasculară (Saari și colab., 2018).

Liza hematiilor este asociată cu o serie de manifestări clinice (letargie, febră, apetit scăzut) care nu sunt proporționale cu gradul de anemie și nu pot fi corelate cu gradul de parazitemie, deoarece acesta rămâne scăzut (Eichenberger și colab., 2017).

Spectrul larg al semnelor clinice a dus la clasificarea babesiozei canine în două forme: i) necomplicată (semnele clinice sunt limitate la anemie); ii) complicată (afectarea mai multor organe), ambele fiind rezultatul răspunsului inflamator (Saari și colab., 2018).

Forma necomplicată a babesiozei apare consecutiv infestării cu specia *Babesia canis vogeli* și se manifestă clinic prin: anemie ușoară până la moderată, trombocitopenie, letargie, hepatomegalie, splenomegalie și febră (Day, 2016).

Căinii care prezintă forma complicată de babesioză, mai pot dezvolta și anemie hemolitică autoimună, care din punct de vedere clinic este mai importantă decât hemoliza indusă de paraziți (Petra și colab., 2018).

În literatura de specialitate este menționată o complicație rară și paradoxală a babesiozei canine – hemoconcentrație relativă, consecutivă trecerii lichidului din componenta intravasculară în cea extravasculară, având drept consecință riscul dezvoltării insuficienței renale acute sau a complicațiilor cerebrale (Welzl și colab., 2001).

Trombocitopenia, simptomul caracteristic asociat cu babesioza canină, este rezultatul distrugerii trombocitelor mediate imun, sechestrarea trombocitelor în splină sau a coagulării intravasculare diseminate (Baric și colab., 2013).

Un mecanism major în patogeniza babesiozei este eliberarea excesivă de mediatori inflamatori care determină dezvoltarea sindromului inflamator sistemic (Petra și colab., 2018). Sindromul de disfuncție multiplă de organe este consecința dereglării mecanismelor antiinflamatorii și proinflamatorii, provocând: insuficiențe renale acute, coagulopatii, icter, anemie hemolitică autoimună, sindromul de detresă respiratorie acută, hemoconcentrație, hipotensiune arterială, miocardită, pancreatită, sindromul de șoc, dar și afectarea cerebrală (Welzl și colab., 2001).

Un alt semn clinic întâlnit, hipoxia tisulară, declanșează o cascadă de procese fiziopatologice ca mecanism adaptativ: șoc, stază vasculară și scăderea capacității hemoglobinei de a transporta oxigenul (Szade și colab., 2015; Green, 2012).

Manifestarea cerebrală a babesiozei are un prognostic grav, cauzând leziuni endoteliale cu necroze vasculare, edeme perivasculare și hemoragii. Semnele clinice se instalează brusc și includ pareza membrelor pelvine, tremurături musculare, nistagmus, anizocorie, pierderea intermitentă a conștienței, convulsii, stupoare, comă, agresivitate sau vocalizare (Green, 2012; Petra și colab., 2018).

2.1.3. Metode de diagnostic

Diagnosticul babesiozei se realizează prin indentificare citologică a paraziților în frotiurile colorate coroborat cu semnele clinice, modificările parametrilor hematologici (trombocitopenie, anemie hemolitică) și biochimici (creșteri ale valorilor parametrilor hepatici și renali) (Ogbu și colab., 2018; Weese și colab., 2019).

Pentru realizarea frotiurilor de sânge, se recomandă recoltarea sângelui de la nivel capilar, prin punționarea nasului sau a urechilor (Barr și colab., 2012), datorită modificărilor fizice ale hematiilor după infestarea cu *Babesia* spp. Acestea devin rigide, încetinind trecerea prin capilare și crescând posibilitatea de aglutinare (Day, 2016).

Pregătirea preparatelor citologice constă în uscarea frotiurilor de sânge subțiri, fixarea pentru două minute cu metanol absolut și colorarea acestora utilizând una dintre metodele

descrise în literatura de specialitate (Giemsa, Romanowsky, Diff-Quick sau Wright) (Lempereur și colab., 2017).

Examinarea microscopică a frotiurilor colorate de sânge poate oferi un diagnostic definitiv, dar sensibilitatea testării depinde de experiența examinatorului (Barr și colab., 2012). Detecția microscopică a hemoparaziților are și dezavantaje, în special când parazitemia este scăzută (pacienți asimptomatici sau cu forma cronică) (Ogbu și colab., 2018). Microscopic, *Babesia canis* se identifică în interiorul hematiilor singure sau în pereche, având formă piriformă. În cazurile de replicare rapidă, pot fi detectate forme neregulate, atipice cu o formă amoeboidă (Greene, 2012).

În primele zile după infestare se evidențiază hematologic o anemie ușoară, normocitară, normocromă care pe măsură ce boala progresează se transformă într-o anemie macrocitară, hipocromă și regenerativă (Greene, 2012). O altă modificare hematologică este reprezentată de trombocitopenie moderată până la severă ce apare la majoritatea câinilor afectați clinic, cu sau fără anemie (Weese și colab., 2019), semnificația clinică fiind încă neclară (Day, 2016).

Anomaliile leucocitelor sunt observate inconsecvent, dar pot include leucocitoză (cu sau fără deviere la stânga), neutrofilie, neutropenie, limfocitoză, eozinofilie sau leucopenie (Greene, 2012). Limfocitele mari „reactive” pot fi observate în babesioza cronică, indicând stimulare antigenică, dar sunt asociate și cu alte patologii infecțioase (Day, 2016).

Rezultatele biochimiei serice sunt nespecifice în babesioză (Day, 2016). Cele mai frecvente modificări observate la câinii cu babesioză includ hiperglobulinemie, creșteri ale enzimelor hepatice (ALT) și a fosfatazei alcaline (ALP) și mai rar hiperbilirubinemie, constatată doar în formele acute a infestațiilor cu *B. canis canis* și *B. canis rossi* (Greene, 2012; Weese și colab., 2019).

Proteinele serice sunt de obicei normale, dar în unele cazuri cronice de babesioză au fost înregistrate: hiperglobulinemie asociată cu hipoalbuminemie (Day, 2016). Creșterea ureei serice nu se corelează cu ratele scăzute de filtrare glomerulară, prin urmare este indicată concentrația creatininei serice pentru a evalua rata de filtrare glomerulară la unii câini cu babesioză (Greene, 2012).

Testarea serologică prin imunofluorescență poate fi utilizată în formele acute sau cronice. (Weese și colab., 2019), însă sunt mai puțin utilizate datorită reactivității încrucișate între specii (Day, 2016).

Tehnicile moleculare sunt extrem de utile în determinarea speciilor *Babesia* care infestază câinii, cu o sensibilitate și o specificitate mare față de evaluarea citologică a frotiurilor de sânge (Petra și colab., 2018). Reacția în lanț a polimerazei (PCR) este o tehnică de diagnosticare frecvent utilizată pentru confirmarea diagnosticului. Această metodă este deosebit de utilă pentru detectarea infestației în cazurile cu niveluri scăzute de parazitemie, precum și pentru determinarea speciei (Irwin, 2009).

2.1.4. Tratament

Împotriva babesiozei canine există mai multe medicamente autorizate, deoarece câinii infestați răspund diferit la substanțele active (Vial și colab., 2006; Irwin, 2009; Solano-Gallego și colab., 2011; Beugnet și colab., 2015).

Înainte de începerea protocolului terapeutic trebuie luat în considerare starea generală a pacientului, gradul și tipul de anemie, specia identificată precum și potențialul toxic al substanțelor active a medicamentelor ce urmează să fie administrate (Day, 2016). În general, câinii cu o formă necomplicată a bolii prezintă o îmbunătățire a stării generale în decurs de 24 până la 72 de ore de la începerea tratamentului, dar unele cazuri, recuperarea poate dura până la 7 zile (Greene, 2012).

Forma complicată a babesiozei reprezintă o provocare chiar și pentru cei mai experimentați clinicieni, de cele mai multe ori fiind nevoie și de spitalizare, tratament de susținere, oxigenoterapie sau hemotransfuzie pe lângă tratamentul specific (Day, 2016).

Tratamentul specific de elecție pentru *B. canis* este Imidocarb dipropionat administrat într-o singură doză de 6,6 mg/kg intramuscular sau subcutanat, repetat la 14 zile (Weese și colab., 2019). Efectele adverse ale acestui produs la câini includ durerea în locul injectării și efecte colinergice (hipersalivație, vomiturile, tahicardie), care pot fi atenuate prin premedicație cu sulfat de atropină în doză de 0,05 mg/kg (Baneth, 2018). În Tabelul 2.2. sunt prezentate mai multe protocoale terapeutice utilizate în babesioza canină, în funcție de agentul patogen.

Alegerea medicamentului optim este determinată în mare măsură de specia implicată, subliniind importanța unei identificări precise a piroplasmelor în timpul procesului de diagnosticare (Day, 2016). Mecanismele de acțiune ale acestor medicamente împotriva *Babesia* spp. sunt în mare parte necunoscute sau nu au fost studiate în detaliu (Baneth, 2018).

Monitorizarea continuă a parametrilor hematologici (în special plachetelor sangvine) se realizează până la revenirea acestora în limite normale. Titrurile de anticorpi încep să scadă după 3-5 luni după încetarea tratamentului. Totuși, ei se mai găsesc în organism timp de câțiva ani (Weese și colab., 2019).

Majoritatea câinilor infestați cu *B. canis* se vor recupera complet cu terapia adecvată, deși se poate înregistra o mortalitate ridicată la pacienții canini cu modificări importante ale parametrilor sangvini (leucopenie, trombocitopenie), SIRS (Sindromul de răspuns inflamator sistemic), MODS (Sindromul de disfuncție multiplă de organe) (Day, 2016).

Proprietarii ar trebui avertizați că este posibil ca planul terapeutic să nu funcționeze, iar parazitul să nu fie eliminat complet din organism (Barr și colab., 2012).

Unii autori au recomandat utilizarea glucocorticoizilor (dexametazona sau prednisolonul), însă beneficiile lor în babesioză sunt în prezent nedovedite (Day, 2016).

Eficacitatea asocierii celor trei antibiotice (clindamicină, doxiciclină și metronidazol) este puțin studiată, existând recomandări ca terapia unică cu clindamicină să nu fie utilizată, pentru a preveni antibiorezistența (Greene, 2012).

Tabelul 2.2/Table 2.2

Protocol terapeutic în babesioza canină
Therapeutic protocol in canine babesiosis

Substanța activă	D.	C.A.	I.	D.T.	Agent patogen					
					<i>B. canis</i>	<i>B. vogeli</i>	<i>B. rossi</i>	<i>B. gibsoni</i>	<i>B. conradae</i>	<i>B. vulpes</i>
Imidocarb dipropionat	5-6,6	IM/SC	1 adm.	Repetare 14	+	+	+			
	7,5	IM/SC	1 adm.	NN	+	+	+	+		
					+	+	+			
Diminazen aceturat	3,5-5	IM	1 adm.	NN	+		+	+		
					+		+	+		
					+		+			
Azitromicină	10	PO	24	10	+			+	+	+
Atovaquone	13,3	PO	8	10	+			+	+	+
					+			+	+	+
Clindamicină	25	PO	12	7-10						
Doxiciclină	30	PO	12	40-60	+			+		
Metronidazol	5	PO	12	7-10						
Clindamicină	30	PO	12	40-60						
Diminazen	3,5	IM	1 adm.	NN				+		
Imidocarb dipropionat*	6	SC	1 adm.	NN				+		
Diminazen	5	IM	1 adm.	Repetare 14		+				
Clindamicină	25	PO	24	14		+				
Doxiciclină	5	PO	24	21						
Bupravaquone	5	IM	48	NN						+
Azitromicină	10	PO	25	10						+
										+

Referințe: Baneth, 2018; Checa și colab., 2017; Patel și colab., 2019; Beugnet F. și colab., 2018

References: Baneth, 2018; Checa și colab., 2017; Patel și colab., 2019; Beugnet F. și colab., 2018

*- se administrează la un interval de 24 ore după administrarea *Diminazen aceturat*;

Legendă: D. – Doză (mg/kg); C.A. – cale de administrare; I. – interval (ore); D.T. – durata tratament (zile); adm. – administrare; PO – per os; SC – subcutanat; IM – intramuscular; NN – nu e necesar.

Legend: D. – dose (mg/kg); C.A. – route of administration; I. – interval (hours); D.T. – duration of treatment (days); adm. – administration; PO – oral; SC – subcutaneous; IM – intramuscular; NN – not necessary.

În zonele endemice, câinii trebuie protejați cu medicație preventivă împotriva căpușelor tot timpul anului. Căpușele atașate trebuie îndepărtate imediat, deoarece transmiterea bolilor are loc timp de câteva zile, iar în cazul *B. canis* transmiterea are loc în 48 ore (Saari și colab., 2018).

În Europa există vaccin împotriva speciei *Babesia canis* ce limitează parazitemia și reduce severitatea semnelor clinice (Weese și colab., 2019). Vaccinul autorizat în România, Nobivac Piro este utilizat doar pentru atenuarea simptomelor.

2.2. Hepatozoonoza

Hepatozoonoza este o boală transmisă prin intermediul căpușelor, dar nu prin înțepătură, ci prin ingestia căpușelor infectate. Se cunosc aproximativ 300 de specii *Hepatozoon*, dar doar două specii infestază câinii: *Hepatozoon canis* și *Hepatozoon americanum* (Sykes, 2013; Saari și colab., 2018).

2.2.1. Etiologie

Hepatozoon canis aparține încregăturii *Apicomplexa*, subordinul *Adeleorina*, familia *Hepatozoidae*, genul *Hepatozoon* (Ivanov și colab., 2008) și a fost observat prima dată în leucocite la un câine în India, denumit inițial *Leucocytoon canis* de către James (1905) (Léveillé și colab., 2019).

Gamontul are o lungime cuprinsă între 8-12 μm și o lățime între 3-6 μm . În secțiunile histologice din probe recoltate din limfonoduri, splină sau măduvă osoasă se pun în evidență schizonții cu dimensiunea 30x30 μm , având formă rotundă sau ovală sub formă de chiști încapsulați în țesut (Saari și colab., 2018).

2.2.2. Patogeneză și simptomatologie

Spre deosebire de alte boli transmise de căpușe, hepatozoonoza canină se transmite prin ingestia unei căpușe infectate ce conține oochiști *Hepatozoon*, care de cele mai multe ori este atașată de piele sau este pe blană (Saari și colab., 2018; Léveillé și colab., 2019). Gazda definitivă a speciei *Hepatozoon canis* este *Rhipicephalus sanguineus*; transmiterea este transdială, de la un stadiu de dezvoltare la altul, dar câinele se infestază prin căpușa adultă care s-a infectat în stadiile precedente. O altă cale de transmitere este și cea transplacentară (Saari și colab., 2018).

După ingestia căpușei infectate cu *Hepatozoon*, sporozoiții penetrează peretele intestinal al câinelui, intrând în circulația sangvină și infectând monocitele și macrofagele, transportând sporozoiții în prima fază, în limfonoduri, măduva osoasă și splină. Ocazional, ei

pot ajunge și în ficat, rinichi sau pulmoni determinând hepatite, glomerulonefrite sau pneumonii (Greene, 2012).

Majoritatea câinilor infestați cu *Hepatozoon canis* par să dezvolte o formă ușoară de boală, asociată cu un grad limitat de reacție inflamatorie. Cu toate acestea, hepatozoonoza produsă de *H. canis* poate varia de la o formă asimptomatică la câinii cu o parazitemie scăzută, până la o formă gravă la animalele cu parazitemie crescută (Day, 2016).

Patogeneza hepatozoonozei canine este influențată de un status imunitar imatur (în cazul animalelor tinere), afecțiuni congenitale sau de imunosupresia organismului cauzată de existența concomitentă a unor agenți infecțioși (toxoplasmoză, babesioză, leishmanioză, ehrlichioză) (Greene, 2012).

Semnele clinice sunt variate și nespecifice, infestația determinând trei forme clinice: i) subclinică – frecvent întâlnită; ii) acută – semnele clinice se manifestă cu o săptămână înainte de deces; iii) cronică – exprimarea semnelor clinice și remisie (Ogbu și colab., 2018).

Majoritatea câinilor infestați cu *H. canis* au un nivel scăzut de parazitare (mai puțin de 5% din leucocitele circulante sunt infestate cu gamonți), clinic exprimându-se doar mucoase palide și letargie (Sykes, 2013). Câinii cu parazitemie crescută (>800 gamonts/ μ L) prezintă febră, letargie, pierdere severă în greutate sau cașexie și hiperglobulinemie (Greene, 2012).

2.2.3. Metode de diagnostic

Identificarea microscopică în frotiurile de sânge colorate (Giemsa, Romanowski sau Diff-Quick) a gamonților *H. canis* este cea mai utilizată metodă de diagnostic. Gamonții au o formă elipsoidală, măsoară aproximativ $8-12\mu\text{m} \times 3-6\mu\text{m}$ și pot fi detectați în citoplasma neutrofilelor, mai puțin frecvent în monocite (Baneth și colab., 2007; Greene, 2012). Cazurile în care gamonții nu pot fi detectați datorită parazitemiei intermitente sau a numărului circulat scăzut reprezintă un dezavantaj al acestei metode de diagnostic (Karagenc și colab., 2006).

Diagnosticul histopatologic este de asemenea util, indicând răspunsul inflamator determinat de speciile *Hepatozoon*. Pentru secțiunile histologice se recoltează probe din limfonoduri, splină sau măduvă osoasă (Ivanov și colab., 2008; Saari și colab., 2018).

Anemia normocitară, normocromă, neregenerativă este cea mai frecventă modificare hematologică raportată în hepatozoonoza canină. Globulele albe se încadrează în limite normale, cu excepția infestărilor masive unde se remarcă o creștere importantă a neutrofilelor ($>150 \times 10^9/\text{l}$) și trombocitopenie (Sykes, 2013).

Cele mai importante modificări ai parametrilor biochimici sunt reprezentate de scăderi ale albuminelor (hipoalbuminemie) și creșteri ale proteinelor (hiperproteinemie), globulinelor (hiperglobulinemie), creatin kinază (CK) și fosfatazei alcaline (ALP) (Day, 2016).

Testele serologice (imunofluorescență indirectă, ELISA) sunt utilizate doar în studii epidemiologice (Ivanov și colab., 2008; Modry și colab., 2017).

Testele PCR pentru detectarea ADN-ului *Hepatozoon* spp. s-au bazat în principal pe amplificarea fragmentelor de ADNr 18S (Greene, 2012). Acestea sunt mai sensibile decât examenul citologic, însă sensibilitatea și specificitatea testului poate varia în funcție de

protocolul utilizat. Rezultatul fals negativ apare la debutul bolii sau în faza cronică (Day, 2016).

2.2.4. Tratament

Imidocarb dipropionat este medicamentul utilizat în infestațiile cu *Hepatozoon canis*. Doza recomandată este 5-6 mg/kg administrat subcutanat sau intramuscular la intervale de 14 zile, până la dispariția gamonților circulanți din sânge (Ivanov și colab., 2008), fiind indicată o evaluare hematologică la fiecare două săptămâni (Day, 2016).

Pentru a preveni posibilele co-infecții, se poate administra doxiciclină în doză de 10mg/kg timp de 21-28 zile împreună cu imidocarb dipropionat (Greene, 2012; Ivanov și colab., 2008).

2.3. Anaplasmoza și erlichioza

În trecut, un număr de organisme intracelulare obligatorii care infectau celulele eucariote au fost clasificate în genul *Ehrlichia* din motive morfologice și ecologice, însă cele mai noi analize genetice au reclasificat aceste organisme în genurile *Ehrlichia*, *Anaplasma* și *Neorickettsia*, toate făcând parte din familia *Anaplasmataceae* (Aiello și colab., 2016).

2.3.1. Etiologie

Pe baza analizei filogenetice a familiei *Anaplasmataceae*, următoarele genuri sunt recunoscute ca fiind patogene pentru animale și oameni:

- Genul *Ehrlichia*: *Ehrlichia canis*, cauzează erlichioza monocitară la câini; alte specii patogene pentru câini includ *Ehrlichia chaffeensis* și *Ehrlichia ewingii*.
- Genul *Anaplasma*: *Anaplasma phagocytophilum* determină anaplasmoza granulocitară la câini, pisici și oameni iar *Anaplasma platys* determină trombocitopenia ciclică infecțioasă canină (Day, 2016).

Ehrlichia spp. și *Anaplasma* spp. sunt bacterii intracelulare, gram-negative, transmise doar prin intermediul căpușelor. Se crede că transmiterea bacteriană are loc într-un interval de 2-48 de ore de la atașarea căpușelor (Weese și colab., 2019).

E. canis invadează monocitele circulante, formând grupuri intracitoplasmatiche denumite morule (Day, 2016). *Anaplasma phagocytophilum* infectează neutrofilele formând morule, ocazional poate fi identificat și în eosinofile (Chirek și colab., 2017), iar *A. platys* infectează trombocitele (Sykes, 2013).

2.3.2. Patogeneză și simptomatologie

E. canis se găsește în glandele salivare și intestinul căpușelor, fiind transferate gazdei în momentul hrănirii. Odată ajuns în gazdă, erlichiiile intră în fluxul sanguin și limfatic localizându-se în monocite, macrofage și celule epiteliale, în principal la nivelul splinei și a ficatului, unde încep reproducerea prin fisiune binară. De acolo, macrofagele infectate diseminează infecția în alte organe, ducând la o creștere anormală a dimensiunii și numărului

de celule, cunoscută sub numele de hiperplazie. Replicarea și diviziunea celulară determină anemie și o creștere a numărului de trombocite (Taylor și colab., 2007; Ogbu și colab., 2018; Ramakant și colab., 2020).

Infecția cu *E. canis* a fost împărțită în trei forme clinice: acută, subclinică și cronică. Din punct de vedere clinic, nu există markeri clari între formele clinice, deoarece debutul și durata infecției sunt necunoscute (Weese și colab., 2019). Trombocitopenia este cea mai întâlnită modificare hematologică, prezentă în toate formele clinice (Greene, 2012).

Principalele semne clinice ale infecției cu *E. canis* sunt febră, letargie, inapetență, scădere în greutate, hemoragii la nivelul mucoaselor (nazale), uveită, anemie, edeme periferice, limfonoduri mărite și uneori semne neurologice. *E. ewingii* provoacă în principal febră, letargie, inapetență și semne de poliartrită (Sykes, 2013; Ogbu și colab., 2018).

Patogeneza completă a anaplasmozei este încă necunoscută. Bacteriile pătrund în organismul gazdei prin inoculare. Nu se știe dacă organismele invadează celulele mature sau cele mieloide precursorale pentru replicarea primară, dar celulele endoteliale, megacariocitele precum și celulele hematopoietice sunt considerate ținte (Day, 2016).

La câini s-a observat inflamații pulmonare severe, leziuni alveolare și vasculită la nivelul extremităților. În absența organismelor bacteriene, se poate sugera un răspuns imunopatologic, cum ar fi stimularea mediată de citokine a macrofagelor gazdă și o activitate nespecifică a fagocitelor mononucleare. Infecția poate induce de asemenea, o reacție inflamatorie supraacută cum ar fi sindromul de șoc septic sau afectarea difuză alveolară care duce la sindrom respirator (Taylor și colab., 2007). Anaplasmoza este în general o infecție mai blândă decât cea cauzată de *E. canis*, dar în timpul fazei acute, aceasta produce o varietate de semne clinice (Fisher și colab., 2006).

Clinic *A. phagocytophilum* se manifestă prin febră, letargie, inapetență și șchiopături (consecutiv poliartritei), deși pot apărea vărsături, diaree, tuse și inflamații la nivelul gâtului. *A. platys* de obicei nu provoacă simptomatologie, dar au fost constatate febra și letargia (Sykes, 2013).

2.3.3. Metode de diagnostic

Diagnosticul se bazează pe suspiciunea clinică și istoricul pacientului (expunerea la căpușe, locuirea sau călătoria într-o zonă endemică) coroborate cu semnele clinice, modificări ale hemoleucogramei, testele serologice și moleculare, precum și cultura in vitro (Day, 2016; Weese și colab., 2019). Importanța diagnosticului precoce constă în răspunsul bun la tratament înainte ca pacientul să intre în faza cronică. Examinarea frotiurilor de sânge poate evidenția morula intracitoplasmatică *E. canis* în monocite în timpul fazei acute a bolii în aproximativ 4% din cazuri (Day, 2016).

Detectarea morulelor *A. phagocytophilum* este evidențiată în 5% până la 37% granulocite infectate la câinii cu semne clinice. Totuși, pentru un diagnostic mai fiabil, se recomandă efectuarea unor analize suplimentare, cum ar fi imunofluorescența indirectă (IFAT), ELISA sau PCR (Ogbu și colab., 2018).

Din 2006 a apărut kitul de testare ELISA SNAP 4DX (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, SUA) cu o sensibilitate (99.4%) și specificitate (100%) ridicate. Acesta detectează anticorpii împotriva mai multor specii patogene cu o deosebită importanță pentru medicina veterinară: *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis*, *E. ewingii*, *B. burgdorferi* și *D. immitis*.

2.3.4. Tratament

Pentru tratarea erlichiozei și a anaplasmozei se poate utiliza doxiciclină conform recomandărilor expuse în Tabelul 2.3. Clinic se observă îmbunătățiri după 24-48 de ore de la începerea protocolului terapeutic (Weese și colab., 2019). Cele mai frecvente efecte adverse după începerea tratamentului cu doxiciclină sunt greața și voma, care pot fi evitate prin administrarea medicamentului cu alimente (Day, 2016).

Tabelul 2.3/Table 2.3

Protocol terapeutic în erlichioza și anaplasmoza canină
Therapeutic protocol in canine erlichiosis and anaplasmosis

Substanța activă	D.	C.A.	I.	D.T.	Agent patogen			
					<i>E. canis</i>	<i>E. ewingii</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>A. platys</i>
Doxiciclină**	5	PO, IV	12	21-28	+++	-		
	10	PO, IV	24	21-28	+++	-		
	10	PO	24	56-102	-	+++		
	5	PO	12	14			+++	-
	10	PO	24	28			-	+
	5-10	PO	12	10			-	+
Oxitetraciclină	7,5-10	IV	12		++			
	7,5-10	IV	8	14-21			-	++
Minociclina**	10-20	PO	12	21-28	+++	-		
	10	PO, IV	12	10			+	+
<i>Cloramfenicol*</i>	25-50	PO, IV, SC	8	21-28	+			
	25-50	PO, IV, SC	8	14-21			+	-
<i>Imidocarb dipropionat*</i>	5	IM	2 doze la un interval de 15 zile		+	-		

Substanța activă	D.	C.A.	I.	D.T.	Agent patogen			
					<i>E. canis</i>	<i>E. ewingii</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>A. platys</i>
Tetraciclina*	22	PO	9	21-28	++	-		
	22	PO	8	14-21			+	+++
Enrofloxacină	5	PO, IV, SC	12	14-21			-	+++

Referințe: Sykes, 2013; Jenkins și colab., 2018; Greene, 2012; Neer și colab., 2002;

References: Sykes, 2013; Jenkins și colab., 2018; Greene, 2012; Neer și colab., 2002;

* - Eficacitate variabilă în infecția cu *Ehrlichia* spp.

** - Tratament de elecție pentru *Ehrlichia* spp.

Legendă: D. – Doză (mg/kg); C.A. – cale de administrare; I. – interval (ore); D.T. – durata tratament (zile); adm. – administrare; PO – per os; SC – subcutanat; IM – intramuscular; IV – intravenos.

Legend: D. – dose (mg/kg); C.A. – route of administration; I. – interval (hours); D.T. – duration of treatment (days); adm. – administration; PO – oral; SC – subcutaneous; IM – intramuscular; IV – intravenous.

2.4. Borelioza

În puțin mai mult de 30 de ani, borelioza (boala Lyme) determinată de spirocheta *B. burgdorferi* s.l., a trecut de la o relativă obscuritate la o problemă globală de sănătate publică cu agent patogen emergent. Distribuția geografică a boreliozei este strâns legată cu vectorii principali, căpușele ce aparțin speciei *I. ricinus* (Rizzoli și colab., 2014).

În Europa, boala Lyme este considerată cea mai frecventă boală transmisă de căpușe la oameni (Cook, 2015).

2.4.1. Etiologie

Spirochetele genului *Borrelia* sunt bacterii cu transmitere vectorială ce aparțin ordinului *Spirochaetales*, familia *Spirochaetaceae* (Day, 2016).

Borrelia burgdorferi sensu lato face parte dintr-un grup de cel puțin 19 specii, dintre care trei: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* și *B. afzelii* sunt patogene (Savić și colab., 2010; Rizzoli și colab., 2014; Day, 2016).

Bacteria are o lungime specifică speciei de 5-15 μm și 0.2-0.5 μm în lățime, prezintă doar câteva spire și posedă – caracter unic la bacterii – un singur cromozom liniar. Genele

pentru proteinele membranare sunt situate pe plasmidele lor circulare și liniare (Mehlhorn, 2008).

2.4.2. Patogeneză și simptomatologie

Unii autori consideră că sunt necesare 24-48 de ore de la atașare căpușelor pentru transmiterea *B. burgdorferi* (Bouchard și colab., 2015); cu toate acestea, s-a demonstrat în studiile in vivo că transmiterea bacteriană are loc în mai puțin de 16 ore, iar timpul minim de atașare pentru transmiterea infecției nu a fost niciodată stabilit definitiv (Cook, 2015)

În momentul transmiterii, spirochetele suferă o modificare a suprafeței exterioare pentru a-și îmbunătăți șansele de supraviețuire în gazdă, producând o varietate de proteine de suprafață (Osp) cu rolul de a permite spirochetelor posibilitatea de adaptare la diferite condiții de mediu (Pantchev și colab., 2015; Parry și colab., 2016).

OspA este diminuată la contactul cu sângele noii gazde, ce are o temperatura mai ridicată (aproximativ 33°C) iar OspC este exprimată pe măsură ce spirochetele *Borrelia* migrează din intestinul capușei în glandele salivare. OspC este unul dintre primii antigeni întâlniți de sistemul imunitar al gazdei, aceștia putând fi detectați încă din faza incipientă a infecției la om și animale (Day, 2016; Parry și colab., 2016).

O altă proteină secretată de membrana exterioară a *Borrelia* spp. este VlsE (*variable major protein-like sequence*), având rolul de a schimba secvența de aminoacizi după infectarea unei gazde (Krupka și colab., 2010).

Boreliile exploatează diferite mecanisme pentru a ocoli sistemul imunitar al gazdei, rezultând astfel infecții persistente sau forme cronice (Day, 2016).

Mecanismul de diseminare a *B. burgdorferi* în organismul gazdei nu este complet elucidat. Una dintre ipoteze constă în posibilitatea diseminării și supraviețuirii în sânge (Krupka și colab., 2010). Alți autori consideră componentele imunologice ale sângelui un mediu ostil pentru *Borrelia* spp., forțând astfel spirochetele să migreze în țesuturi și să se fixeze în țesuturile bogate în collagen (pielea) sau pot disemina în articulații, țesut nervos sau cord (Parry și colab., 2016).

Forma acută a boreliozei la câini este mai puțin întâlnită decât la om, doar 5% dintre câini dezvoltă semne clinice după expunerea la *B. burgdorferi*. Semnele clinice întâlnite în forma acută sunt nespecifice, remarcându-se la debutul bolii șchiopătură acută la un membru sau la mai multe, letargie, anorexie, febră și limfadenopatie locală ușoară care dispar după câteva zile (Krupka și colab., 2010; Parry și colab., 2016; Littman și colab., 2018). Șchiopăturile (consecutiv inflamației articulațiilor) au fost raportate la 9-28% dintre câinii seropozitivi (Krupka și colab., 2010; Leschnik, 2013).

O predispoziție mai mare pentru infectarea cu *Borrelia* spp. o au câinii tineri, adesea de talie mare cu un stil de viață activ sau care trăiesc predominant în regim deschis (Littman și colab., 2018).

Eritemul *migrans* – semnul clinic patognomonic al infecțiilor la oameni nu a fost raportat niciodată la câini (Parry și colab., 2016).

Câinii cu un stadiu avansat al bolii pot dezvolta ”nefrita Lyme” caracterizată printr-o nefropatie progresivă severă cu pierdere de proteine și insuficiență renală, adesea fatală (Leschnik, 2013). Mai rar, au fost semnalate manifestări neurologice și cardiace (Krupka și colab., 2010).

2.4.3. Metode de diagnostic

Diagnosticul prezumtiv de borelioză se poate face pe baza antecedentele expunerii la căpușele *Ixodes* într-o zonă endemică, prezența semnelor clinice compatibile (Fritz și colab., 2003), excluderea altor cauze ale artropatiei nedegenerative sau a febrei de origine necunoscută (Day, 2016).

Parametrii hematologici și biochimici sunt nemodificați la pacienții canini cu artrită, constatându-se însă modificări la pacienții cu glomerulonefrită: hipercolesterolemie, hipoalbuminemie și hiperfosfatemie (Barr și colab., 2012).

Metoda standard de diagnostic a bolii Lyme este cultura celulară a speciei *B. burgdorferi*. Dezavantajele utilizării acestei metode în scop de diagnostic este sensibilitatea scăzută și perioada lungă de incubație (6-8 săptămâni) (Bouchard și colab., 2015).

Examenul citologic al lichidului articular recoltat în faza acută identifică o creștere semnificativă a numărului de neutrofile (Barr și colab., 2012).

Metoda PCR este cea mai utilizată în practica curentă, generând rezultatul în câteva ore însă dezavantajul acestei metode este reprezentat de imposibilitatea diferențierii spirochetelor vii de cele moarte (Krupka și colab., 2010). Detectarea ADN-ul *Borrelia* spp. din țesuturi vizează genele care codifică moleculele, precum flagelina sau OspA. Rezultatele pozitive trebuie întodeauna corelate cu semnele clinice (Day, 2016).

Testele serologice pentru detectarea anticorpilor împotriva *B. burgdorferi* sunt foarte sensibile și specifice fiind utilizate în practica clinică pentru a identifica infecția cu *B. burgdorferi* (Bouchard și colab., 2015).

Confirmarea titrului ridicat de anticorpi specifici *B. burgdorferi* implică o procedură în 2 etape care începe cu un test cantitativ nespecific (ELISA) sau imunofluorescență indirectă (IFAT) (Wagner și colab., 2012; Parry și colab., 2016).

Testarea multiplex a anticorpilor la *B. burgdorferi* pe bază de bile fluorescente este o abordare nouă și foarte sensibilă care evaluează simultan anticorpilor la mai mulți antigeni *B. burgdorferi* ca indicatori ai infecției acute sau cronice. Acești anticorpi includ diferitele tipuri de proteine de suprafață (Osp) care sunt exprimate diferențial fie în capuse (OspA), în timpul transmiterii către gazdă (OspC) sau mai târziu în gazdă (OspF) (Wagner și colab., 2012).

Histopatologic au fost descrise două leziuni unice la câinii cu nefropatie Lyme: glomerulonefrită cu necroze și regenerare tubulară difuză și nefrită interstițială limfoplasmocitară. Aceste leziuni sunt considerate mediate-imun, nu o consecință directă a invaziei renale de către spirochete (Parry și colab., 2016).

2.4.4. Tratament

Terapia cu antibiotice este eficientă în fazele incipente ale bolii (Day, 2016), efectele fiind vizibile în primele zile de la începerea tratamentului. Din cauza comportamentului biologic prelungit al *Borrelia* spp. este indicată o durată prelungită a tratamentului (Littman și colab., 2018).

Tabelul 2.4/Table 2.4

Protocoale terapeutice utilizate borelioză canină
Therapeutic protocol in canine borreliosis

Substanța activă	D.	C.A.	I.	D.T.	Utilizări preferate
Amoxiciclină	20	PO	8	30	Faza incipientă a bolii; artrită; manifestări neurologice; indicată la pui
Azitromicină	25	PO	24	10-20	Faza incipientă a bolii
Cefotaxină	50	IV	8	14-30	Manifestări neurologice
Ceftriaxonă	25	IV, SC	24	14-30	Manifestări neurologice sau cardiace
Cloramfenicol	25-50	PO, SC, IM	8	14-30	Manifestări neurologice
Doxiciclină*	10	PO	12-24	30-42	Faza incipientă a bolii; artrită; manifestări neurologice; nu e indicată la pui sau tineret
Minociclină*	10	PO, IV	12-24	30	
Penicilina G	22,000 UI	IV	8	14-30	Artrită persistentă; manifestări neurologice sau cardiace

Referințe: Greene, 2012; Littman și colab., 2018

References: Greene, 2012; Littman și colab., 2018

* - Tratament de elecție

Legendă: D. – Doză (mg/kg); C.A. – cale de administrare; I. – interval (ore); D.T. – durata tratament (zile); adm. – administrare; PO – per os; SC – subcutanat; IM – intramuscular; IV – intravenos; UI – unități internaționale.

Legend: D. – dose (mg/kg); C.A. – route of administration; I. – interval (hours); D.T. – duration of treatment (days); adm. – administration; PO – oral; SC – subcutaneous; IM – intramuscular; IV – intravenous; UI – international units.

Doxiciclina și minociclina sunt medicamentele de elecție (Littman și colab., 2018). Doxiciclina este preferată atunci când aceasta este constată o co-infecție cu *Anaplasma phagocytophilum* sau *Ehrlichia* spp. (Barr și colab., 2012) sau când trebuie administrată la

pacienții pediatrici (Littman și colab., 2018). Majoritatea schemelor de tratament instituite (Tabelul 2.4.) pentru minim 30 de zile au dus la eliminarea organismului la câini (Greene, 2012).

CAPITOLUL 3: IMPLICAȚIILE CLINICE LA CÂINII CU BABESIOZĂ ȘI CO-INFECTAȚI CU ALTE BOLI TRANSMISE DE CĂPUȘE

CHAPTER 3: CLINICAL IMPLICATIONS IN DOGS WITH BABESIOSIS AND CO-INFECTED WITH OTHER DISEASES TRANSMITTED BY TICKS

Bolile transmise de căpușe, cum ar fi babesioza (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni*), anaplasmoza (*Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*), erlichioza (*Ehrlichia canis*), borelioza (*B. burgdorferi*) și hepatozoonoza (*Hepatozon canis*) provoacă la nivel global boli semnificative la câini (Hii și colab., 2015).

În zonele în care bolile vectoriale transmise de căpușe sunt endemice, co-infecțiile sunt frecvent raportate la câini, în special la cei care trăiesc într-un mediu în care densitatea populației vectorilor este mare. Unele artropode sunt vectori competenți ai mai multor agenți patogeni, iar în funcție de prezența și abundența vectorilor, câinii pot fi simultan sau singular infestați cu un număr mare de agenți patogeni.

Spectrul de agenți patogeni care co-infectează câinii se poate schimba în timp în anumite zone datorită expansiunii rapide a artropodelor și a vectorilor asociați ai acestora datorită tranzitului internațional a animalelor de companie (De Tomasi și colab., 2013).

Co-infecțiile pot potența patogeneza, modificând astfel manifestările clinice asociate de obicei cu infecții singulare (De Tomasi și colab., 2013). De asemenea, co-infecțiile nu depind numai de circulația agenților patogeni, prezența vectorilor sau a rezervoarelor, ci depind și de interacțiunile complexe a agenților patogeni cu gazdele definitive și intermediare (Otranto și colab., 2009).

Co-infecția cu căpușe dar și co-transmiterea agenților patogeni ar putea avea implicații potențiale importante și, prin urmare, sunt relevante pentru sănătatea publică (Diuk-Wasser și colab., 2016). Într-adevăr, co-infecția la oameni și animale ar putea crește severitatea bolii, așa cum a fost raportat pentru co-infecția cu babesioză și boala Lyme (Moutailler și colab., 2016) sau *B. burgdorferi* și *Anaplasma phagocytophilum* (Baneth, 2014) și poate avea, de asemenea, consecințe semnificative în ceea ce diagnosticul bolilor transmise de căpușe (Diuk-Wasser și colab., 2016). O altă consecință a co-infecțiilor este prognosticul negativ dacă medicul nu reușește să suspecteze și să trateze fiecare infecție concomitentă (De Tomasi și colab., 2013).

La un animal co-infectat, căile complexe intracelulare care sunt în mod obișnuit utilizate de diferiți agenți patogeni pentru a le facilita evadarea din sistemul imunitar al gazdei complică și mai mult fiziopatologia bolii, făcând perioada de incubație și exprimarea clinică imprevizibile (Otranto și colab., 2009).

Evoluția manifestărilor clinice și a modificărilor hematologice, biochimice și serologice induse de diverși agenți patogeni transportați de vectori este imprevizibilă, mai ales dacă câinele a fost infectat cu două sau mai multe organisme (De Caprariis și colab., 2011).

Rezultatele unui studiu experimental realizat de Gaunt și colab. (2010) privind co-infecțiile cu anaplasma și erlichia la câini, demonstrează că infecția concomitentă cu *A. platys* și *E. canis* poate avea un impact asupra parametrilor hematologici (anemie și trombocitopenie mai pronunțată) în comparație cu infecția unică cu oricare dintre patogeni și poate modifica, de asemenea, răspunsul imun anticipat al gazdei care ar fi indus după expunerea la un singur agent patogen. De asemenea, co-infecția cu *E. canis* și *A. platys* pare să ducă la o infecție mai persistentă cu *A. platys* decât a fost observată la acei câini care au fost infectați numai cu *A. platys* (Gaunt și colab., 2010).

Anemia hemolitică imun mediată și trombocitopenia imun mediată sunt frecvent întâlnite în practica animalelor mici dar pot apărea și ca o complicație secundară a bolilor transmise de căpușe (Hii și colab., 2015).

Nu se cunoaște dacă trombocitopenia este asociată cu gradul de parazitemie a celulelor roșii sau severitatea bolii în babesoză. Mecanismele trombocitopeniei nu sunt pe deplin înțelese, însă răspunsul organismului la un număr scăzut de trombocite este de a elibera trombocitele mai mari în circulație, prin optimizarea măduvei osoase care înlocuiește pierderea trombocitelor. Astfel, se constată creșterea volumului mediu al plachetelor sangvine (MPV). În cazurile în care răspunsul măduvei osoase la trombocitopenie este întârziat, volumului mediu al plachetelor sangvine (MPV) este mai mic (dar în intervalul normal de referință), deoarece trombocitele circulante au fost eliberate în circulație înainte de stimularea trombocitopenică pentru producerea de trombocite mai mari (Kettner și colab., 2003).

Elsheikha (2019) consideră că tratamentul adecvat al pacienților cu co-infecții nu poate fi realizat fără identificarea corectă a patologiei principale a pacientului. Având în vedere nivelul inevitabil de incertitudine în abordările actuale de diagnostic al co-infecțiilor, autorul recomandă utilizarea unui test molecular multiplex pentru a testa simultan mai mulți agenți patogeni.

Babesia canis rossi este un protozoar virulent capabil să infesteze câinii, iar babesioza cauzată de acest organism este o boală severă, multisistemică cauzată de un răspuns imun exuberant și ineficient, care poate duce la deces prin insuficiență completă de organe. Rata mortalității în cazurile complicate este de aproximativ 10%, dintre care 80% mor în primele 24 de ore (Keller și colab., 2004; Nel și colab., 2004; Schoeman și colab., 2007). În studiul publicat de Goddard și colab. (2013) a fost demonstrată ipoteza cu privire la prezența unei coagulopatii consumative mai severe, caracterizată prin creșterea semnificativă a activării procoagulantelor, a consumului de inhibitori și a activității fibrinolitice la câinii infestați natural cu *B. canis rossi* care nu au supraviețuit, fără evidențierea hemoragiei. Aceste constatări susțin prezența neclară a coagulării intravasculare diseminate la câinii infestați.

Leziunile oxidative (stresul oxidativ) sunt implicate în fiziopatologia multor patologii, existând puține studii legate de efectele acestor leziuni asupra fiziopatologiei erlichiozei

monocitare canine (Gultekin și colab., 2017). În infecția experimentală a erlichiozei monocitară canină au fost semnalate creșteri ale nivelurilor de oxid nitric, peroxidarea lipidelor și oxidarea proteinelor (Da Silva și colab., 2013).

Kumar și colab. (2006) au investigat peroxidarea lipidelor la câinii infectați cu erlichioză monocitară canină co-infestați cu babesioză, negăsind nicio diferență semnificativă între câinii sănătoși și câinii infectați cu erlichioză canină, în timp ce concentrații mai mari de malondialdehidă au fost găsite la câinii cu co-infecții. Niveluri mai ridicate de peroxidare a lipidelor și activități scăzute ale superoxid dismutazei, glutatationului și catalazei au fost demonstrate la co-infecții naturale cu erlichioză monocitară canină, babesioză, anaplamoză și hepatozoonoză (Sarma și colab., 2015).

În studiul realizat de Gultekin și colab. (2017) s-au observat modificări ale profilului lipidic și creșterea stresului oxidativ la câinii cu erlichioză canină comparativ cu grupul de control sănătos, dar cu toate acestea, nu au fost detectate diferențe semnificative între câinii mono și co-infecțați.

Studiul realizat în Lituania de Radzijeuskaja și colab. (2020) a analizat 100 de probe de sânge de la câini suspecți de babesioză canină, fiind folosite metode de detectare moleculară pentru a identifica agenții patogeni transmiși de căpușe *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia spp.*, *Babesia canis* și agenți patogeni transportați de țânțari *Dirofilaria spp.* Rezultatele analizei RT-PCR au demonstrat prezența *D. repens* în 23.0%, *A. phagocytophilum* în 35.0%, *Babesia spp.* în 81.0%, iar *Borrelia spp.* la 19.0% dintre câinii examinați. Au fost detectate co-infecții duble (18/100), triple (6/100) și cvadruple (2/100). Numărul mare de co-infecții se datorează faptului că unele căpușe pot fi co-infectate cu mai mulți agenți patogeni, cu o probabilitate mare ulterioară de co-transmitere la animale sau oameni.

Un studiu realizat în Turcia a demonstrat că detectarea speciei *H. canis* prin PCR este mult mai sensibilă decât examinarea sângelui prin microscopie. În acel studiu, prevalența infecției a 349 de câini a fost de 10.6% conform evaluării frotiului de sânge și de 25.8% a probelor de sânge examinate prin metoda PCR (Karagenc și colab., 2006).

Studiul comparativ realizat de Otranto și colab. (2011) a demonstrat faptul că sângele și concentratul leucocitar sunt cele mai bune țesuturi pentru detectarea infecției cu *H. canis* folosind tehnica PCR. De asemenea, testele cantitative PCR (qPCR) sunt mult mai sensibile și specifice, fiind capabile să detecteze atât *H. americanum*, cât și *H. canis* în timp real, distingând cele două specii (Criado-Fornelio și colab., 2007; Li și colab., 2008), în timp ce testele serologice indică doar expunerea la parazit, fiind utilizate doar în studii epidemiologice (Modry și colab., 2017).

Prezența co-infecției cu *H. canis* și *E. canis* în monocitele aceluiași câine, confirmată prin PCR și secvențiere este descrisă pentru prima dată la trei câini infectați natural, în studiul realizat de Baneth și colab. (2015). Evaluarea frotiurilor de sânge a indicat faptul că cel puțin 50% dintre leucocitele infectate cu gamonți *H. canis* conțineau morule *E. canis*. Câinele

numărul 2 a fost co-infectat și cu *A. platys*, *Babesia vogeli*, babesioza fiind neobservată în frotiurile de sânge colorate, dar a fost detectată prin PCR.

Există mai multe mecanisme posibile care pot facilita invazia celulelor gazdă sau creșterea supraviețuirii intracelulare a ambelor organisme. Acestea includ: (1) deteriorarea membranei exterioare a celulei gazdă în timpul invaziei unui agent patogen care poate permite invazia celui alt agent patogen; (2) suprimarea unor mecanisme de apărare celulară de către un agent patogen facilitând intrarea fără distrugerea celui de-al doilea agent patogen (Baneth și colab., 2015).

Încărcătura microbiană cu doi sau trei agenți diferiți patogeni a fost observată la aproximativ 20% dintre căpușele *I. ricinus* infectate în studiul realizat de Oechslin și colab. (2017). De asemenea, în 33.2% (358/1078) dintre căpușele incluse în studiu au fost testate pozitiv pentru cel puțin un patogen. Prin urmare există un risc real de a dobândi mai multe infecții în urma contactului cu o căpușă infestată.

Namira și colab. (2019) au publicat un articol cu privire la prevalența co-infecțiilor identificate în căpușele colectate (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*) de la câini în perioada 2011-2016. A fost observată o variabilitate mare a co-infecțiilor, fiind detectate 19 combinații diferite de agenți patogeni. Acest rezultat indică faptul că există un risc substanțial de co-infecție cu agenți patogeni multipli, iar combinația de agenți patogeni pare a fi un proces dinamic care variază în funcție de schimbările în prevalența agenților patogeni în natură.

Moutailler și colab. (2016) au identificat prevalențe crescute a simbioților în căpușele infestate cu cel puțin un microorganism, evidențiind astfel fenomenul de co-infecție la căpușe care poate avea implicații importante pentru sănătatea umană și animală, subliniind necesitatea unor noi teste de diagnostic mai bine adaptate bolilor transmise de căpușe. De asemenea, co-apariția mare a simbioților și a agenților patogeni la căpușe, relevă necesitatea de a lua în considerare și aceste interacțiuni în dezvoltarea de noi strategii alternative pentru a controla căpușele și bolile transmise de căpușe.

Implicațiile clinice negative ale câinilor cu co-infecții trebuie să mențină un grad de suspiciune ridicat în timpul examinării pacienților cu istoric de călătorii în zone endemice sau care locuiesc în astfel de zone, pentru eliminarea bolilor cu transmitere vectorială din diagnosticul diferențial.

PARTEA A II-A – CONTRIBUȚII PERSONALE

PART II – PERSONAL CONTRIBUTIONS

CAPITOLUL 4: LOCUL DESFĂȘURĂRII EXPERIMENTELOR, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR

CHAPTER 4: PLACE OF EXPERIMENTS, AIM AND OBJECTIVES OF THE RESEARCH

Cercetările tezei de doctorat au fost realizate în perioada octombrie 2017 – octombrie 2021 în cadrul Clinicii de Boli Parazitare, Facultatea de Medicină Veterinară (Universitatea pentru Științele Vieții "Ion Ionescu de la Brad" din Iași), precum și în Departamentul de Parazitologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Napoli (Universita degli studi "Federico II" Naples, Italia - 2019).

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.

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.

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**.

CAPITOLUL 5: IDENTIFICAREA MOLECULARĂ A SPECIILOR *BABESIA* ȘI CO-INECȚIA CU *HEPATOZOON CANIS* LA CÂINI ȘI CĂPUȘE ÎN ESTUL ROMÂNIEI

CHAPTER 5: MOLECULAR IDENTIFICATION OF *BABESIA* SPECIES AND CO-INFECTION WITH *HEPATOZOON CANIS* IN DOGS AND TICKS IN EASTERN ROMANIA

5.1. Introducere

În ultimii ani, a crescut prevalența și distribuția agenților patogeni transmiși de căpușe, din cauza schimbărilor climatice, globalizării și mișcărilor populației reprezentând astfel, o problemă serioasă pentru animale și oameni (Dantes-Torres și colab., 2012; Baneth și colab., 2012; Banović și colab., 2021). Hemoparaziți intracelulari apicomplexani, cum ar fi *Babesia* spp. și *Hepatozoon canis* sunt o preocupare deosebită pentru medicii veterinari din cauza infecțiilor severe pe care le provoacă la câini dar și a distribuției geografice largi (Otranto și colab., 2011; Hamel și colab., 2011; Imre și colab., 2013b; Solano-Gallego și colab., 2016; Leica și colab., 2019; Cimpan și colab., 2020; Penzhorn, 2020). Babesioza canină, cauzată de diferite specii de *Babesia*, este transmisă prin înțepătura de căpușe ixodide, precum *Dermacentor reticulatus* (*Babesia canis*), *Rhipicephalus sanguineus* (*Babesia vogeli*), *Haemaphysalis leachi* și *Haemaphysalis elliptica* (*Babesia rossi*), *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis bispinosa* și *R. sanguineus* (*Babesia gibsoni*), implicând hematitele (Dantes-Torres, 2008; Foldvari și colab., 2016; Rizzoli și colab., 2014; Gray și colab., 2019). În schimb, *H. canis* se transmite prin ingestia de căpușe infestate din grupul *R. sanguineus*, infestând leucocitele (Green, 2012; Levi și colab., 2018). Reproducerea sexuată se realizează în căpușe pentru *Babesia* spp. și *H. canis*, în timp ce reproducerea asexuată are loc la gazde intermediare vertebrate (Baneth și colab., 2012; Andersson și colab., 2017b).

Din punct de vedere clinic, babesioza este asociată de obicei cu anemie, hemoliză, febră și letargie, simptome ce pot progresa determinând insuficiență multiplă de organe, cu risc crescut de mortalitate (Leica și colab., 2019; Kraje, 2001; Ullal și colab., 2018). Spectrul larg al semnelor clinice depinde de diferitele grade de virulență a speciilor *Babesia*, dar și de mai mulți factori legați de gazde, vârsta animalului, splenectomie, statusul imun precum și infecțiile sau bolile concomitente (Irwin, 2009; Solano-Gallego și colab., 2011; Lempereur și colab., 2017; Gálan și colab., 2018). În plus, severitatea bolii a fost asociată cu parazitaemia ridicată în infestațiile cu *B. rossi* (Böhm și colab., 2006; Leisewitz și colab., 2019). Alte specii, de exemplu *B. vogeli* poate provoca o formă subclinică până la moderată, cu anemie hemolitică severă la câinii tineri (Solano-Gallego și colab., 2011). Mai mult, o nouă specie *Babesia negevi* n. sp., a fost recent descrisă la un câine cu o evoluție fatală (Baneth și colab.,

2020b). Cu toate acestea, este puțin cunoscută corelația dintre severitatea bolii și densitatea parazitului ale altor specii *Babesia*.

Infecția cauzată de *H. canis* este de obicei asimptomatică la câini, fiind asociată cu parazitemie scăzută și o formă ușoară. Evoluția severă cu febră, letargie, cașexie și anemie poate fi asociată cu un nivel ridicat de parazitemie dar este mai rar întâlnită (Little și colab., 2009; Roopali și colab., 2017; Baneth, 2011).

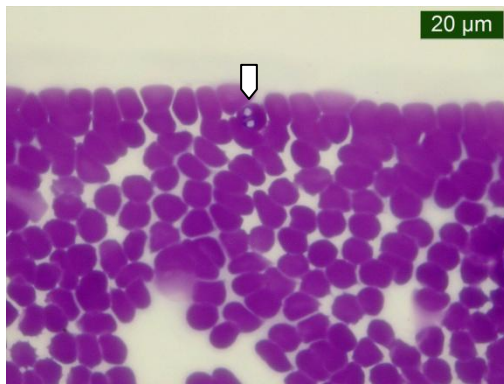
În România, mai multe studii au furnizat date privind identificarea speciilor *B. canis*, *B. vogeli* și *B. gibsoni* la câini prin intermediul analizelor moleculare și serologice (Hamel și colab., 2012; Leica și colab., 2019; Cimpan și colab., 2020; Imre și colab., 2013a; Ioniță și colab., 2011). Mai mult, infestația *H. canis* a fost identificată în România la câini, vulpi și șacali (Cimpan și colab., 2020; Andersson și colab., 2017b; Imre și colab., 2015; Andersson și colab., 2013). Deși distribuția *Babesia* spp. și *H. canis* este bine cunoscută în mai multe părți ale României, există încă o lipsă de informații în anumite zone ale țării. Prin urmare, scopul acestui studiu a fost de a investiga apariția speciilor *Babesia* și a co-infecției cu *H. canis* la câinii suspecți de babesioză și în căpușele colectate de pe aceștia în Iași, estul României.

5.2. Materiale și metodă

Studiul a fost realizat în 2019, fiind incluși 90 de câini care s-au prezentat în cadrul Clinicilor cu semne clinice compatibile cu babesioză (hipertermie, anemie hemolitică, trombocitopenie, icter și hemoglobinurie) (Irwin, 2009). Informațiile privind vârsta, rasa, genul, istoricul infestațiilor cu căpușe și accesul lor în aer liber au fost furnizate de către proprietari. Vârstele câinilor au fost grupate în cinci categorii după cum urmează: pui (mai puțin de 1 an), tineri (1-3 ani), adulți (4-6 ani), seniori (7-10 ani) și geriatrici (> 10 ani). Toți câinii au venit din zonele urbane și suburbane ale județului Iași și nu au fost raportate călătorii în afara României.

Au fost recoltate probe de sânge integral (EDTA) de la câinii incluși în studiu, suspecți de babesioză canină pentru a fi analizate microscopic frotiurile de sânge subțiri, colorate prin metoda rapidă Romanowsky. Pe scurt, frotiurile de sânge uscate au fost colorate utilizând un kit rapid Diff-Quick (Pro-Eko s.r.l, Molise, Italia) și examinate cu un microscop optic la 1000X pentru detectarea paraziților intraeritrocitari (Figura 5.1) (Lempereur și colab., 2017). 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).



(a)



(b)

Figura 5.1 (a), (b) *Babesia canis* – frotiu colorant, metoda Diff-Quick, x1000

Figura 5.1 (a), (b) *Babesia canis* – blood smear, Diff-Quick coloration, x1000

În plus, stadiul de dezvoltare, genul și statusul de hrănire a tuturor căpușelor colectate de la nivelul pielii câinilor (Nr.=15) au fost determinate cu ajutorul unui stereomicroscop (Zeiss Stemi 305). În plus, au fost incluse în studiu 124 căpușe colectate de la 23 de câini diagnosticați anterior cu babesioză prin frotiuri de sânge colorate. Un sistem de notare a fost utilizat pentru a exprima intensitatea căpușelor pe gazdă infestată, în conformitate cu Asociația Mondială pentru avansarea parazitologiei veterinare (WAAVP) după cum urmează (scor-număr de căpușe/pe animal) (niciunul: 0; scăzut: 1-3; moderat: 4-10; intens: >10) (Marchiondo și colab., 2007).

Căpslele colectate au fost depozitate în etanol 70% și separate individual în funcție de fiecare animal, pentru identificarea morfologică (Figura 5.2).



Figura 5.2 Identificare morfologică a căpușelor, stereomicroscop Zeiss Stemi 305, x40

Figure 5.2. Morphological identification of ticks, Zeiss Stemi 305 stereomicroscope, x40

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 (Tabelul 5.1).

Tabelul 5.1/Table 5.1

Structura studiului Study design	
Probe recoltate	Analize de laborator
Probe de sânge recoltate de la câini simptomatici (nr.=90) și căpușe colectate (nr.=58 căpușe prezente pe 15 câini)	Frotiuri de sânge subțiri colorate prin metoda rapida Romanowsky (Lempereur și colab., 2017) pentru detecția paraziților intraeritrocitari Extracție ADN, amplificare PCR și secvențierea (Bajer și colab., 2019; Inokuma și colab., 2002) speciilor <i>Babesia</i> spp. și <i>H. Canis</i> Identificarea morfologică a căpușelor (Estrada-Pena și colab., 2004; Dantes-Torres și colab., 2013)
124 căpușe colectate de pe pielea a 23 câini diagnosticați cu babesioză canină prin detectarea microscopică în frotiurile de sânge colorate	Identificarea morfologică a căpușelor (Estrada-Pena și colab., 2004; Dantes-Torres și colab., 2013)
Numărul total de căpușe în eșantioane (nr.=100)	Extracție ADN, amplificare PCR și secvențierea (Bajer și colab., 2019; Inokuma și colab., 2002) speciilor <i>Babesia</i> spp. și <i>H. Canis</i>

Toate probele de sânge și căpușe au fost transferate la Universitatea Federico II, Departamentul de Medicină Veterinară și Producție Animală, din Napoli, Italia, unde au fost efectuate extracții ADN și screening-urile moleculare. ADN-ul a fost extras din 200 μ L de sânge cu anticoagulant (EDTA) (Nr.=90 de probe de sânge) și din căpușe (Nr.=100 eșantioane) folosind kitul Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, Leipzig, Germania), conform instrucțiunilor producătorului. Alcoolul etilic a fost utilizat înainte de extracția ADN-ului. Calitatea și cantitatea ADN-ului extras au fost verificate cu un spectrofotometru (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, MA, SUA). ADN-ul extras a fost depozitat la -20°C. Primerii specifici au fost utilizați pentru a amplifica fragmentul de genă rARN 18S al speciilor *Babesia/Theileria* (559 bp): BabGF: 5'-GYTTGTAATTGGAATGATGG-3'; BabGR: 5'-CCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3' (Bajer și colab., 2019) și *H. canis* (666 bp): HepF:5'-ATACATGAGCAAAATCTCAAC-3'; HepR: 5'-CTTATTATTCCATGCTGCAG-3' (Inokuma și colab., 2002).

Reacțiile au fost efectuate folosind protocolul PCR descris de Bajer și colab. (2019) cu unele modificări pentru *Babesia* spp. Detectare: s-a efectuat un singur punct final PCR preparând un volum total de 25μL PCR (22μL de amestec PCR + 3μL de extractul ADN) pentru fiecare probă, cu 1x soluție tampon (EcoTaq PLUS, Lucigen, WI, SUA) și 0,5μM din fiecare primer (Bajer și colab., 2019). Pentru *H. canis*, protocolul PCR a fost efectuat conform Inokuma și colab. (2002). Produsele PCR au fost detectate într-un gel de agaroză cu punct de topire scăzut, colorat cu bromură de etidiu 1,5% (BIO-RAD, Spania). Probele de ADN *Babesia canis* și *H. canis* au fost utilizate ca martori pozitivi, în timp ce apa ultra-pură a fost folosită ca martor negativ.

Deoarece sub-eșantioanele de căpușe au fost compuse din una-trei căpușe, rezultatele PCR au fost exprimate ca o rată minimă de infecție (MIR), adică procentul minim de căpușe într-un grup cu ADN detectabil pentru fiecare agent patogen specific. S-a presupus că un eșantion PCR pozitiv conține doar o căpușă pozitivă (și pentru eșantioanele cu două-trei căpușe) (Kramer și colab., 1999; Zanet și colab., 2020).

ADN-urile amplificate pentru *Babesia* spp. și *H. canis* au fost purificate cu Kitul QIAquick PCR Purification conform instrucțiunilor producătorului (Qiagen, Hilden, Germania) și secvențiate cu primeri direct și invers (Eurofins, Martinsried, Germania). Rezultatele secvențierii au fost analizate cu software-ul Chromas versiunea 2.6.6 (www.technelysium.com.au, accesat pe 20 februarie 2019). Comparățiile secvenței ADN au fost realizate de BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov, ultima accesare la 1 martie 2021).

Analizele statistice au fost realizate cu ajutorul testelor Chi-square, iar intervalele de încredere la 95% (95% CI) au fost calculate utilizând SPSS Statistics v.23 (IBM, Armonk, NY, SUA) pentru a verifica posibilele asocieri între datele câinilor (rasă, vârstă, gen și accesul lor în mediul exterior) și prevalența speciei *Babesia*. Diferențele au fost considerate semnificative la $p < 0,05$.

5.3. Rezultate și discuții

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).

Valorile prevalenței au fost mai mari la câinii între 1 și 3 ani (58.9%; 95% CI = 48.0–69.0) și la masculi (52.2%; 95% CI = 41.5–62.7). Cele mai afectate rase au fost mixte (52.2%; 95% CI = 41.5–62.8), urmate de câinii pekinez (14.4%; 95% CI = 8.2–23.8) și ciobănesc german (10%; 95% CI = 4.9–18.6). Toți câinii au prezentat istoric de infestare cu căpușe și 74.4% (67/90; 95% CI = 63.9–82.8) au avut acces la exterior.

Toți câinii au primit una sau două doze de imidocarb dipropionat (6.6 mg/kg, la un interval de două săptămâni; Imizol; Intervet) și terapie suplimentară de susținere, în funcție de tulburările clinice exprimate. 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. Procentul de câini infestați cu *B. canis* cu acces la exterior a fost semnificativ mai mare ($p < 0,001$) în comparație cu câinii cu un stil de viață predominant în interior.

Mai mult, a fost găsită o asociere semnificativă statistic între câinii tineri (1–3 ani) și pozitivitatea pentru *B. canis* ($p < 0,005$). Nu a fost găsită nicio asociere statistică semnificativă între rasă sau gen și pozitivitatea speciilor *Babesia* (Tabelul 5.2).

Tabelul 5.2/Table 5.2

Gen, categorii de vârstă, rasă, stil de viață, formă clinică de babesioză, istoric de infestare cu căpușe, expunerea căpușelor în timpul vizitei de rutină și prevalența *Babesia* spp. pentru cei 90 de câini incluși în studiu

Gender, age categories, breed, lifestyle, clinical form of babesiosis, tick infestation history, exposure of ticks during the routine visit and prevalence of *Babesia* spp. for 90 dogs included in the study.

Variabile	Prevalența babesiozei (95% CI)
Gen	
Masculi	52.2% (41.5–62.7)
Femele	47.8% (37.2–58.5)
Categorie de vârstă (ani)	
Pui (> 1)	5.6 % (2.1–13.1)
1–3	58.9% (48.0–69.0)
4–6	13.3% (7.4–22.5)
7–10	10% (4.9–18.6)
> 10	12.2% (6.6–21.2)

Variabile	Prevalența babesiozei (95% CI)
Rase câini	
Mixtă	52.2% (41.5–62.8)
Pechinez	14.4% (8.2–23.8)
Ciobănesc german	10% (4.9–18.6)
Akita	2.2% (0.4–8.6)
Beagle	5.6% (2.1–13.1)
Ciobănesc caucasian	4.4% (1.4–11.6)
Bullmastiff	1.1% (0.1–6.9)
Bull terrier	3.3 % (0.9–10.1)
Boxer	6.7% (2.7–14.5)
Stil de viață	
Exterior	74.4% (63.9–82.8)
Interior	25.6% (17.2–36.0)
Istoric infestație căpușe	100% (94.9–99.9)
Câini	
Cu căpușe pe corp	16.7% (9.9–26.3)
Fără căpușe pe corp	83.3% (73.7–90.0)
Babesioză	
Acută	61.1% (50.2–71.0)
Moderată	38.9% (28.9–49.8)
Total câinilor analizați (90)	100% (94.9–99.9)

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 (Tabelul 5.3).

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), a fost găsit 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 (Tabelul 5.3).

Tabelul 5.3/Table 5.3

Rezultatele speciilor și stadiilor de dezvoltare a căpușelor (numărul total de căpușe colectate și totalul eșantioanelor) și speciile patogene identificate
Results of species and life-stages of ticks (total number collected and total pools) and pathogen species identified

Specii	Nr. De căpușe (F/M/N/L)	Nr. De eșantioane (F/M/N/L)	Specii patogene
<i>Ixodes ricinus</i>	112 (73/38/1/0)	64 (45/19/1/0)	* <i>B. canis</i> (n=55) * <i>H. canis</i> (n=15) * <i>B. Microti</i> -like (n=1)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	67 (39/28/0/0)	33 (20/13/0/0)	<i>B. canis</i> (n=33)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> group	3 (1/0/1/1)	3 (1/0/1/1)	<i>B. vogeli</i> (n=3)

Legendă: nr. – număr; F – femele; M – masculi; N – nimfe; L – larve;

Legend: nr. – number; F – females; M – males; N – nymphs; L – larvae.

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*. Într-adevăr, *B. canis* este o cauză majoră de babesioză la câinii din România, pe baza unor studii serologice și moleculare efectuate anterior în Sudul și Vestul țării (Hamel și colab., 2012; Imre și colab., 2013b; Andersson și colab., 2017a; Ilie și colab., 2010; Ioniță și colab., 2013). Cu toate acestea, pe baza constatărilor raportate de Andersson et al. (2017b), ar putea exista o mare varietate de genotipuri ale acestui parazit în România (Andersson și colab., 2017b). Mai mult, un procent mare de câini infestați cu *B. canis* cu formă acută de au fost importați din Ungaria (Hamel și colab., 2011), evidențiind astfel că unii câini importați și infestați cu *B. canis*, pot juca un rol critic ca și gazde rezervor atunci când sunt introduși în zone libere de acest agent patogen dar cu prezența căpușei vector.

Peste 60% dintre câinii infectați cu *B. canis* din prezentul studiu au exprimat semne clinice acute, ceea ce este de acord cu alte studii efectuate în România, Italia și Ungaria (Hamel și colab., 2011; Leica și colab., 2019; Solano-Gallego și colab., 2008; Máthé și colab., 2007). Există multe raportări care atestă că prezența speciilor *Babesia* este foarte mult asociată cu distribuția geografică a vectorilor acestora (Hamel și colab., 2011; Guo și colab., 2017; Gabrielli și colab., 2015). Au fost raportate mai multe cazuri de babesioză canină în zone noi din Germania, Ungaria, Elveția și Țările de Jos, datorită faptului că în acele zone au fost introduse căpușe *D. reticulatus* (Barutzki și colab., 2007; Nijhof și colab., 2007; Sréter și colab., 2005; Heile și colab., 2006; Hamel și colab., 2011). Cu toate acestea, specia *B. canis* a

fost raportată în zone în care prezența *D. reticulatus* este rară (de exemplu, regiunile insulare ale Greciei) (Diakou și colab., 2019). Prezența *B. canis* și *B. vogeli* la câinii din studiul de față este susținută și de speciile de căpușe care au fost găsite (*I. ricinus* = 64%, *D. reticulatus* = 33% și grupa *R. sanguineus* = 3%). În România, *D. reticulatus* a fost raportată ca fiind cea mai frecventă căpușă (67.2%) care infestază câinii în zonele de Sud, Vest, Nord și centru, urmată de grupul *R. sanguineus* (32.8%) (Andersson și colab., 2017a; Ioniță și colab., 2013; Mihalca și colab., 2012; Tudor și colab., 2010). Grupul *Rhipicephalus sanguineus* a fost raportat și cu o prevalență crescută în zonele urbane ale României, inclusiv în zona de sud a Bucureștiului (Ioniță și colab., 2003b; Ioniță și colab., 2010).

Un singur studiu (Brătuleanu și colab., 2021) a raportat recent prezența *D. reticulatus* în județul Iași, aceeași zonă din studiul de față, dar autorii nu au identificat căpușe *I. ricinus* așa cum am raportat aici. Mai mult, aproape jumătate din toate căpușele *I. ricinus* îndepărtate de la câini au fost pozitive pentru *Babesia*, iar prevalența totală a *B. canis* la căpușele *I. ricinus* a fost mai mare decât la căpușele *D. reticulatus* (55% față de 33%).

Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pentru a obține informații suplimentare cu privire la răspândirea efectivă a speciilor de căpușe și a agenților patogeni transmiși acestora la câini în partea de Est a României. Nu am găsit cazuri de infecție cu *H. canis* la câini, dar 15 căpușe *I. ricinus* au fost pozitive pentru *H. canis*, 6 au fost co-infectate cu *B. canis* și 1 cu *B. microti*-like. Rezultatele nu sunt în acord cu mai multe studii din Sudul, Vestul, centrul și Nordul României, unde am constatat o prevalență importantă a *H. canis* atât la câini, cât și la căpușe, variind de la 15% la 48% (Cimpan și colab., 2020; Andersson și colab., 2017b; Andersson și colab., 2013).

Cu toate acestea, rezultatele noastre au arătat că ADN-ul *H. canis* a fost detectat la căpușele *I. ricinus*, în mod similar cu studiul lui Andersson și colab. (2017a). *Hepatozoon canis* a fost identificat la căpușele *I. ricinus* (Najm și colab., 2014; Reye și colab., 2010; Namina și colab., 2019) colectate de la vulpi și câini, dar această specie de căpușe nu este recunoscută ca un vector competent pentru *H. canis* (Giannelli și colab., 2013). În schimb, există și alte studii (Andersson și colab., 2017b; Potkonjak și colab., 2016; Chițimia-Dobler și colab., 2017) care arată că ADN-ul *H. canis* nu a fost detectat la căpușele *R. sanguineus* sau studii care raportează infestații cu *H. canis* în zonele în care căpușele *R. sanguineus* nu sunt prezente (Miterpáková și colab., 2017), deși această specie de căpușe este considerată a fi principalul vector pentru *H. canis* (Baneth și colab., 2007; Christophers, 1907).

Pe de altă parte, există mai multe studii care au evidențiat prezența co-infecțiilor cu agenți patogeni multipli transmiși de căpușe la câini, cum ar fi: *H. canis*, *Babesia* spp, *Ehrlichia canis* și *Anaplasma platys* (Galay și colab., 2018; Bouattour și colab., 2021), precum și căpușe care adăpostesc ADN-ul unor agenți patogeni care nu au fost detectați în probele de sânge al gazdei lor (Juasook și colab., 2021). În plus, studiul nostru a găsit ADN-ul speciei *H. canis* în căpușe (*I. ricinus*), dar nu și în sângele câinilor, demonstrând că acest agent patogen circulă în Iași, în partea de Nord-Est a României. Prezența co-infecțiilor cu două sau

mai multe specii patogene, adică *Babesia* și *Hepatozoon*, poate duce la o patogenitate mai mare și la mai multe complicații pentru câinii infestați.

În ciuda disponibilității produselor acaricide, câinii sunt foarte expuși la bolile transmise prin vectori. Există multe studii care atestă că majoritatea câinilor, nu numai câinii fără stăpân sau din adăposturi, ci și câinii cu stăpâni, nu au primit tratamente preventive adecvate pentru a proteja animalele de căpușe, purici și infestări cu țânțari sau flebotomi (Baneth și colab., 2016; Otranto, 2018; Colombo și colab., 2021). Mai mult, hepatozoonoza felină este o boală emergentă, iar pisicile pot fi infestate cu *Hepatozoon felis* dar și cu *H. canis*. Astfel, protecția câinilor ar putea limita circulația agenților patogeni (inclusiv *H. canis*) care ar putea amenința sănătatea altor animale (Morelli și colab., 2021).

În România, mai multe studii au raportat diferite intervale de prevalență a *B. gibsoni* la câinii simptomatici din vestul și Nord-Vestul României (Imre și colab., 2013a). Lipsa infestărilor cu *B. gibsoni* în studiul nostru ar putea fi explicată de un număr redus de cazuri al acestei infestări în estul României. Rezultate similare au fost obținute recent în partea de sud a României (Cimpan și colab., 2020). Un rezultat neașteptat din studiul de față a fost identificarea moleculară a speciei *B. rossi* la doi câini simptomatici. Într-adevăr, un câine a murit, iar celălalt a fost tratat cu succes. Principalele semne clinice manifestate de câinii infestați au fost anorexia, febra, hemoglobinuria, anemie, constipație alternantă cu diaree și splenomegalie. De fapt, nu putem explica pe deplin aceste rezultate.

Cu toate acestea, șacalul cu spate negru (*Canis mesomelas*) este considerat gazda naturală rezervor a speciilor *B. rossi* și *H. elliptica*, cea mai răspândită căpușă în populațiile de șacali din Estul și Nord-Estul Africii de Sud și care are capacitatea de a transmite *B. rossi* (Penzhorn și colab., 2020). Un studiu recent a dezvăluit un rezultat neașteptat, care nu arată pozitivitatea *B. rossi* în populațiile de șacali cu spate negru din Africa de Sud (Viljoen și colab., 2021). Din cunoștințele autorilor, în România nu a fost detectat nici vectorul, nici agentul patogen al *B. rossi*. Cu toate acestea, șacalul auriu (*Canis aureus*) este prezent în toată țara (Angelescu, 2004; Papp și colab., 2014) și a fost deja incriminat ca un potențial rezervor natural al *Dirofilaria* spp. (Ionică și colab., 2016). Poate că putem extinde ipoteza rolului populațiilor de șacali aurii sau a altor canide sălbatice precum lupii (*Canis lupus*) și vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) în menținerea ciclului de viață al *B. rossi* în România. În plus, șacalul auriu este larg răspândit în Europa, iar o expansiune continuă a acestor canide sălbatice a fost raportată în Peninsula Balcanică (Arnold și colab., 2012; Trouwborst și colab., 2015; Vasiliu, 1961). Cu toate acestea, există doar trei cazuri raportate cu *B. rossi* în Europa de Vest (Franța, Germania și Elveția) într-un studiu care și-a propus să raporteze apariția ADN-ului *Babesia* spp. din peste 100.000 de mostre din America, Europa, Asia și Oceania (Birkenheuer și colab., 2020).

Sunt necesare studii suplimentare pentru identificarea speciilor de căpușe și a competenței lor vectori pentru babesioza canină cauzată de *B. rossi* în România. Limitările acestui studiu au fost următoarele: (i) am colectat în mare parte căpușe adulte de la câini, deoarece această etapă de viață este mai ușor de detectat în timpul examenului clinic. Studiile

moleculare asupra larvelor și nimfelor ar putea fi utile pentru a evalua orice diferențe în transmiterea agenților patogeni cu adulții; (ii) cantitatea redusă a probelor de sânge recoltate de la câinii simptomatici și a căpușelor de pe aceștia nu a fost suficientă pentru a identifica imaginea reală a *H. canis* în partea de Est a României, știind că există o prevalență ridicată a infestației cu *H. canis* în Sudul, Vestul și centrul României (Andersson și colab., 2017a; Cimpan și colab., 2020; Andersson și colab., 2017b); (iii) am identificat doar trei căpușe din grupul *R. sanguineus* colectate de la câini, un număr irelevant pentru a oferi un screening concludent asupra răspândirii efective a acestei specii în zona studiată; (iv) nu am efectuat o urmărire a celor două cazuri infectate cu *B. rossi* deoarece un câine a murit și proprietarul nu a aprobat necropsia. Proprietarul celuiilalt câine care este încă în viață nu a colaborat cu noi pentru analize ulterioare; și (v) în cele din urmă, nu am efectuat analize filogenetice.

5.4. Concluzii parțiale

Studiul a relevat prima identificare a speciei *B. rossi* la doi câini simptomatici din România, deși sunt necesare studii suplimentare pentru a confirma prezența acestui agent patogen și a vectorului său în Europa și România și pentru a investiga competența vectorului a speciilor de căpușe care ar putea acționa ca vectori pentru acest agent patogen.

Studiul nostru a demonstrat, de asemenea, o prevalență ridicată a *B. canis* și o prevalență scăzută a *B. vogeli* la câini și la căpușele acestora în partea de Est a României; prin urmare, caracterizarea genetică a speciilor *Babesia* ar putea ajuta practicienii să aleagă testele și tratamentele adecvate și pentru înțelegerea riscurilor de infecție, știind că *B. canis* este considerat mai patogen decât *B. vogeli*. Mai mult, putem sublinia încă o dată importanța caracterizării moleculare a speciilor *Babesia* și a patogenității asociate la câini, susținută și de date care relevă prima descriere a unei noi specii de piroplasmid, *Babesia negevi* n. sp., la un câine cu o boală fatală în Sudul Israelului (Baneth și colab., 2020b) și, recent și în Iordania (Far și colab., 2021).

Validarea rezultatelor obținute în acest capitol a fost realizată prin publicarea în revista "Pathogens" a lucrării intitulată "*Occurrence of Babesia Species and Co-Infection with Hepatozoon canis in Symptomatic Dogs and in Their Ticks in Eastern Romania*", autori: Ciuca Lavinia, Gabriela Martinescu, Liviu D. Miron, Constantin Roman, Dumitru Acatrinei, Giuseppe Cringoli, Laura Rinaldi, și Maria P. Maurelli, 2021, IF 3,492.

CAPITOLUL 6: DETECTAREA CO-INFECȚIILOR CU *BORRELIA*, *ANAPLASMA* ȘI *EHRlichia* LA CÂINII INFESTAȚI CU BABESIOZĂ ÎN NORD-ESTUL ROMÂNIEI

CHAPTER 6: DETECTION OF THE CO-INFECTIIONS WITH *BORRELIA*, *ANAPLASMA* AND *EHRlichia* SPECIES IN DOGS WITH BABESIOSIS IN NORTH-EASTERN ROMANIA

6.1. Introducere

Borrelioza este o infecție cu potențial zoonotic cauzată de complexul *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Low și colab., 2018; Sormunen și colab., 2016; Weese și colab., 2019), transmisă de *Ixodes ricinus* și *Ixodes persulcatus* în Europa (Sormunen și colab., 2016; Springer și colab., 2021). Sunt responsabile pentru infecție bacteriile spiralate ce aparțin ordinului *Spirochete* (Pantchev și colab., 2015). Cele mai comune trei specii patogene europene care afectează câinii și oamenii ce aparțin complexului *Borrelia burgdorferi sensu lato* sunt *B. afzelii*, *B. garinii* și *B. burgdorferi sensu stricto* (Skotarczak, 2018).

În anul 2016 a fost identificată la căpușele tari din Europa o specie de *Borrelia* care nu aparține complexului *B. burgdorferi (s.l.)*, ce a fost denumită *Borrelia miyamotoi*. *Borrelia miyamotoi* se transmite prin intermediul căpușelor moi *Argasidae*, dar în Europa au fost raportate unele cazuri umane cu infecție produsă de specia *B. miyamotoi*, transmisă de căpușe *Ixodes* (Sormunen și colab., 2016).

Anaplasma phagocytophilum și *Anaplasma platys* sunt bacteriile gram negative care provoacă anaplasmoza canină, iar agentul patogen pentru anaplasmoza granulocitară umană este *A. phagocytophilum* (Kybicová și colab., 2009; Low și colab., 2018), identificat în principal în centrul și Nordul Europei (Sainz și colab., 2015). La câini, *A. platys* a fost diagnosticat în bazinul mediteranean, inclusiv în România (Sainz și colab., 2015). Într-un studiu publicat în 2017 de Matei și colab. s-a identificat infecția cu *A. platys* la caței în România, fiind emisă ipoteza transmiterii verticale a agentului patogen (Matei și colab., 2017b). Trei specii de *Ehrlichia* cauzează erlichioză canină: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* și *Ehrlichia chaffensis*, dar doar două dintre ele (*E. ewingii*, *E. chaffensis*) sunt agenți patogeni zoonotici umani (Ismail și colab., 2017; Low și colab., 2018). În Europa, singurele specii izolate la câini sunt *E. canis* (Sainz și colab., 2015).

Câinii sunt considerați rezervoare pentru *B. burgdorferi s.l.* (Kiss și colab., 2011). Având în vedere legătura strânsă dintre câini și oameni, determinarea nivelurilor de anticorpi împotriva *Borrelia* spp. la câini ajută la evaluarea modificărilor prevalenței boreliozei, precum și la determinarea factorilor de risc pentru om (Bhide și colab., 2004).

În ultimii 10 ani în România, incidența boreliozei la oameni a variat între 1.2 și 4.2 cazuri raportate la 100000 locuitori anual, deși numărul real al cazurilor poate fi mult mai mare (Kalmár și colab., 2021).

În România au fost efectuate mai multe studii serologice (Cazan și colab., 2020; Kiss și colab., 2011; Mircean și colab., 2012; Micu și colab., 2018) și moleculare (Andersson și colab., 2017a; Morar și colab., 2015; Hamel și colab., 2012; Matei și colab., 2017b) cu privire la depistarea agenților patogeni transmiși de căpușe sau a co-infecțiilor identificate în sângele câinilor, prin urmare scopul studiului a fost de a detecta posibilele co-infecții cu *Borrelia*, *Ehrlichia* și *Anaplasma* la cainii co-infecțați cu babesioză în Nord-Estul României.

6.2. Materiale și metodă

Din martie 2018 până în noiembrie 2019, în acest studiu au fost incluși 66 de câini care au fost confirmați cu babesioză (Ciucă și colab., 2021) în cadrul Clinicilor Facultății de Medicină Veterinară din Iași (România). În timpul examinării clinice generale a câinilor, căpușele atașate au fost îndepărtate și plasate în tuburi separate cu 70% etanol, fiecare primind un număr unic pentru identificarea speciilor folosind chei taxonomice standard (Estrada-Peña, 2004; Estrada-Peña și colab., 2018).

Căpușele identificate de la fiecare câine au fost împărțite în eșantioane în funcție de specie, sex și stadiu de dezvoltare. Probele de sânge integral au fost colectate din vena cefalică și păstrate la -20°C până la extracția ADN-ului. 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. folosind următoarele protocoale PCR descrise de Sainz și colab. (2015), Cisak și colab. (2012), Massung și colab. (2007).

Extracția, amplificarea și secvențierea ADN-ului

Probele (sânge și căpușe) au fost transferate la Universitatea Federico II, Departamentul de Medicină Veterinară și Producție Animală, din Napoli (Italia), unde s-au efectuat extracțiile ADN și testarea moleculară pentru a identifica speciile de *Borrelia*, *Anaplasma* și *Ehrlichia* (Tabelul 6.1). ADN-ul a fost extras folosind un kit comercial (Dneasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Germania) conform instrucțiunilor producătorului. Căpușele au fost complet lizate după o incubare de 13-14 ore.

Tabelul 6.1/Table 6.1

Primerii utilizați în PCR
The primers used in PCRs

Patogen	Primeri	Referințe
<i>Borrelia</i> spp.	Fla1	(5'-
	AGAGCAACTTACAGACGAAATTAAT-3')	Cisak și colab.
	Fla2	(5'-
	CAAGTCTATTTTGGAAAGCACCTAA-3')	(2012); Sainz și colab. (2015)

Patogen	Primeri	Referințe
<i>Anaplasma</i> <i>spp./Ehrlichia spp.</i>	PER1 (5'-TTTATCGCTATTAGATGAGCCTATG-3') PER2 (5'-CTCTACACTAGGAATTCCGCTAT-3')	Goodman și colab. (1996); Massung și colab. (2007)

Protocolul PCR pentru identificarea *Borrelia* spp., descris de Cisak și colab. în 2012 folosind primeri Fla1 și Fla 2 specifici pentru fragmentul de secvență a genei Fla. Profilul termic utilizat a fost 95°C timp de 5 minute, urmat de 35 de cicluri de 94°C timp de 30 de secunde, 54°C timp de 45 de secunde, 72°C timp de 45 de secunde, apoi expansiunea finală la 72°C timp de 3 minute (Cisak și colab., 2012).

Pentru a identifica speciile *Ehrlichia/Anaplasma*, secvențele mitocondriale parțiale ale genelor 16S au fost generate și analizate folosind primeri PER1 și PER2 (Tabelul 6.1). Profilul termic utilizat a fost 95°C timp de 10 minute, urmat de 40 de cicluri de 94°C timp de 60 de secunde, 52,4°C timp de 45 de secunde, 72°C timp de 60 de secunde, apoi expansiune finală la 72°C timp de 10 minute (Goodman și colab., 1996; Massung și colab., 2007).

Ampliconii au fost introduși în gel de agaroză (Bio-Rad, Madrid, Spania) cu bromură de etidiu (2%) și produșii PCR au fost purificați (Kit de purificare ADN ZYMO) și secvențiați cu primeri direct și invers (Eurofins, Martinsried, Germania). Rezultatele secvențierii au fost analizate cu software-ul Chromas versiunea 2.6.6 (www.technelysium.com.au). Comparațiile secvenței ADN au fost realizate prin BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

6.3. Rezultate și discuții

Agenții patogeni identificați în probele de sânge

Probele de sânge analizate (n=66), prezentate în Tabelul 6.2, 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. În studiul realizat de Skotarczak și colab. (2003), *Borrelia burgdorferi* s.l. a fost identificat la 6/15 câini examinați, 4 masculi și 2 femele având vârsta cuprinsă între 1.5 ani și 2 ani. Shaw și colab. (2005) au analizat 120 de probe de sânge canin, detectând la 5/120 specia *Borrelia burgdorferi* s.l. și într-o singură probă, *Anaplasma phagocytophilum*. De asemenea, nu a fost raportată nicio co-infecție. Alți autori, nu au identificat ADN-ul speciei *B. burgdorferi* în sângele câinilor studiați, în schimb au detectat anticorpi împotriva boreliozei la 10.6%, ceea ce indică trecerea prin boală și expunerea anterioară la căpușe (Sonnberger și colab., 2021).

Callister și colab. (2000) au demonstrat prezența speciei *B. burgdorferi* din probe recoltate din piele și articulații la câinii cu șchiopături și febră, iar Bauerfeind și colab. (1998) au detectat ADN-ul *Borrelia burgdorferi* în probele de urină recoltate de la câini.

Într-un alt studiu realizat în Serbia de Filipović și colab. (2018) privind prevalența speciilor *Anaplasma*, *Ehrlichia* și *Babesia* determinată prin PCR, niciun câine nu a fost

pozitiv pentru *Anaplasma* spp. și *Ehrlichia* spp. și doar 16.2% (18/111) au fost pozitivi pentru *Babesia* spp. Frecvența infectărilor identificată de Çetinkaya și colab. (2016) a fost de 6% pentru *E. canis*, 4% pentru *A. phagocytophilum* și 6% pentru *A. platys* iar 25.53% a reprezentat co-infecțiile cu două sau trei specii.

Studiile realizate în România privind prevalența speciilor *Anaplasma*, *Ehrlichia* și *Borrelia* utilizând metode de diagnostic moleculare, au identificat prezența *Anaplasma platys* (Matei și colab., 2017b), *Ehrlichia canis* (Hamel și colab., 2012; Morar și colab., 2015). Majoritatea studiilor din România au utilizat metode serologice pentru identificarea agenților patogeni transmiși de căpușe.

Seroprevalența speciei *Borrelia burgdorferi* s.l. în estul țării, raportată de Răileanu și colab. (2015) a fost 1.1%, în sud-estul țării – 6.52% (Kiss și colab., 2011), în sud – 1.6% (Micu și colab., 2018), iar în vest 4.7% (Ilie și colab., 2011).

Cazan și colab. (2020) au identificat o seroprevalență de 0.6% pentru *Borrelia burgdorferi* s.l. și 3.3% pentru *Anaplasma* spp., iar seroprevalența identificată de Mircean și colab. (2012) a fost 5.5% pentru *Anaplasma phagocytophilum*, 2.1% pentru *Ehrlichia canis* și 0.5% pentru *Borrelia burgdorferi*.

Anghel și colab. (2017) a raportat două co-infecții în urma testării serologice: *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. și *Ehrlichia* spp. + *Borrelia burgdorferi*.

Seroprevalența principalelor boli transmise de căpușe la nivel european, realizată de Miró și colab. (2021) a arătat o prevalență crescută a speciei *Anaplasma* spp. în Bosnia și Herțegovina (21.4%), Cehia (19.3%) și Austria (17.3%), a speciei *Ehrlichia* spp. în Grecia (19.6%), Malta (11.8%) și Rusia (10.9%) și a speciei *Borrelia* spp. în Suedia (13.3%), Lituania (11.8%) și Norvegia (10.2%). În același studiu, anticorpii speciilor investigate au fost identificate și în România cu un procent de 5.9% pentru specia *Anaplasma*, 7% pentru *Ehrlichia* spp. și 0.6% pentru *Borrelia* spp. În Bulgaria, seroprevalența erlichiozei a fost de 30.4% iar a anaplasmozei, 26.1% (Arnaudov, 2021), iar în Ungaria, *A. phagocytophilum* a avut prevalența cea mai crescută (7.9%), urmată de *B. burgdorferi* – 0.4% și *E. canis* – 0.16%. De asemenea, co-infecțiile au fost identificate la 0.61% dintre câini, majoritatea fiind co-infecțati cu doi agenți patogeni, co-infecția cu trei agenți patogeni (*A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* și *D. immitis*) fiind identificată la un singur câine (Farkas și colab., 2014).

Colombo și colab. (2021) a identificat în Italia o prevalență de 9.1% pentru specia *Anaplasma* spp., 1.7% pentru *B. burgdorferi* și 0.4% pentru *Ehrlichia* spp. De asemenea, a constatat faptul că 37.2% dintre câini au fost pozitivi pentru un singur patogen, în timp ce 14% au fost seropozitiv pentru doi sau mai mulți agenți patogeni.

Câinii seropozitivi asimptomatici pot fi infectați cu unul sau mai mulți agenți patogeni, fiind considerați o sursă de infectare pentru vectori. De aceea este importantă testarea câinilor suspecți, pentru a preveni răspândirea bolilor.

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. (Tabelul 6.2). ADN-ul *Candidatus Midichloria mitochondrii* a fost amplificat de primerii utilizați pentru amplificarea speciilor *Anaplasma/Ehrlichia*, fiind identificat după secvențiere, același lucru fiind menționat și de Harrus și colab. (2011) și Papa și colab., 2017.

Tabelul 6.2/Table 6.2

Rezultatele speciilor patogene întâlnite în probele de sânge canin
Results of pathogen species identified in the blood samples from dogs

Nr. probe	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.		<i>Anaplasma</i> spp. / <i>Ehrlichia</i> spp.		<i>Candidatus Midichloria mitochondrii</i>		Co-infecția <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. + <i>Candidatus Midichloria mitochondrii</i>	
66	15	(22.7%)	0	(0%)	2	(3.03%)	2	(3.03%)

Legendă: nr. – număr;

Legend: nr. – number;

Conform Papa și colab., 2017, *Ca. Midichloria mitochondrii* s-a dovedit a fi abundentă în ovare și sistemul traheal al căpușelor *I. ricinus* nourănite, iar în căpușele *Ixodes ricinus* incomplet hrănite, aceasta se găsește în ovare, tubii Malpighi și glandele salivare. Garcia-Vozmediano și colab., 2021 a observat o prevalență ridicată *Ca. Midichloria mitochondrii* în Belgia (77.9%), Italia (68.9%), Olanda (73.6%) și Suedia (62.1%).

În tabelul 6.3 sunt prezentate date privind vârsta și genul câinilor incluși în studiul nostru. Cea mai mare prevalență a fost raportată la categoria de vârstă sub 3 ani, 6/28 (21.4%), urmată de categoria 7-12 ani – 5/19 (26.3%). Anticorpul anti-*Borrelia* au fost identificați la 3.7% dintre câinii incluși în studiul realizat de Micu și colab. (2018), având vârsta între 1-8 ani, rezultate asemănătoare fiind raportate și de alți autori (Mircean și colab., 2012; Kiss și colab., 2011).

Tabelul 6.3/Table 6.3

Prevalența câinilor pozitivi cu *Borrelia burgdorferi* s.l. incluși în studiu
Prevalence of positive dogs with *Borrelia burgdorferi* s.l. included in the study

	Câini pozitivi cu <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	Prevalență (%)
Categorii de vârstă		
< 3 ani	6/28	21.4%
4-7 ani	3/15	20%
7-12 ani	5/19	26.3%
> 12 ani	1/4	25%
Gen		
Masculi	12/41	29.3%
Femele	3/25	12%
Totalul câinilor incluși	15/66	22.7%

Câinii de vânătoare cu vârsta mai mare de 2 ani sunt mai expuși la borelioză decât câinii de vânătoare mai tineri (22%, respectiv 9-11%) (Goossens și colab., 2001).

În ceea ce privește genul, 12/41 (29.3%) de câini infectați cu *Borrelia burgdorferi* s.l. erau masculi și doar 3/25 (12%) erau femele. Acest lucru a fost semnalat și de alți autori (Kiss și colab., 2011; Mircean și colab., 2012; Ilie și colab., 2011; Meyers și colab., 2021). În literatura de specialitate nu există date referitoare la predispoziția masculilor de a se infecta cu specia *Borrelia burgdorferi*.

Agenții patogeni identificați în căpușe

Un total de 99 de căpușe ixodide adulte au fost colectate de la câini în timpul examinărilor clinice (Tabelul 6.4). 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). Aceleași specii de căpușe au fost identificate și în zonele urbane din Nord-Estul Poloniei, așa cum rezultă și din studiul realizat de Michalski și colab. (2020): cele 522 căpușe adulte, colectate de pe 272 câini au fost identificate astfel: 81% au aparținut speciei *Ixodes ricinus* (413 femele, 10 masculi) și 19% *Dermacentor reticulatus* (62 femele, 37 masculi). Cele mai întâlnite specii de căpușe colectate de pe câini, raportate într-un

studiu din Ungaria au fost *Ixodes ricinus* (57%) și *D. reticulatus* (41.2%) (Földvári și colab., 2007).

Andersson și colab. (2018b) a colectat de pe câini dar și alte animale domestice și sălbatice din mai multe regiuni ale României 11 specii de căpușe, cele mai importante fiind: 209 căpușe aparținând speciei *Ixodes ricinus* (149 femele, 39 masculi, 21 nimfe), 119 căpușe din specia *Dermacentor reticulatus* (74 femele, 45 masculi), 314 căpușe ale speciei *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (107 femele, 64 masculi, 143 nimfe).

Tabelul 6.4/Table 6.4

Identificarea probelor cu căpușele recoltate de pe câini
Identification of tick samples collected from dogs

Speciile identificate	Numărul căpușelor incluse în studiu		Stadiu de dezvoltare				Eșant. Pozitive
			Larve	Nimfe	Adulți		
					Masculi	Femele	
<i>Dermacentor reticulatus</i>	51	(51.5%)	0	0	17	34	2
<i>Ixodes ricinus</i>	48	(48.5%)	0	0	16	32	2
TOTAL	99		-	-	33 (33.3%)	66 (66.7%)	4

Legendă: eșant. – eșantion;

Legend: eșant. – pool;

Studiul realizat de Dumitrache și colab. (2015) a vizat stabilirea prevalenței a doi agenți patogeni zoonotici, *Anaplasma phagocytophilum* și *Borrelia burgdorferi* s.l. în căpușele colectate de pe vulpile roșii din mai multe județe ale României, fiind astfel colectate 204 căpușe aparținând speciei *Ixodes ricinus* (5 larve, 15 nimfe, 138 femele și 36 masculi), dintre care doar 4.4% au fost pozitive pentru *A. phagocytophilum*. Vulpile roșii sunt considerate principalul rezervor al speciei *B. burgdorferi* s.l., dar cu toate acestea, nicio probă testată nu a fost pozitivă pentru acest patogen.

Căpușele identificate morfologic au fost distribuite în eșantioane după următoarele criterii: pacient canin, specie, sex și stadiu de dezvoltare. Testul PCR s-a efectuat pentru 3 agenți patogeni iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 6.5. 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%).

Tabelul 6.5/Table 6.5

Rezultatele speciilor patogene și co-infecțiile identificate în eșantioanele cu căpușe
Results of pathogen species and co-infections identified in tick pools

Specii patogene	Eșantioane pozitive/Total eșantioane		Eșantioane în funcție de speciile de căpușe identificate	
			<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	4/31	12.9%	2	2
<i>Anaplasma</i> spp. / <i>Ehrlichia</i> spp.	0/31	0%	0	0
<i>Candidatus</i> <i>Midichloria mitochondrii</i>	8/31	25.8%	6	2
Co-infecția <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. + <i>Candidatus</i> <i>Midichloria mitochondrii</i>	2/31	6.5%	1	1

Boala Lyme rămâne o zoonoză complexă, iar diagnosticul este o provocare (Parry, 2006). Oamenii sunt mai puțin expuși la căpușe decât câinii, totuși în Europa sunt raportate anual aproximativ 85.000 de cazuri de borelioză Lyme la oameni (Valiakos, 2016). În mod similar, într-un studiu publicat de Manciuc și colab. (2019), cazurile de boală Lyme la oameni au început în ultimii ani să scadă. Potrivit aceluiași studiu, în anul 2016 în România au fost raportate 688 de cazuri suspecte, dintre care 4,1% au fost raportate în Iași (Manciuc și colab., 2019).

În 33/34 din studiile europene care au detectat *B. burgdorferi* la căpușele *Ixodes ricinus* folosind tehnici PCR, au demonstrat că această specie este sursa majoră de transmitere a acestui agent patogen pe acest continent, cu o prevalență de 17.7% (Hussain și colab., 2021). Identificarea moleculară a *B. burgdorferi* la căpușele colectate de pe câini a indicat o prevalență de 15% în Danemarca (Stensvold și colab., 2015), 7.9% în Letonia (Namina și colab., 2019) și 0.4% în 64 de provinciile italiene (Zanet și colab., 2020).

Borrelia burgdorferi s.l. a fost detectată în 4 eșantioane: 2 – *Ixodes ricinus* și 2 – *Dermacentor reticulatus*. Michalski și colab. (2020) a detectat ADN-ul *B. burgdorferi* în 35.7% dintre căpușele *Ixodes ricinus* și în 14.1% dintre căpușele speciei *Dermacentor reticulatus* colectate de pe câini din Nord-Estul Poloniei. Studiul realizat de Geurden și colab. (2018) pe 95 de căpușe *Ixodes ricinus* colectate de pe câini din câteva țări europene (Belgia, Ungaria, Franța și Italia), a identificat speciile *A. phagocytophilum* în 14/95 (15%) și *Borrelia* spp. în 1/95 (1%). Un alt studiu a identificat în căpușele *Ixodes ricinus* ADN-ul speciei *Borrelia* în 6.2% (13/209) din probe și cel al speciei *Anaplasma* în 2.9% (6/209) (Zygner și colab., 2008). Földvári și colab. (2007) a detectat ADN-ul *Borrelia* spp. în 6/108 (5.6%) dintre căpușele *Ixodes ricinus*.

La căpușele nehrănite, prevalența speciilor *Borrelia* a fost de 26.35% în Cluj (Borșan și colab., 2021), 25.8% în estul României (Răileanu și colab., 2017), 18.6% în vestul

României (Ilie și colab., 2012). Rezultatele studiului nostru au arătat următoarele: 22.7% dintre câinii pozitivi pentru babesioză au fost co-infecțați cu *B. burgdorferi* și la 12.9% dintre căpușele colectate de pe aceștia, a fost detectat ADN-ul *B. burgdorferi*, prin urmare, municipiul Iași și zonele limitrofe ar putea fi endemice pentru acest patogen. Pentru a stabili endemicitatea acestei zone, sunt necesare studii suplimentare folosind o populație mare de câini pentru screening-ul infecției cu *B. burgdorferi*.

Cel mai întâlnit simbiot al microbiomului căpușelor *Ixodes ricinus* este *Candidatus Midichloria mitochondrii*, o alfa-proteobacterie gram-negativă care aparține ordinului *Rickettsiales* (Comandatore și colab., 2021). Prevalența *Candidatus Midichloria mitochondrii*, simbiotul găsit la căpușe pare a fi mai mare la femele și mai scăzută la masculi (Ahantarig și colab., 2013), similar cu rezultatele studiului de față. *Candidatus Midichloria mitochondrii* a fost identificată în 6 eșantioane de căpușe *Ixodes ricinus* femele și 2 eșantioane de căpușe *Dermacentor reticulatus* femele.

Într-adevăr, s-a demonstrat că prezența *Candidatus Midichloria mitochondrii* este abundentă în diferite tipuri de celule ale ovarului, inclusiv în ovocite (Mariconti și colab., 2012). De asemenea, în studiul publicat de Vozmediano și colab. (2021) privind diversitatea genetică a simbiotilor *Rickettsiella* la căpușele *Ixodes ricinus* din Europa, *Candidatus Midichloria mitochondrii* a fost raportată în Suedia (62.1%), Regatul Unit (48.7%), Germania (36.4%), Țările de Jos (73.6%), Belgia (77.9%) și Italia (68.9%). Un alt studiu a confirmat co-infecția cu *Borrelia burgdorferi* și *Candidatus Midichloria mitochondrii* la căpușe, cea mai mare prevalență fiind raportată în Germania (100%), urmată de Italia (86.3%), Suedia (61%), Belgia (20.7%), Țările de Jos. (15.5%) și Regatul Unit (13.5%) (Garcia-Vozmediano și colab., 2021).

Paduraru și colab. (2012) au demonstrat prezența ADN-ului *Candidatus Midichloria mitochondrii* în 30/147 căpușe *Ixodes ricinus* colectate de la caprioare și capre din partea de Est a României (Galați și Bacău) (Paduraru și colab., 2012).

6.4. Concluzii parțiale

Rezultatele acestui studiu au arătat importanța identificării co-infecțiilor la câinii infestați cu căpușe și necesitatea unei monitorizări sporite a protocoalelor de prevenire a infestațiilor cu căpușe la câini.

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), iar datele noastre se referă la un număr redus de probe.

Prima raportare a simbiotului *Candidatus Midichloria mitochondrii* în sângele câinilor dar și în căpușele colectate de pe aceștia, confirmă prezența acestuia, necesitând astfel investigații suplimentare pentru a înțelege mai bine rolul și posibilele implicații asupra animalelor și a sănătății publice.

Prezența boreliilor la câinii confirmați cu babesioză într-un procent de 22.7%, precum și identificarea bacteriilor la căpușe (12.9%), întărește starea de alertă necesară autorităților de sănătate publică cu privire la riscul apariției acestei boli zoonotice. Co-infecțiile ar putea complica diagnosticul și ar trebui studiate în continuare la animalele de companie.

Rezultatele aferente acestui studiu au fost prezentate în lucrarea intitulată ”*Detection of the co-infections with Borrelia, Anaplasma and Ehrlichia species in dogs with babesiosis in north-eastern Romania*”, autori: Gabriela Martinescu, Lavinia Ciucă, Constantin Roman, Dumitru Acatrinei, Larisa Ivănescu, Olimpia Iacob, Maria Paola Maurelli, Liviu Dan Miron, 2022, **acceptată pentru publicare** în Revista Română de Medicină Veterinară.

CAPITOLUL 7: CORELAȚII PRIVIND SEMNELE CLINICE, METODELE DE DIAGNOSTIC ȘI TRATAMENTUL ÎN INFESTAȚIA CU *BABESIA CANIS*

CHAPTER 7: CORRELATIONS REGARDING CLINICAL SIGNS, DIAGNOSIS AND TREATMENT IN CANINE BABESIOSIS

7.1. Introducere

Bolile transmise de vectori includ mai multe tipuri de agenți patogeni (bacterii, paraziți, viruși) care cauzează o varietate de probleme de sănătate câinilor (Irwin P.J., 2014). În România, una dintre cele mai importante boli transmise prin intermediul vectorilor este babesioza. Babesioza canină este cauzată de un protozoar din genul *Babesia*, transmis prin multe specii de căpușe (Grey și colab., 2019). Există mai multe specii de babesie, diferite din punct de vedere genetic: mari, unde merozoiții măsoară între 3-5 μm (*Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*) și mici, unde merozoiții măsoară între 1.5-2.5 μm (*Babesia conradae*, *Babesia gibsoni*, *Babesia microti*-like) (Imre și colab., 2013a; Tudor și colab., 2008).

Dermacentor reticulatus și *Ixodes ricinus* sunt speciile de căpușe incriminate pentru dezvoltarea bolii în partea de Est a României. Creșterea răspândirii vectorilor artropode la nivel global, precum și asocierea bolilor transmise de vectori canini pot fi explicate prin modificarea factorilor climatici și ecologici dar și prin creșterea mobilității oamenilor și animalelor, determinând astfel răspândirea globală a boli transmise de vectori canini (Andersson și colab., 2017a).

Bolile vectoriale sunt considerate adevărate provocări pentru medicii veterinari, deoarece semnele clinice pot fi uneori difuze sau suprapuse cu alți agenți patogeni transportați de vectori (Andersson și colab., 2017a; Gray și colab., 2019). Diagnosticul de babesioză la câini se bazează pe coroborarea anamnezei, semnelor clinice (mucoase palide, hemoglobinurie, hipertermie, icter) și identificarea paraziților intraeritrocitari în frotiurile de sânge citologice (Ionita și colab., 2012).

7.2. Materiale și metodă

Acest studiu a inclus 42 de câini suspectați de babesioză pe baza anamnezei și a semnelor clinice, prezentați în cadrul clinicilor Facultății de Medicină Veterinară Iași.

După examinarea clinică generală a pacienților și transcrierea anamnezei și a istoricului medical, s-au recoltat câte două probe de sânge periferic (EDTA și fără anticoagulant) de la fiecare pacient 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).

Recoltarea sângelui s-a efectuat în două moduri pentru a evidenția hemoparaziții: în tuburi vacutainer, din venele periferice (brahicefalice, safene sau jugulare) sau din circulația capilară (din nas), ultima metodă de recoltare putând fi utilizată doar pentru realizarea frotiurilor de sânge).

Pentru identificarea microorganismelor prezente în interiorul hematiilor, s-au realizat frotiuri de sânge subțiri: se pune o picătură de sânge la capătul unei lame de sticlă, așezată pe o suprafață plană. Această lamă este fixată cu o mână iar a doua lamă de sticlă se plasează pe prima lamă la un unghi de aproximativ 30°, în fața picăturii de sânge. Cea de-a doua lamă se glisează spre picătura de sânge, se așteaptă ca sângele să ajungă în capetele lamei, iar printr-o mișcare rapidă, lama încărcată se glisează înainte.

Grosimea frotiului este influențată de vâscozitatea probei de sânge. Unghiul de trasare dintre cele două lame poate fi mărit atunci când sângele are un hematocrit scăzut, sau poate fi scăzut în cazul în care sângele este mai vâscos (hematocritul este crescut), pentru a putea realiza un frotiu de sânge adecvat.

Imediat după etalare, frotiurile de sânge s-au uscat la temperatura camerei (Harvey, 2001).

Frotiurile au fost colorate imediat după uscare și fixare, pentru a reduce riscul modificării eritrocitelor. Pentru colorare, s-a folosit kitul rapid Diff-Quick (Hemacolor, Merck, Germany) conform instrucțiunilor producătorului, pentru identificarea merozoizilor. Colorația Romanowsky (Wright, Wright-Giemsa, Diff-Quick) este frecvent utilizată. Green (2012) consideră că utilizarea colorației Giemsa are ca avantaj suplimentar posibilitatea examinării îndelungate a preparatelor, în timp ce frotiurile colorate prin metoda Wright se vor estompa în timp.

Kitul de colorare utilizat, Diff-Quick, este format din: soluția pentru fixare – metanol, reagent colorare roșu – eozina, reagent colorare albastru – tiazină.

După confirmarea diagnosticului, cele două probe de sânge recoltate (cu anticoagulant și fără anticoagulant) au fost analizate pentru a determina gradul și tipul anemiei, precum și pentru verificarea funcției renale și hepatice, frecvent raportate în babesioza canină. Acești indicatori sunt foarte importanți pentru ajustarea protocolului terapeutic în vederea recuperării pacienților. Pentru realizarea hemoleucogramei, s-a utilizat analizatorul VetScan HM5 (Abaxis) din cadrul Laboratorului Clinic și al departamentului de Fiziologie, iar pentru examenul biochimic sangvin, analizatorul VetScan VS2 (Abaxis) din cadrul Laboratorului Clinic al Facultății de Medicină Veterinară, Iași.

Serul a fost, de asemenea, folosit pentru a verifica posibile co-infecții, adesea găsite în bolile transmise de căpușe canine. Prin urmare, am ales să folosim testul SNAP 4DX Plus (IDEXX) (Figura 7.1 (a)), pentru identificarea a 4 posibili agenți patogeni: *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*/*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* și *Dirofilaria immitis*, în timp ce pentru depistarea *Babesia gibsoni* am utilizat testul ce identifică anticorpii *Babesia gibsoni* (WellTest), (Figura 7.1 (b)). Ambele teste rapide au fost utilizate conform instrucțiunilor producătorilor.

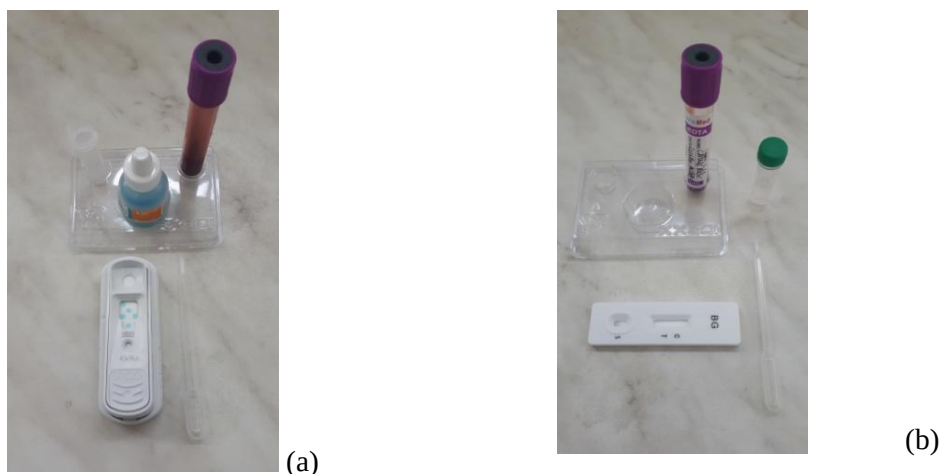


Figura 7.1 Teste rapide: (a) Kit SNAP 4DX PLUS; (b) Kit *Babesia gibsoni*-anticorpi.
Figure 7.1 Rapid tests: (a) SNAP 4DX PLUS kit; (b) *Babesia gibsoni*-antibodies kit.

7.3. Rezultate și discuții

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 pechinezi – 11.9% (5/42) iar rasele Husky, Ciobănesc German și Ciobănesc Caucazian – 7.14% (3/42). Într-un studiu realizat de Adaszek și colab. (2011), cele mai afectate rase de câini au fost Ciobănesc german, Setter și Staffordshire terrier american. Câinii ce aparțin rasei Setter sunt considerați câini de vânatoare, fiind mai predispuși expunerii la căpușe, însă unii autori consideră că în cazul celorlalte rase, babesioza canină nu are predispoziție de rasă. De asemenea, Máthé și colab. (2006) a constatat forma complicată a babesiozei la câinii Rottweiler (78%), comparativ cu celelalte rase, fiind speculată predispoziția acestei rase la infestația cu *Babesia* spp. (Collet, 2000).

Veneziano și colab. (2018) consideră că rasele de câini cu păr lung sunt mai susceptibile la infestările cu căpușe, acestea fiind mai greu de identificat și îndepărtat. În România, Imre și colab. (2013b) au identificat o prevalență crescută a babesiozei la câinii de vânatoare (44.1%) comparativ cu câinii de companie (12.3%) sau cei din adăposturi (16.3%).

Câinii se pot infesta cu *Babesia* spp. indiferent de vârstă. În tabelul 7.1 se poate observa faptul că diferențele dintre numărul de cazuri și categoriile de vârstă sunt mici, rezultate asemănătoare fiind raportate și în studiul realizat de Imre și colab. (2013b), în vestul României. Autorii unui studiu realizat în Ungaria, consideră că specia *Babesia canis canis* poate infesta câinii de orice vârstă, câinii tineri fiind mai predispuși la dezvoltarea unei anemii mai severe, spre deosebire de câinii adulți, iar câinii geriatrici sunt mai predispuși la dezvoltarea complicațiilor (Máthé și colab., 2006).

În ceea ce privește genul câinilor, numărul infestărilor la masculi a fost mai mare (66.66%), comparativ cu infestările la femele (33.34%). Rezultatele publicate de Rene-Martellet și colab. (2013) au fost asemănătoare celor obținute în acest studiu, constatând faptul că masculii (62%) au fost mai afectați decât femelele (38%) iar câinii tineri (0-5 ani) au fost cei mai expuși infestărilor cu *Babesia canis*. De asemenea, Adaszek și colab. (2011) și Máthé și colab. (2006) au raportat un număr crescut de infestări cu babesioză canină la masculi, menționând că nu există studii care să demonstreze faptul că masculii sunt mai sensibili la infestația cu *Babesia canis*, iar această diferență observată poate fi atribuită numărului crescut de câini masculi care trăiesc predominant în libertate, aceștia fiind cei mai expuși riscului de infestare (Máthé și colab., 2006).

Tabelul 7.1/Table 7.1

Prevalența cazurilor pozitive a babesiozei canine în raport cu rasa, vârsta și genul
Prevalence of positive cases of canine babesiosis in relation to breed, age and sex

	Nr. Cazurilor pozitive/Nr. Total de câini	%
Rasă		
Mixtă/comună	17/42	40.48%
Husky	3/42	7.14%
Pechinez	5/42	11.9%
Labrador	1/42	2.38%
Shar-pei	1/42	2.38%
Setter englez	1/42	2.38%
Ciobănesc caucazian	3/42	7.14%
Samoyed	2/42	4.76%
Bichon	2/42	4.76%
Akita Inu	2/42	4.76%
Yorkshire terrier	1/42	2.38%
Ciobănesc german	3/42	7.14%
Ciobănesc de berna	1/42	2.38%
Vârsta		
0-1 an	7/42	16.7%
1-5 ani	12/42	28.6%
5-7 ani	11/42	26.2%
7-15 ani	12/42	28.6%

	Nr. Cazurilor pozitive/Nr. Total de câini	%
Gen		
Femele	14/42	33.34%
Masculi	28/42	66.66%

Legendă: nr. – număr;

Legend: nr. – number;

Prezentarea clasică a babesiozei canine se asociază cu sindrom febril (hipertermie bruscă, marcată, cel puțin 40°C; anorexie, letargie), sindrom hemolitic (anemie, hemoglobinurie) (Bourdoiseau, 2006) dar și icter, splenomegalie, colaps (Köster și colab., 2015). De asemenea, babesioza canină mai poate fi clasificată și în funcție de prezentarea clinică, astfel: forma necomplicată și forma complicată (Ayoob și colab., 2010).

Conform datelor obținute din anamneza raportată în Tabelul 7.2, am constatat că 76.19% (32/42) dintre câinii participanți la studiu nu au fost deparazitați extern conform recomandărilor medicilor veterinari. Lipsa de conștientizare a proprietarilor prin amânarea deparazitării externe, duce la o creștere a cazurilor de boli transmise prin vectori, care pot fi fatale în unele situații.

Tabelul 7.2/Table 7.2

Informații obținute de la proprietari (anamneza)
Information obtained from the owners (anamnesis)

	Numărul de câini pozitivi/Numărul total de câini	%
Câini fără deparazitare externă	32/42	76.19%
Apatie	37/42	88.1%
Inapetență	35/42	83.3%
Urină închisă la culoare (hemoglobinurie)	31/42	73.8%
Capușe găsite pe corpul câinilor sau observate de proprietar și îndepărtate	28/42	66.7%
Vomă	18/42	19.05%
Probleme locomotorii	5/42	11.9%
Câini fără istoric medical	10/42	23.81%

Seroprevalența infestației cu *Babesia canis* în vestul României a fost crescută în zonele rurale (28.4%) comparativ cu zonele urbane (15.4%), acest lucru putând fi corelat cu

profilaxia inadecvată cu substanțe acaricide a câinilor (Imre și colab., 2013a). Într-un studiu realizat pe două grupuri de câini deparazitați extern regulat cu produse acaricide spot-on 38/218, respectiv 14/226 au dezvoltat babesioza (Adaszek și colab., 2011).

Dintre pacienții incluși în acest studiu, 88.1% dintre câini au fost consultați pentru apatie, 83.3% pentru lipsă de poftă de mâncare și 73.8% pentru prezența urinei închise la culoare (hemoglobinurie). Cele mai frecvente date obținute din anamneză și în urma consultului clinic realizate de Máthé și colab. (2006), au fost: febra (84%), letargia (78%), căpușe găsite de proprietar sau de medicul veterinar (75%), hemoglobinurie (63%), anorexie (56%), mucoase palide (31%), icter (28%) și vomă (25%).

Examenul clinic este foarte important pentru un diagnostic precis. Semnele clinice în babesioza canină nu sunt constant specifice, dar datele obținute din anamneză, coroborate cu examenul clinic și examenul citologic al sângelui sunt suficiente pentru diagnostic.

În babesioză, principalele semne clinice ale formei necomplicate sunt reprezentate de: letargie, depresie, febră, mucoase palide, icter (Figura 7.3), hemoglobinurie, splenomegalie, hepatomegalie (Ayoob și colab., 2010). 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%) (Figura 7.2). Semnele clinice identificate în studiul realizat de Strobl și colab. (2020) au fost reprezentate de: anorexie (85.4%), letargie (57.9%), mucoase palide (30%), icter (15.4%).

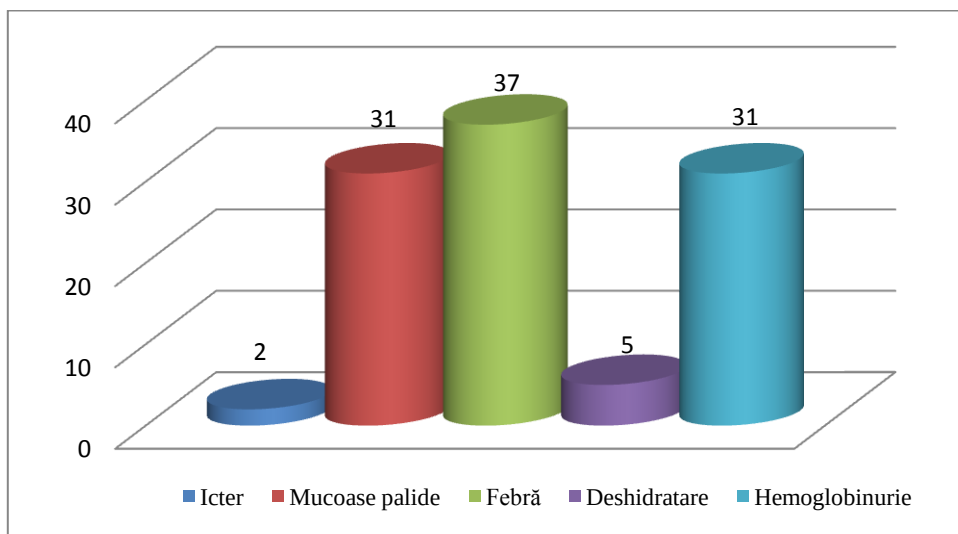


Figura 7.2 Reprezentare grafică a semnelor clinice predominante întâlnite în babesioza canină
Figure 7.2 Graphic representation of the predominant clinical signs in canine babesiosis



Figura 7.3 Icter generalizat, câine, femelă, metis ciobănesc

Figure 7.3 Jaundice, dog, female, mixed shepherd

Examenul morfologic al frotiurilor de sânge este cea mai rapidă metodă de diagnostic. De asemenea, este adesea folosită datorită costului scăzut. Pentru a confirma infestarea parazitară cu specii mici de *Babesia* spp. (*Babesia gibsoni*, *Babesia microti*) diagnosticul de certitudine este dat numai prin folosirea tehnicilor de biologie moleculară. 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* (Figura 7.4).

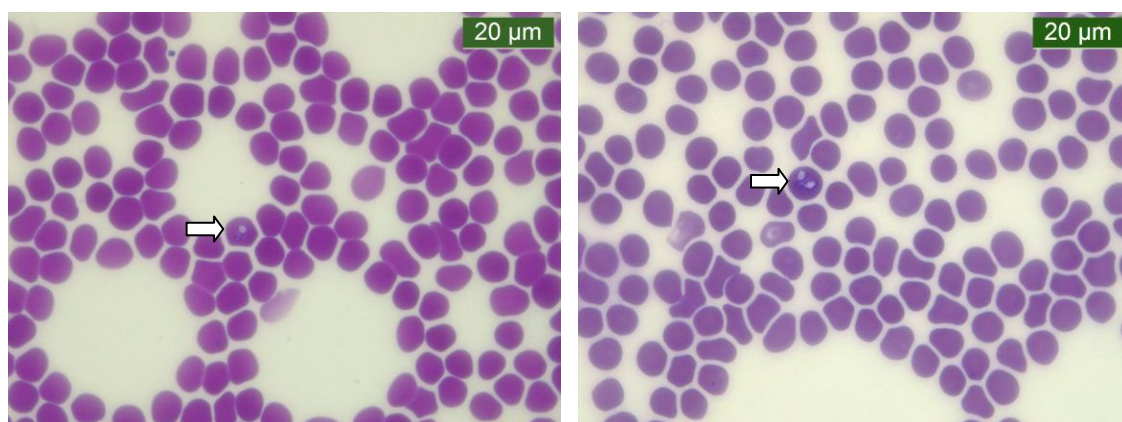


Figura 7.4 *Babesia canis* – identificare morfologică, colorație rapidă Diff-Quick, x1000

Figure 7.4 *Babesia canis* – morphological examination, Diff-Quick rapid coloration, x1000

În literatura de specialitate, principalele modificări hematologice identificate în evoluția babesiozei canine sunt descrise ca anemie moderată, normocromă și normocitară (datorită hemolizei) și trombocitopenie (Fabisiak și colab., 2009; Scheepers și colab., 2011; Strobl și colab., 2020). Pe măsură ce boala evoluează, anemia devine macrocitară, hipocromă și regenerativă (Furlanello și colab., 2005; Kirtz și colab., 2012). Aceste aspecte pot fi observate și în cazul câinilor studiați, prezentați în Tabelul 7.3, unde 71.43% (30/42) dintre pacienții canini aveau un număr scăzut de hematii, iar 80.85% (34/42) aveau hematocritul sub limitele normale. În cazul pacienților cu hemoconcentrație, prognosticul este rezervat (Furlanello și colab., 2005). La pacienții cu valori hematologice în limite normale, gradul de parazitemie a fost scăzut, iar semnele clinice au fost instabile.

Tabelul 7.3/Table 7.3

Rezultatele analizelor de sânge hematologice
Results of haematology tests

Parametru	Număr de probe analizate	Valori scăzute	Valori normale	Valori crescute	Valori de referință	Unitate de măsură
WBC	42	22 (52.38%)	16 (38.1%)	4 (9.52%)	6-17	10 ⁹ /l
LYM	42	19 (45.24%)	22 (52.38%)	1 (2.38%)	1-4.8	10 ⁹ /l
MON	42	11 (26.19%)	31 (73.81%)	0 (0%)	0.2-1.5	10 ⁹ /l
NEU	42	12 (28.57%)	27 (64.29%)	3 (7.14%)	3-12	10 ⁹ /l
EOS	42	0 (0%)	32 (76.19%)	10 (23.81%)	0-0.8	10 ⁹ /l
BAS	42	0 (0%)	42 (100%)	0 (0%)	0-0.4	10 ⁹ /l
RBC	42	30 (71.43%)	11 (26.19%)	1 (2.38%)	5.5-8.5	10 ⁹ /l
HGB	42	25 (59.52%)	15 (35.72%)	2 (4.76%)	12-18	g/dl
HCT	42	34 (80.95%)	8 (19.05%)	0 (0%)	37-55	%
MCV	42	7 (16.67%)	35 (83.33%)	0 (0%)	60-77	fl
MCH	42	2 (4.76%)	28 (66.67%)	12 (28.57%)	19.5-24.5	Pg
PLT	42	40 (95.24%)	2 (4.76%)	0 (0%)	165-500	10 ⁹ /l

Legendă: WBC – leucocite; LYM – limfocite; MON – monocite; NEU – neutrofile; EOS – eozinofile; BAS – bazofile; RBC – hematii; HGB – hemoglobină; HCT – hematocrit; MCV – volum eritrocitar mediu; MCH – hemoglobină eritrocitară medie; PLT – trombocite;

Legend: WBC – leukocyte; LYM – lymphocyte; MON – monocyte; NEU – neutrophil; EOS – eosinophile; BAS – basophile; RBC – red blood cells; HGB – hemoglobin; HCT – hematocrit; MCV – mean corpuscular volume; MCH – mean corpuscular hemoglobin; PLT – platelet;

Trombocitopenia este frecvent constatată (Furlanello și colab., 2005), indiferent de subspecia implicată (Lobetti, 2003), fiind severă în faza acută a bolii; numărul trombocitelor cresc în aproximativ o săptămână după instituirea tratamentului, prin urmare, unii autori consideră implicarea mecanismelor mediat imune în recuperarea rapidă a trombocitelor (Köster și colab., 2015). În studiile realizate de Furlanello și colab. (2005), Zygnier și colab. (2007), Fabisiak și colab. (2009) dar și în acest studiu, trombocitopenia a fost raportată la 99.5%, 97.7%, respectiv 95.24% (40/42 câini). Cu toate acestea, niciun câine nu a prezentat semne de hemoragie, fapt constatat și de Strobl și colab. (2020). Mai multe studii demonstrează că sângerarea spontană nu este o complicație frecvent întâlnită la câinii infestați cu babesioză în Europa, presupunând că modificările timpilor de coagulare și trombocitopenia nu sunt relevante din punct de vedere clinic în cazul infestațiilor cu *Babesia canis* (Furlanello și colab., 2005; Solano-Gallego și colab., 2011; Strobl și colab., 2020).

Unii autori consideră că există posibilitatea ca în unele cazuri, anemia să fie mascată de deshidratare (Furlanello și colab., 2005). De asemenea, s-a observat că la pacienții incluși în studiu, MCH a avut valori mai crescute decât limitele normale la 28.57% din cazuri (12/42). Acest lucru este adesea raportat la câinii cu babesioză, deoarece valorile crescute ale MCH sunt rezultate din hemoliză (Fabisiak și colab., 2009).

Leucopenia este asociată cu sindromul inflamator sistemic (Strobl și colab., 2020), scăderea acestora poate fi consecința sechestrării lor în splină (Máthé și colab., 2006). 52.38% dintre pacienții evaluați au prezentat leucopenie iar 38.1% au avut valori situate între limitele normale. Valori asemănătoare au fost obținute și de Máthé și colab. (2006): 60% dintre pacienții pozitivi cu *Babesia canis* au dezvoltat leucopenie.

Nivelurile ridicate ale ureei serice sunt frecvent identificate la câinii infestați cu babesioză, având cauze creșterea catabolismului proteic datorită producției de uree apărute consecutiv hemoragiilor gastro-intestinale, fie datorită sindromului febril (Reyers, 1992; Lobetti și colab., 2001). Valorile crescute a transaminazelor și scăderea nivelului de albumină sugerează afectarea hepatică și renală, de tipul hepatitei centrolobulare cu hipoxie hepatică (Green, 2006; Reddy și colab., 2016). Analizând rezultatele biochimice sangvine, am constatat valori crescute ale parametrilor renali (BUN – 57.14%; 24/42), enzimelor hepatice (GGT – 59.52%; 25/42), fosfatazei alcaline (69.05%; 29/42) și ale bilirubinei totale (52.38%; 22/42). De asemenea, Tabelul 7.4 prezintă valori normale ale creatininei (CRE – 76.19%; 32/42) sau alanin aminotransferazei (ALT – 59.52%; 25/42), care au dus la o recuperare mai rapidă a pacienților după administrarea de imizol.

Tabelul 7.4/Table 7.4

Rezultatele analizelor de sânge biochimice
Blood biochemistry tests results

Parametru	Număr de probe analizate	Valori scăzute	Valori normale	Valori crescute	Valori de referință	Unitate de măsură
ALP	42	0 (0%)	13 (30.95%)	29 (69.05%)	20-150	U/L
ALT	42	0 (0%)	25 (59.52%)	17 (40.48%)	10-118	U/L
TBIL	42	0 (0%)	20 (47.62%)	22 (52.38%)	0.1-0.6	mg/dL
BUN	42	2 (4.76%)	16 (38.1%)	24 (57.14%)	7-25	mg/dL
CRE	42	0 (0%)	32 (76.19%)	10 (23.81%)	0.3-1.4	mg/dL
TP	42	17 (40.48%)	25 (59.52%)	0 (0%)	5.4-8.2	g/dL
GLOB	42	20 (47.62%)	21 (50%)	1 (2.38%)	2.3-5.2	g/dL
GLU	42	0 (0%)	19 (45.24%)	23 (54.76%)	60-110	mg/dL
GGT	42	5 (11.90%)	12 (28.57%)	25 (59.52%)	0-7	U/L

Legendă: ALP – fosfataza alcalină; ALT – alaninaminotransferază; TBIL – bilirubina totală; BUN – urea nitrogen; CRE – creatinină; TP – proteine totale; GLOB – globulină; GLU – glucoza serică; GGT – Gama-glutamyltransferază;

Legend: ALP – alkaline phosphatase; ALT – alanine aminotransferase; TBIL – total bilirubin; BUN – urea nitrogen; CRE – creatinine; TP – total protein; GLOB – globulin; GLU – serum glucose; GGT – Gamma-glutamyltransferase;

În formele complicate, valorile ureei și creatininei pot crește indicând scăderea perfuziei renale ca rezultat al scăderii tensiunii arteriale, scăderea funcției miocardice și/sau hipovolemie (Köster și colab., 2015). Hipoxia tisulară, hipotensiunea sistemică și hemoglobinuria afectează rinichii reversibil, ducând la hiperfosfatemie și creșterea valorilor ureei și creatininei (Strobl și colab., 2020). Concluzionăm faptul că o creștere a creatininei serice de la 3.0 mg/dL la 5.0 mg/dL determină o scădere a ratei de supraviețuire de la 80% la 40%, iar peste 6.0 mg/dL, rata de supraviețuire este sub 20%, așa după cum menționează și Strobl și colab. (2020).

Kules și colab. (2018) consideră mai potrivit termenul de disfuncție renală în cazul pacienților cu babesioză, decât cel de insuficiență renală acută. Disfuncția renală este rezultatul unei leziuni glomerulare și a unei leziuni tubulare proximale.

Hiperglicemia este cauzată cel mai adesea de creșterea mobilizării glucozei și stres, dar poate fi semnificativ crescută și datorită creșterii secreției de cortizol (Mizock , 1995; Keller și colab., 2004). În contextul unei patologii precum babesioza, hiperglicemia nu este o constatare surprinzătoare (Keller și colab., 2004), lucru identificat și în acest studiu, unde 54.76% dintre pacienți au avut valori crescute ale glucozei.

Jacobson (2006), Máthé și colab. (2006), Goddard și colab. (2013) și Strobl și colab. (2020) au exemplificat criteriile utilizate pentru definirea formei complicate a babesiozei canine (sindromul inflamator sistemic și sindromul de disfuncție multiplă de organe): disfuncția renală (insuficiența renală acută) – nivelul creatininei serice este crescut, în ciuda terapiei cu fluide; pancreatita – enzimele pancreatice crescute (amilaza, lipaza) asociate cu modificări ecografice în regiunea pancreatică, abdomen acut și vomă; hepatopatiile – cel puțin două enzime hepatice crescute sau dublarea valorii enzimei ALT; sindromul inflamator sistemic – prezența a cel puțin trei dintre următoarele modificări: temperatură rectală anormală $>39,2^{\circ}\text{C}$ sau $<37,8^{\circ}\text{C}$, frecvența cardiacă >140 bătăi/minut, frecvența respiratorie >40 respirații/minut, număr de leucocite crescut (leucocitoză); forma cerebrală a babesiozei – semne neurologice observate pentru prima dată în timpul evoluției clinice a babesiozei ce nu și-au revenit după terapia specifică, fiind excluși câinii cu istoric de epilepsie sau cei la care valorile glicemiei erau scăzute. Goddard și colab. (2013) consideră că toate semnele neurologice care nu pot fi atribuite niciunei alte patologii sunt cauza formei cerebrale a babesiozei; sindromul de detresă respiratorie acută – dispnee, sunete respiratorii modificate (raluri crepitante), modificări la examenul radiologic al pulmonilor; anemie hemolitică autoimună – test Coombs pozitiv, sferocitoză, autoaglutinare în asociere cu valorarea hematocritului scăzută sau în scădere; anemia hemolitică autoimună este exclusă dacă pacientul s-a recuperat fără terapia imunosupresoare; sindromul de disfuncție multiplă de organe – prezența a cel puțin două dintre următoarele complicații: insuficiență renală acută, hepatopatie, pancreatită, forma cerebrală a babesiozei, anemie hemolitică autoimună.

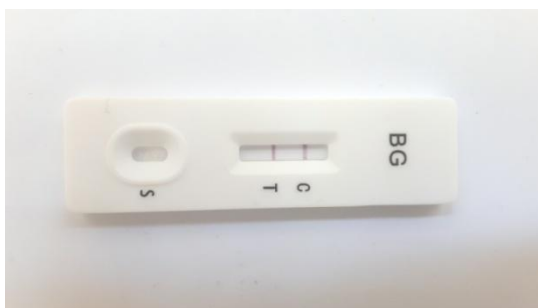


Figura 7.5 Test *Babesia gibsoni*-anticorpi – pozitiv
Figure 7.5 *Babesia gibsoni*-antibodies Test – positive

Cele 42 de probe de ser au fost analizate folosind testele rapide SNAP 4DX (IDEXX) și *Babesia gibsoni*-anticorpi (WellTest) pentru a identifica posibile co-infecții cu alți agenți patogeni transmiși prin căpușe. Coroborând rezultatele testelor serologice, am constatat prezența anticorpilor *Babesia gibsoni* în 2/42 probe de sânge (Figura 7.5) și 0/42 probe pozitive pentru infecțiile cu *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. sau *Borrelia* spp.

Protocolul terapeutic

Principală terapie a babesiozei cuprinde medicamente antiprotozoarice, antimicrobiene și terapie de susținere (Ayoob și colab., 2010). Majoritatea studiilor realizate în Europa care descriu tratamentele infestațiilor cu *Babesia* spp. la câini, au utilizat în principal imidocarb dipropionat (Matjila și colab., 2005; Bajer și colab., 2014; Kalinowski și colab., 2015; Eichenberger și colab., 2016; Leica și colab., 2017), această substanță activă fiind recomandată și în ghidurile ESCCAP (*European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*) pentru controlul bolilor vectoriale (Baneth, 2018).

Toți pacienții diagnosticați cu babesioză canină au urmat următorul protocol terapeutic, după ce am primit acordul scris al proprietarilor:

- ☞ Rehidratare cu clorură de sodiu (NaCl), în funcție de gradul de deshidratare;
- ☞ Administrare de *sulfat de atropină* (Atropină sulfurică 1%), în doză de 0.1-0.2 ml și așteptare 10 minute sau *hemisuccinat de hidroclorid*;
- ☞ Administrarea de Imidocarb dipropionat (Imizol) în doză de 6.6 mg/kg (Baneth, 2018);
- ☞ Suplimente nutritive, vitamine.

O doză de imidocarb dipropionat 5–6.6 mg/kg în prima zi și în ziua 14 elimină semnele clinice (Penzhorn și colab., 1995; Ayoob și colab., 2010), fiind dovedit și un efect de protecție post-terapie de până la 6 săptămâni (Vercammen și colab., 1997). De asemenea, în forma acută și necomplicată a babesiozei canine, răspunsul terapeutic este rapid, constatându-se o creștere a producției de hematii noi în 12-24 ore de la administrarea imidocarb dipropionatului (Vial și colab., 2006).

Pacienții au fost monitorizați 30 de minute, pentru limitarea altor reacții adverse. Cele mai întâlnite reacții adverse, sunt cele parasimpatice după administrarea de imidocarb dipropionat (Imizol), fiind reprezentate de: sialoree, vărsături, slăbiciune generală, tremurături musculare, tahicardie, dispnee (Ayoob și colab., 2010). Aceste simptome pot fi prevenite prin administrarea unei doze de sulfat de atropină. Kock și colab. (1991) a raportat un supradozaj de imidocarb la un câine, rezultând necroză hepatică și moarte.

În funcție de rezultatele analizelor biochimice de sânge, doza terapeutică de imizol a fost administrată într-o singură doză sau în două doze divizate, administrată în maximum 12 ore.

Doza terapeutică fracționată a fost administrată numai în anumite cazuri: pacienți geriatrici, insuficiență hepatică sau renală, gestație sau pacienți cu patologii cronice.

O alternativă terapeutică a cazurilor rezistente sau recidivante a infestațiilor cu *Babesia canis* este clindamicina, asociată cu metronidazol și doxiciclina, însă eficacitatea acestor produse a fost puțin studiată. Baneth (2018) recomandă utilizarea combinației clindamicină (30mg/kg la interval de 12 ore), diminazen aceturat (3.5mg/kg intramuscular, o singură administrare) și imidocarb dipropionat (6mg/kg subcutanat, o singură administrare) pentru tratarea infestației cu specia *Babesia gibsoni* rezistentă la terapia cu atovaquone.

Îmbunătățirea stării generale a pacienților pozitivi cu babesioză are loc de obicei în 24-72 de ore, dar unii câini se pot vindeca în 4-7 zile. De aceea, este recomandat să se efectuează monitorizarea continuă a parametrilor hematologici până când aceștia revin la limitele normale.

La câinii infestați cu *Babesia gibsoni*, testele PCR trebuie efectuate la un interval de 60-90 de zile după tratamentul cu atovaquone și azitromicină, după cum menționează și Irwin (2014).

În cazul formei complicate a babesiozei, pe lângă terapia specifică este nevoie de o terapie de susținere care constă în administrarea de fluide esențială pentru menținerea volumului sangvin dar și de a corecta anomalile acido-bazice și electrolitice (Green, 2006).

Transfuzia de sânge este recomandată pacienților cu anemie severă, cu valoarea hematocritului sub 20% și care prezintă semne clinice asociate anemiei: tahicardie, tahipnee, slăbiciune, puls slab și valori crescute ale lactatului (Ayoob și colab., 2010). Strobl și colab. (2020) a realizat transfuzie de sânge pacienților cu hematocrit mai mic de 15%. Toți pacienții incluși în acest studiu, nu s-au încadrat în limitele pentru a fi supuși transfuziei sangvine.

Tabelul 7.5/Table 7.5

Formule de calcul utilizate în transfuzia sangvină

Calculation formulas used in blood transfusion

SÂNGE INTEGRAL:

$$\text{Volumul de sânge necesar} = k \times \text{greutatea animalului (kg)} \times \frac{\text{HCT dorit} - \text{HCT actual}}{\text{HCT donatorului}}$$

Constanta "k" = 90 în cazul câinilor

60 în cazul pisicilor

sau

$$\text{Volumul de sânge necesar} = (\text{HCT dorit} - \text{HCT actual}) \times \text{greutatea animalului (kg)} \times 2\text{ml}$$

Rata de transfuzie: 0,25-1 ml/kg/h în primele 20 minute, după se poate crește la 3-4 ml /kg/h

CONCENTRAT ERITROCITAR:

10 ml/kg de concentrat eritrocitar va crește HCT primitorului cu aproximativ 10%

Legendă: HCT – hematocrit; kg – kilograme; ml – mililitru; h – oră;

Legend: HCT – hematocrit; kg – kilograms; ml – milliliter; h – hour;

Referințe: Day, 2016; <https://veterinaryjournalist.ro/totul-despre-transfuzia-de-sange-la-animalele-de-companie/>;

References: Day, 2016; <https://veterinaryjournalist.ro/totul-despre-transfuzia-de-sange-la-animalele-de-companie/>;

Volumul de sânge necesar a fost calculat utilizând una din formulele menționate în Tabelul 7.5, fiind necesare: greutatea pacientului, valoarea hematocritului actual, valoarea hematocritului dorit, precum și valoarea hematocritului donatorului.

Tratamentul instituit de Leica și colab. (2017) câinilor cu babesioză s-a bazat pe două obiective principale: stabilizarea pacienților și administrarea tratamentului specific (imidocarb dipropionat) în momentul optim al statusului clinic. Pentru stabilizarea pacienților, a folosit: fluideo-terapie (clorură de sodiu 0,9% doză 10-20 ml/kg – rehidratare, corectarea electroliților; glucoză 5% doză 5ml/kg – suport energetic; ringer lactat, doză 5 ml/kg – acidoză metabolică sau uremie; dumphalyte, doză 5ml/kg – complex de vitamine și aminoacizi), antipiretice (metamizol sodiu, doză 50mg/kg), antivomitice (maropitant, doză 1mg/kg/zi; metoclopramid, doză 0.2-0.5mg/kg administrat la 6-8 ore) și hepatoprotectoare (silimarină – conform prospectului).

Strobl și colab. (2020) a utilizat un plan terapeutic asemănător, concentrându-se pe stabilizarea pacienților și tratarea simptomelor, adaptând tratamentul în funcție de fiecare pacient: fluideo-terapie (soluție Ringer sau Ringer Lactat), protectoare gastrice (omeprazol, doză 1mg/kg), antivomitice (maropitant, doză 1mg/kg; ondansetron, doză 0.1-0.5 mg/kg), analgezice (tramadol, doză 2-4 mg/kg; buprenorfină, doză 10-20 mg/kg).

7.4. Concluzii parțiale

Studiul a fost realizat pe un lot de 42 de pacienți canini suspectați de babesioză, care au fost consultați în Clinicile de Boli Parazitare și Medicină Internă din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași. Cei mai afectați câini dintre cei studiați au fost cei de rasă comună sau mixtă – 40.48%, urmați de pechinezi – 11.9%, indiferent de vârstă. Cele mai frecvente semne clinice au fost: febră – 37/42 (88.1%), mucoase palide – 31/42 (73.8%) și hemoglobinurie – 31/42 (73.8%).

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.

În funcție de rezultatele analizelor biochimice sangvine, doza terapeutică de imizol a fost administrată în doză unică sau fracționată în două doze, administrate într-un interval de maxim 12h.

Acest studiu s-a încheiat prin publicarea în Scientific Papers Journal - Veterinary Series Iasi, unui articol intitulat: *"Correlations regarding the diagnosis and the optimal therapeutic protocol in canine babesiosis"*, autori: Gabriela MARTINESCU, Lavinia CIUCĂ, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Andrei LUPU, Larisa IVĂNESCU, Dumitru ACATRINEI, Olimpia IACOB, Liviu MIRON, 2021.

CAPITOLUL 8: PREVALENȚA INFESTAȚIEI CU CĂPUȘE LA CÂINI

CHAPTER 8: PREVALENCE OF TICK INFESTATION IN DOGS

8.1. Introducere

Animalele de companie joacă un rol important în răspândirea speciilor de căpușe autohtone și transmiterea agenților patogeni la alte animale și om (Buczek și colab., 2021). De obicei, câinii sunt infestați de căpușele adulte (Földvari și colab., 2005; Dutto și colab., 2009), mai puțin de nimfe (Földvari și colab., 2005; Dutto și colab., 2009; Estrada-Peña și colab., 2017) și sporadic de larve (Dutto și colab., 2009; Hansford și colab., 2016; Manilla, 1998; Kumsa și colab., 2011; Saleh și colab., 2019). Cele mai frecvente zone infestate de căpușe sunt capul (zona urechilor, ochii și botul), picioarele și gâtul (Dutto și colab., 2009; Lorusso și colab., 2010; Wright și colab., 2018), iar frecvența atașării căpușelor este asociată cu rasa și temperamentul câinilor (Lorusso și colab., 2010).

Căpușele care se atașează de câini diferă în funcție de activitatea sezonieră a speciilor implicate. Aceste modele de activitate sunt susținute de studii anterioare, în care a fost examinată activitatea sezonieră a căpușelor colectate de pe gazde sau din habitatele naturale (Lengauer și colab., 2006; Dautel și colab., 2008; Kohn și colab., 2011; Cull și colab., 2017).

Infestarea câinilor cu căpușe, în special cu specia *Dermacentor reticulatus*, a crescut în ultimii ani în anumite părți ale Europei (Heile și colab., 2006; Beck și colab., 2014). Iernile mai calde dar și sezoanele prelungite de toamnă și primăvară, determină extinderea distribuției de căpușe la altitudini crescute dar și în latitudinea nordică (Beugnet și colab., 2013; Dantas-Torres, 2015). *D. reticulatus* poate fi activă în lunile ianuarie și februarie, la scurt timp după dispariția stratului de zăpadă (Karbowiak, 2014).

Dermacentor reticulatus apare în areale caracterizate prin tipuri variate de climă, vegetație și o mare disponibilitate a potențialelor gazde, prezentând prin urmare, o plasticitate ecologică și adaptabilitate ridicată la condițiile periodice adverse (Zajac și colab., 2020). Această specie a fost identificată în vestul Siberiei precum și în stepele Ucrainei și a Rusiei a continentului european, unde clima temperată se caracterizează prin valori extrem de crescute ale temperaturii anuale și precipitații anuale scăzute (Rubel și colab., 2016; Miller, 2019).

Cull și colab. (2018) consideră că specia *Ixodes ricinus* urmează un model sezonier similar în fiecare an, deși poate exista o variație a maximului de activitate în lunile mai, iunie și iulie, în funcție de an. De asemenea, autorii au mai fost observată o creștere a activității în lunile de toamnă.

Modelele spațio-temporale predictive privind abundența căpușelor pot fi importante pentru a reduce incidența bolilor transmise de căpușe (Hartemink și colab., 2015; Sgroi și colab., 2021). De asemenea, relația dintre temperatură și stadiile de dezvoltare a căpușelor nu este liniară (Hollingsworth și colab., 2015).

Scopul acestui studiu a fost de a determina prevalența infestațiilor cu căpușe colectate de la pacienții canini, pentru a evalua o posibilă schimbare a perioadelor de activitate a speciilor.

8.2. Materiale și metodă

Studiul a fost realizat în perioada 2017-2021 în cadrul Clinicii de Boli Parazitare și a Departamentului de Urgențe a Facultății de Medicină Veterinară Iași. În această perioadă au fost examinați 411 câini de diferite rase, cu vârsta cuprinsă între 2 luni și 18 ani, ce s-au prezentat pentru diverse investigații paraclinice.

După realizarea examenului clinic general, am constatat prezența căpușelor atașate la un număr de 189 de pacienți canini (45.99%). Au fost îndepărtate cu ajutorul unor dispozitive speciale un număr de 435 căpușe, ce au fost puse individual în funcție de animal în tuburi eppendorf (2ml–5 ml), în alcool etilic cu concentrația 70% și numerotate, până la identificarea morfologică.

Identificarea morfologică s-a realizat în două etape: în cadrul Departamentului de Boli Parazitare a Facultății de Medicină Veterinară Iași și în Departamentul de Medicină Veterinară și Producție Animală din Napoli, Italia, utilizând chei taxonomice standard (Estrada-Pena și colab., 2004; Dantes-Torres și colab., 2013), precum și stereomicroscoapele Leica M250c (Figura 8.1) și Zeiss Stemi 305 (Figura 8.2).

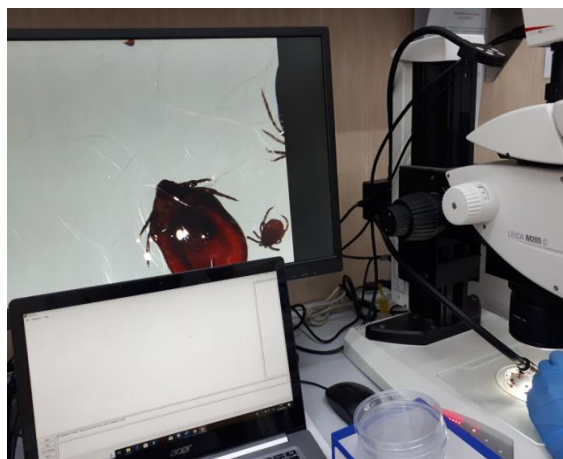


Figura 8.1 – Stereomicroscop Leica M250c

Figure 8.1 – Leica M250c stereomicroscope



Figura 8.2 – Stereomicroscop
Zeiss Stemi 305

Figure 8.2 – Zeiss Stemi 305
stereomicroscope

O parte dintre căpușele identificate ($n = 182$ – capitolul 5; $n = 99$ – capitolul 6) au fost utilizate pentru detecția unor agenți patogeni, rezultate prezentate în capitolele anterioare.

8.3. Rezultate și discuții

În urma centralizării datelor, în perioada 2017-2021 au fost examinați 411 câini de rase și vârste diferite, fiind identificate un număr de 435 căpușe pe 189 de câini (45.99%), în urma examenului clinic general (Figura 8.3).

Căpușele colectate au fost predominant adulte (99.54%), cu statusul de hrănire diferit. Acest aspect a fost observat și de alți autori (Földvari și colab., 2005; Eichenberger și colab., 2015; Dumitrache și colab., 2014), unde peste 90% dintre căpușele colectate de pe câini au fost adulte. Explicația acestor rezultate fiind dat de imposibilitatea observării macroscopice a nimfelor și larvelor în timpul examinării clinice.

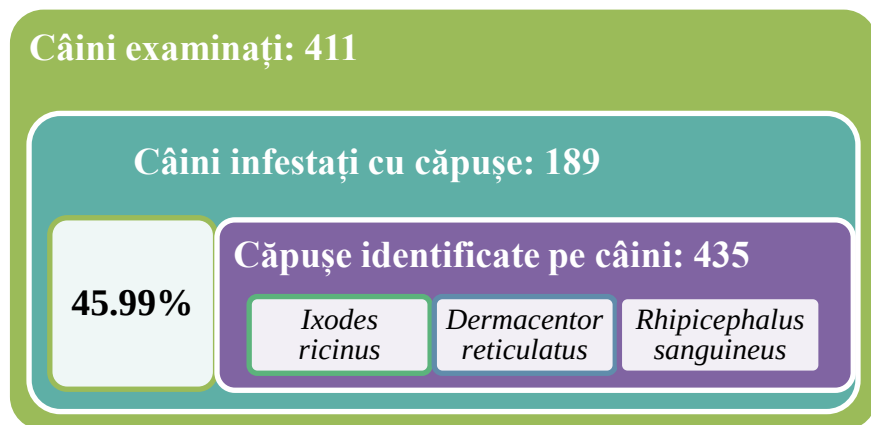


Figura 8.3 Structura studiului

Figure 8.3 Study design

Morfologic, am identificat trei specii de căpușe, expuse și în Figura 8.4: *Ixodes ricinus* (41.6%; 181/435), *Dermacentor reticulatus* (57.7%; 251/435) și *Rhipicephalus sanguineus* complex (0.69%; 3/435).

Câinii pot fi infestați cu extrem de multe specii de căpușe. Un astfel de exemplu este raportat în Rusia, unde Livanova și colab. (2018) au detectat 11 specii de căpușe, din patru genuri: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* și *Haemaphysalis*.

În sud-estul României, Dumitrache și colab. (2014) au identificat șase specii de căpușe atașate pe câini: cea mai frecventă specie a fost *R. rossicus* (95.6%), urmată de specia *D. reticulatus* (3.2%), *I. ricinus* (0.5%), *H. marginatum* (0.3%), *R. sanguineus* s.l. (0.2%) și *I. crenulatus* (0.1%).

În zonele endemice din Europa centrală, *Dermacentor reticulatus* prezintă o frecvență comparabilă cu *Ixodes ricinus* la câini: 45% din căpușe în Germania (Beck și colab., 2014) și 49% din căpușe în Ungaria (Földvari și colab., 2005). *Rhipicephalus sanguineus* a avut o prevalență de 0.1% în studiul lui Beck și colab. (2014), valoare apropiată cu cea raportată în studiul prezent.

Căpușele ce aparțin genurilor *Ixodes* și *Rhipicephalus* sunt cele mai răspândite în Italia, conform Maurelli și colab. (2018). Autorii studiului au identificat o prevalență a speciei *Rhipicephalus sanguineus* de 27.5% la câinii din Nordul Italiei și 36.1% la cei din regiunile centrale și sudice, în timp ce prevalența speciei *Ixodes ricinus* a fost de 25.6% în regiunile din Nordul Italiei și doar 10.8% la câinii din centrul și Sudul țării. Doar câțiva câini au fost infestați cu specia *Dermacentor* spp. (0.6%).

Abdullah și colab. (2016) au realizat un studiu privind speciile de căpușe ce infestază câinii în Regatul Unit al Marii Britanii, identificând la câinii care nu au părăsit țara în ultimele două săptămâni speciile: *Ixodes ricinus* (89.2%), *Ixodes hexagonus* (9.8%), *Ixodes canisuga* (0.78%), *Haemaphysalis punctata* (0.05%) și *Dermacentor reticulatus* (0.17%). Câinii ce au părăsit țara în ultimele două săptămâni au fost infestați cu una din următoarele specii: *Ixodes ricinus* (67.4%), *Dermacentor variabilis* (2.3%) și *Rhipicephalus sanguineus* (30.2%), amplificând astfel îngrijorările privind importul de căpușe prin intermediul animalelor de companie care călătoresc în zone endemice.

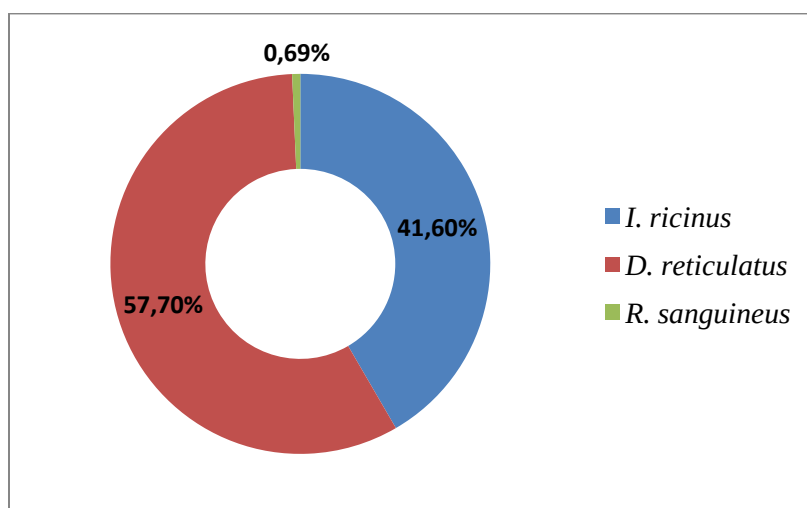


Figura 8.4 Reprezentare grafică a speciilor de căpușe identificate morfologic
Figure 8.4 Graphical representation of morphologically identified tick species

Răileanu și colab. (2018) au colectat căpușe din 13 puncte distribuite în zona urbană Iași, identificând trei specii de căpușe: *Ixodes ricinus* cu o prevalență de 95.3%, *Haemaphysalis punctata* – 3.9% și *Dermacentor reticulatus* – 0.8%. Rezultate asemănătoare au constatat și Pavel și colab. (2014), prevalența speciei *Ixodes ricinus* fiind cea mai crescută (92.39%), urmată de *Haemaphysalis punctata* (6.94%) și *Dermacentor reticulatus* (0.59%).

Conform rezultatelor obținute, relatate în Figura 8.5, *Dermacentor reticulatus* a fost specia 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). Duscher

și colab. (2013) a observat aceeași frecvență a activității speciei, primăvara și toamna târziu. De asemenea, în acest studiu am constatat 2 exemplare *D. reticulatus* masculi, în luna ianuarie, în afara perioadei normale de activitate.

Rezultate asemănătoare au fost publicate și în studiul realizat de Mierzejewska și colab. (2015): masculii speciei *D. reticulatus* au constituit majoritatea căpușelor colectate de pe câini în timpul iernii, iar Dautel și colab. (2008) au colectat câteva căpușe adulte nehrănite de pe vegetație, în lunile ianuarie și februarie.

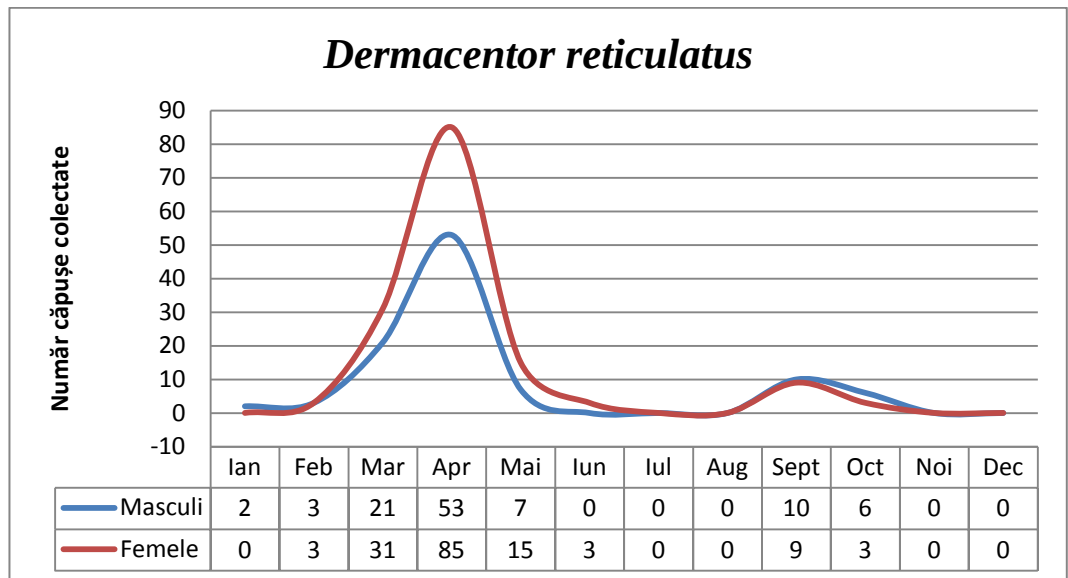


Figura 8.5 Prevalența speciei *Dermacentor reticulatus*

Figure 8.5 Prevalence of *Dermacentor reticulatus* species

Cea mai comună specie de căpușe identificată la câinii din Rusia a fost speciei *Dermacentor reticulatus*, cu o prevalență de 40.7%, urmată de speciile *Ixodes ricinus* (12.1%) și *R. sanguineus* (11.3%) (Livanova și colab., 2018).

Ixodes ricinus este mai activ decât *D. reticulatus* din aprilie până în octombrie, iar *Dermacentor reticulatus* a fost mai frecvent identificat decât *I. ricinus* din ianuarie până în martie, și din septembrie până în noiembrie (Beck și colab., 2014), aceste date fiind în concordanță și cu rezultatele studiului nostru.

Conform studiului realizat de Pavel și colab. (2014) în Iași, activitatea sezonieră a căpușelor nehrănite, a prezentat un model bimodal, cu vârfuri ale activității primăvara și toamna, astfel: *Dermacentor reticulatus* a înregistrat primul vârf în martie, scăzând următoarele luni și încetând activitatea pe timpul verii iar specia *Ixodes ricinus* a prezentat activitate maximă în lunile aprilie și mai.

Activitatea speciei *Ixodes ricinus* identificată în studiul nostru, prezintă trei vârfuri de activitate, cu un trend descendent în lunile mai reci (Figura 8.6). Astfel, cea mai intensă

perioadă este identificată în lunile de primăvară (martie, aprilie), urmată de o scădere în luna mai. Al doilea vârf este constatat în luna iunie iar cel de-al treilea, în lunile septembrie și octombrie. În general, *Ixodes ricinus* este absent în lunile de iarnă (Mierzejewska și colab., 2015), dar accidental, se poate observa prezența acestor specii și în lunile cu temperaturi scăzute, așa cum am identificat și noi în acest studiu, o singură căpușă în luna ianuarie.

În zona urbană a municipiului Cluj, activitatea larvelor *Ixodes ricinus* este unimodală, începând cu luna mai, în timp ce nimfele și adulții prezintă o activitate bimodală, observându-se o activitate crescută din aprilie până în iunie (Borșan și colab., 2020).

Rezultatele obținute de Földvari și colab. (2005), *Ixodes ricinus* și *Dermacentor reticulatus* au fost active tot timpul anului, cu excepția lunilor iulie și decembrie. În studiul realizat în Nord-Estul Germaniei, Beck și colab. (2014) au constatat faptul că *Ixodes ricinus* poate fi găsit pe tot parcursul anului, cu excepția lunii ianuarie, iar specia *D. reticulatus* nu prezintă activitate în luna iulie.

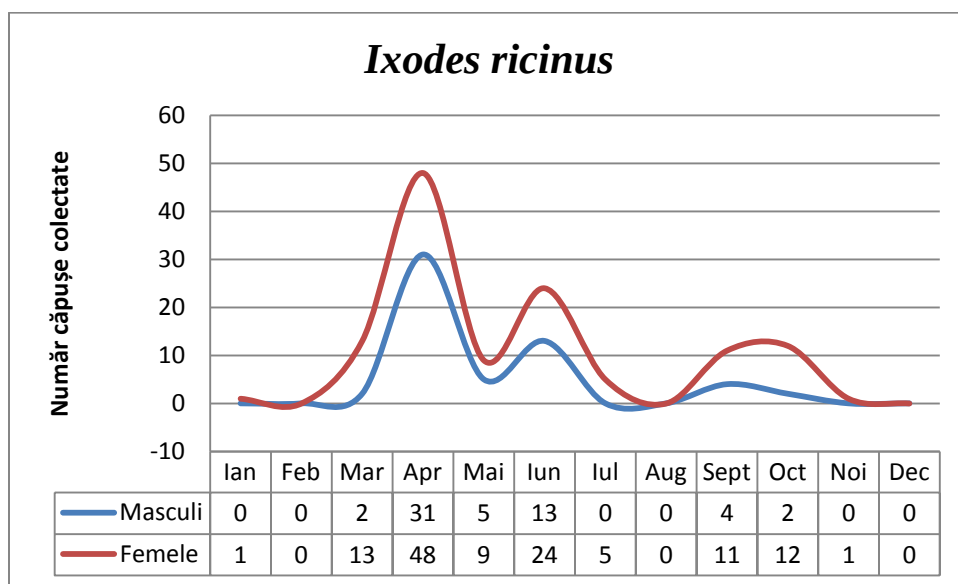


Figura 8.6 Prevalența speciei *Ixodes ricinus*
Figure 8.6 Prevalence of *Ixodes ricinus* species

R. sanguineus este o specie des întâlnită în regiunea mediteraneană, este importată frecvent prin intermediul câinilor în țări din Nordul sau centrul Europei: Marea Britanie (Jameson și colab., 2010; Tulloch și colab., 2017; Gillingham și colab., 2020), Germania (Menn și colab., 2010; Röhrig și colab., 2011; Schäfer și colab., 2019) Olanda, Danemarca, Elveția (Buczek și colab., 2021), Belgia (Claerebout și colab., 2013). Mai puțin frecvent, această specie poate fi transferată și din alte țări endemice, de exemplu, Republica Dominicană (Dongus și colab., 1996) sau Sudan (Buczek și colab., 2021).

Studiul prezent a identificat o prevalență redusă a speciei *Rhipicephalus sanguineus* complex, de doar 0.69% din totalul căpușelor colectate de pe câini, astfel: o larvă colectată în luna aprilie, o nimfă și o femelă în luna mai, conform Tabelului 8.1.

Maurelli și colab. (2018) au observat un vârf de infestare al căpușelor *Rhipicephalus sanguineus* în timpul primăverii și verii, fiind colectate de pe câini în toate lunile anului. În Ucraina, *R. sanguineus* a fost identificată la câinii de pe coasta Mării Negre și a Mării Azov, ocazional a mai fost raportată la pisici și vulpi (Nebogatkin, 2013; Rogovskyy și colab., 2017).

În Albania, prevalența speciei *R. sanguineus* identificată la câini a fost 8.1%, iar cea a speciei *Ixodes ricinus* de doar 0.8% (Shukullari și colab., 2017).

Rhipicephalus sanguineus s.l. a fost identificată la câinii din Spania cu cea mai crescută prevalență (53%), urmată de specia *Dermacentor reticulatus* (9%), *Ixodes ricinus* (9%) și *I. hexagonus* (4%). Adulții speciei *R. sanguineus* au fost observați tot timpul anului, însă vârful maxim al activității a fost în perioada martie-iulie (Estrada-Peña și colab., 2017).

Tabelul 8.1/Table 8.1

Prevalența speciei *Rhipicephalus sanguineus* complex colectate de la câini
Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* complex species collected from dogs

Specia identificată	Stadiu	Ianuarie	Februarie	Martie	Aprilie	Mai	Iunie	Iulie	August	Septembri	Octombrie	Noiembrie	Decembrie	Total
<i>R. sanguineus</i> complex	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	N	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	L	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	3

Legendă: M – masculi; F – femele; N – nimfe; L – larve;

Legend: M – male; F – female; N – nymfs; L – larvae;

Intensitatea infestărilor cu căpușe variază între una și 78 căpușe/câine (Földvari și colab., 2005).

Consecutiv examenului clinic al pacienților, am constatat faptul că cei mai mulți pacienți canini – 41.2% (78/189) erau infestați cu o singură căpușă, 23.3% (44/189) au fost infestați cu două căpușe iar 20.6% (39/189) cu trei căpușe. De asemenea, la 2/189 (1.1%) dintre pacienți am identificat infestații crescute, cu mai mult de zece căpușe, așa cum reiese din datele prezenate în Tabelul 8.2. Dumitrache și colab. (2014) a identificat o prevalență mai mare a infestărilor cu o singură specie, aceasta fiind de 92.3%.

Cea mai mare infestație cu căpușe observată de Eichenberger și colab. (2015) a fost de 49 căpușe pe un câine, ce aparțineau speciei *Ixodes ricinus*, însă 55.6% dintre câinii incluși în studiu au fost infestați cu o singură căpușă.

Tabelul 8.2/Table 8.2

Prevalența căpușelor colectate de pe câini în urma examinării clinice
Prevalence of collected ticks from dogs after clinical examination

Nr. căpușelor prezente pe câine	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10
Luna										
Ian.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Feb.	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Mar.	14	9	5	2	1	0	1	0	0	0
Apr.	34	17	16	8	5	1	0	1	0	2
Mai	4	2	3	0	1	1	0	0	0	0
Iun.	6	5	3	2	0	0	1	0	0	0
Iul.	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Aug.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sept.	5	6	4	0	1	0	0	0	0	0
Oct.	6	3	2	0	1	0	0	0	0	0
Noi.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dec.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	78	44	39	12	9	2	2	1	0	2

Legendă: nr. – număr; ian. – ianuarie; feb. – februarie; mar. – martie; apr. – aprilie; iun. – iunie; iul. – iulie; aug. – august; sept. – septembrie; oct. – octombrie; noi. – noiembrie; dec. – decembrie;

Legend: nr. – number; ian. – January; feb. – February; mar. – March; apr. – April; iun. – June; iul. – July; aug. – August; sept. – September; oct. – October; noi. – November; dec. – December;

În urma identificării căpușelor am observat faptul că la 111/189 (58.7%) pacienții de pe care am colectat mai mult de două căpușe, am întâlnit ambele specii (*Ixodes ricinus* + *Dermacentor reticulatus*) la 20.7% (23/111) câini sau doar o specie, astfel: *Ixodes ricinus* – 32/111 (28.8%) și *Dermacentor reticulatus* – 56/111 (50.5%), date prezentate în Tabelul 8.3.

Beck și colab. (2014) a observat o singură specie de căpușe la 52.2% câini, două specii de căpușe la 33.9% și trei specii la 13.9%. Infestații mixte au mai fost constatate și de Maurelli și colab. (2018) la 24 câini.

Infestarea câinilor cu o singură specie, fie *Ixodes ricinus*, fie cu *Dermacentor reticulatus* a fost observată la 46.8%, respectiv 38.7% dintre câini, iar infestarea mixtă determinată de aceste două specii a fost observată la 7.7% dintre câini (Földvari și colab., 2005), valori mai scăzute spre deosebire de rezultatele obținute în studiul nostru.

Co-infestarea cu speciile *Ixodes ricinus* și *Dermacentor reticulatus* a fost identificată la 8/249 câini într-un studiu realizat în Elveția (Eichenberger și colab., 2015).

În România, Dumitrache și colab. (2014) au observat cinci co-infestări la câini cu două specii de căpușe (*R. rossicus* + *D. reticulatus*; *D. reticulatus* + *I. ricinus*; *R. rossicus* + *R. sanguineus* s.l.) și două co-infestări cu trei specii de căpușe (*R. rossicus* + *D. reticulatus* + *I. ricinus*; *R. rossicus* + *R. sanguineus* s.l. + *H. marginatum*).

Tabelul 8.3/Table 8.3

Prevalența infestațiilor și a co-infestațiilor cu căpușe la câini
Prevalence of tick infestations and co-infestations in dogs

Specii identificate pe un singur pacient	Număr/Procent	
<i>Ixodes ricinus</i>	32	(28.8%)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	56	(50.5%)
<i>Ixodes ricinus</i> și <i>Dermacentor reticulatus</i>	23	(20.7%)
TOTAL	111/189	(58.7%)

În Europa, rolul câinilor în transmiterea speciilor de căpușe autohtone și exotice a fost investigată de Germania (Abdullah și colab., 2016; Hansford și colab., 2016), Suedia (Jaenson și colab., 2012), Elveția (Eichenberger și colab., 2015), Ungaria (Földvari și colab., 2005; Földvári și colab., 2007), Cipru (Tsatsaris și colab., 2016), Spania (Estrada-Peña și colab., 2017) și Portugalia (Dantas-Torres și colab., 2017). Oamenii pot de asemenea să fie gazdele unor specii de căpușe, consecutiv călătoriilor în țări exotice, aducând astfel specii noi (Gillingham și colab., 2020).

Viitorul climei planetei este incert pe termen lung, prin urmare impactul schimbărilor climatice asupra biodiversității și asupra bolilor transmise de căpușe este imprevizibil. Unele cauze și consecințe ale climei pot varia în timp și spațiu, unele fiind reversibile (Dantas-Torres, 2015).

Aria geografică a multor specii de căpușe depinde în principal de biologia și ecologia speciilor specifice, precum și de factorii biotici și abiotici, deoarece fiecare specie are condiții de mediu și biotopuri preferate care determină distribuția geografică a acestora și în consecință, delimitarea zonele de risc pentru bolile transmise de căpușe (Dutto și colab., 2009).

Relația dintre temperatură și stadiile de dezvoltare a căpușelor nu este liniară (Hollingsworth și colab., 2015). Temperatura și umiditatea relativă afectează rata căpușelor de căutare a gazdelor precum și cele de supraviețuire (Lindgren și colab., 2006 ; Ruiz-Fons și colab., 2012).

În pădurile urbane din Nordul Europei, dinamica populației de larve și nimfe aparținând speciei *Ixodes ricinus* sunt strâns legate, existând date în literatura de specialitate privind activitatea sincronă, sugerând astfel o abundență mai mare de căpușe și în consecință, un risc mai mare de agenți patogeni ce pot infecta oamenii și animalele domestice (Cayol și colab., 2017).

Comportamentul uman este, de asemenea, un factor determinant al protecției mediului, al sănătății umane și animalelor, având drept exemplu evitarea habitatelor infestate cu căpușe de către oameni ce ar putea schimba modelul de risc de transmitere al bolilor (Dantas-Torres, 2015).

Zonele urbane și sub-urbane sunt tot mai frecvent afectate de expansiunea vectorilor (Grochowska și colab., 2020; Oechslin și colab., 2017) datorită intervențiilor asupra mediului. Totuși, zonele verzi din interiorul sau din jurul orașelor exercită un efect pozitiv asupra calității vieții și a sănătății umane (Cetin, 2015). Pandemia cu COVID-19 a arătat necesitatea de a face orașele mai locuibile, dar și pericolul interacțiunii strânse cu speciile de animale sălbatice, crescând astfel riscul expunerii la diverși agenți patogeni (Bellato și colab., 2021).

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 medicii veterinari.

8.4. Concluzii parțiale

Căpușele colectate de pe câini au fost predominant 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.

Toate căpușele din acest studiu se hrăneau în timpul colectării, prin urmare, posibilitatea de a transmite agenți patogeni gazdei a fost unul crescut și demonstrat în capitolele anterioare, fiind un indiciu al patogenilor prezenți în comunitatea locală.

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%).

Prevalența crescută a speciei *Dermacentor reticulatus* la câini explică numeroasele cazuri de babesioză canină raportate în zona municipiului Iași iar identificarea speciei *Rhipicephalus sanguineus* complex în această zona, întărește ideea de a continua investigațiile pentru a identifica rolul patogen asupra oamenilor și animalelor.

CAPITOLUL 9: CONCLUZII FINALE

CHAPTER 9: FINAL CONCLUSIONS

Studiul a relevat prima identificare a speciei *B. rossi* la doi câini simptomatici din România, deși sunt necesare studii suplimentare pentru a confirma prezența acestui agent patogen și a vectorului său în Europa și România și pentru a investiga competența vectorului a speciilor de căpușe care ar putea acționa ca vectori pentru acest agent patogen.

Studiul nostru a demonstrat, de asemenea, o prevalență ridicată a *B. canis* și o prevalență scăzută a *B. vogeli* la câini și la căpușele acestora în partea de Est a României; prin urmare, caracterizarea genetică a speciilor *Babesia* ar putea ajuta practicienii să aleagă testele și tratamentele adecvate și pentru înțelegerea riscurilor de infecție, știind că *B. canis* este considerat mai patogen decât *B. vogeli*. Mai mult, putem sublinia încă o dată importanța caracterizării moleculare a speciilor *Babesia* și a patogenității asociate la câini, susținută și de date care relevă prima descriere a unei noi specii de piroplasmid, *Babesia negevi* n. sp., la un câine cu o boală fatală în Sudul Israelului (Baneth și colab., 2020b) și, recent și în Iordania (Far și colab., 2021).

Rezultatele celui de-al doilea studiu au arătat importanța identificării co-infecțiilor la câinii infestați cu căpușe și necesitatea unei monitorizări sporite a protocoalelor de prevenire a infestațiilor cu căpușe la câini.

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), iar datele noastre se referă la un număr redus de probe.

Prima raportare a simbiotului *Candidatus Midichloria mitochondrii* în sângele câinilor dar și în căpușele colectate de pe aceștia, confirmă prezența acestuia, necesitând astfel investigații suplimentare pentru a înțelege mai bine rolul și posibilele implicații asupra animalelor și a sănătății publice.

Prezența boreliilor la câinii confirmați cu babesioză într-un procent de 22.7%, precum și identificarea bacteriilor la căpușe (12.9%), întărește starea de alertă necesară autorităților de sănătate publică cu privire la riscul apariției acestei boli zoonotice. Co-infecțiile ar putea complica diagnosticul și ar trebui studiate în continuare la animalele de companie.

Al treilea studiu a fost realizat pe un lot de 42 de pacienți canini suspecți de babesioză, consultați în Clinicile de Boli Parazitare și Medicină Internă din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași. Cei mai afectați câini dintre cei studiați au fost cei de rasă comună sau mixtă – 40.48%, urmați de pechinezi – 11.9%, indiferent de vârstă. Cele mai frecvente semne clinice au fost: febră – 37/42 (88.1%), mucoase palide – 31/42 (73.8%) și hemoglobinurie – 31/42 (73.8%).

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.

În funcție de rezultatele analizelor biochimice sangvine, doza terapeutică de imizol a fost administrată în doză unică sau fracționată în două doze, administrate într-un interval de maxim 12h.

În ultimul studiu, căpușele colectate de pe câini au fost predominant 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.

Toate căpușele din acest studiu se hrăneau în timpul colectării, prin urmare, posibilitatea de a transmite agenți patogeni gazdei a fost unul crescut și demonstrat anterior, fiind un indiciu al patogenilor prezenți în comunitatea locală.

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%).

Prevalența crescută a speciei *Dermacentor reticulatus* la câini explică numeroasele cazuri de babesioza canină raportate în zona municipiului Iași iar identificarea speciei *Rhipicephalus sanguineus* complex în această zonă, întărește ideea de a continua investigațiile pentru a identifica rolul patogen asupra oamenilor și animalelor.

BIBLIOGRAFIE

REFERENCES

1. Abdullah, S., Helps, C., Tasker, S., Newbury, H., & Wall, R., 2016 – *Ticks infesting domestic dogs in the UK: a large-scale surveillance programme*. Parasites & Vectors, 9(1), 1-9.
2. Adaszek, Ł., Martinez, A. C., & Winiarczyk, S., 2011 – *The factors affecting the distribution of babesiosis in dogs in Poland*. Veterinary parasitology, 181(2-4), 160-165.
3. Ahantarig, A., Trinachartvanit, W., Baimai, V., & Grubhoffer, L., 2013 – *Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens)*. Folia microbiologica, 58(5), 419-428.
4. Aiello, S. E., Moses, M. A., & Allen, D. G. (Eds.), 2016 – *The Merck veterinary manual* (p. 3325). Merck & Company, Incorporated.
5. Aktas, M., 2014 – *A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens*. Veterinary parasitology, 200(3-4), 276-283.
6. Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A., 2008 – *Biology of ticks*. Infectious disease clinics of North America, 22(2), 195-215.
7. Andersson, M. O. et al., 2017b – *Babesia, Theileria, and Hepatozoon species in ticks infesting animal hosts in Romania*. Parasitology research, 116(8), 2291-2297.
8. Andersson, M. O. et al., 2018b – *Molecular survey of neglected bacterial pathogens reveals an abundant diversity of species and genotypes in ticks collected from animal hosts across Romania*. Parasites & vectors, 11(1), 1-10.
9. Andersson, M. O., Radbea, G., Frangoulidis, D., Tomaso, H., Rubel, F., Nava, S., & Chitimia-Dobler, L., 2018a – *New records and host associations of the tick Ixodes apronophorus and the first detection of Ehrlichia sp. HF in Romania*. Parasitology research, 117(4), 1285-1289.
10. Andersson, M. O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Waldenström, J., Dobler, G., & Chițimia-Dobler, L., 2017a – *Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania*. Parasites & vectors, 10(1), 1-6.
11. Andersson, M., Turcitu, M. A., Stefanache, M., Tamba, P., Barbuceanu, F., & Chitimia, L., 2013 – *First evidence of Anaplasma platys and Hepatozoon canis co-infection in a dog from Romania—a case report*. Ticks and tick-borne diseases, 4(4), 317-319.
12. Angelescu, A., 2004 – *The golden jackal: origin, morphoanatomy, eco-etholgy, management*. Bucharest: Editura MMC.

13. Anghel, R. G., Mitrea, I. L., & Ioniță, M., 2017 – *Clinico-pathological findings in vector-borne pathogen co-infections in dogs, from Bucharest area*. Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine, 63(1), 45-49.
14. Arnaudov, A., 2021 – *Seroprevalence of some vector-borne diseases in dogs from Plovdiv, Bulgaria*. Trakia Journal of Sciences, 19(3), 237.
15. Arnold, J., Humer, A., Heltai, M., Murariu, D., Spassov, N., & Hackländer, K., 2012 – *Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* (*Canis aureus* L., 1758) in Europe*. Mammal Review, 42(1), 1-11.
16. Ayoob, A. L., Hackner, S. G., & Prittie, J., 2010 – *Clinical management of canine babesiosis*. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 20(1), 77-89.
17. Bajer, A., & Dwuznik-Szarek, D., 2021 – *The specificity of Babesia-tick vector interactions: recent advances and pitfalls in molecular and field studies*. Parasites & vectors, 14(1), 1-16.
18. Bajer, A., Dwuznik, D., Tolkacz, K., Alsarraf, M., & Mierzejewska, E. J., 2019 – *Comparison of the detection efficiency of haemoparasite DNA in blood and faecal samples—the way to eco-epidemiological studies*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 26(4), 538–543.
19. Bajer, A., Mierzejewska, E. J., Rodo, A., & Welc-Falęciak, R., 2014 – *The risk of vector-borne infections in sled dogs associated with existing and new endemic areas in Poland. Part 2: Occurrence and control of babesiosis in a sled dog kennel during a 13-year-long period*. Veterinary parasitology, 202(3-4), 234-240.
20. Baneth, G. Et al., 2012 – *Vector-borne diseases-constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum*. Parasites & vectors, 5(1), 1-3.
21. Baneth, G. Et al., 2020b – *A new piroplasmid species infecting dogs: morphological and molecular characterization and pathogeny of Babesia negevi n. sp.* Parasites & vectors, 13(1), 1-13.
22. Baneth, G., 2011 – *Perspectives on canine and feline hepatozoonosis*. Veterinary Parasitology, 181(1), 3-11.
23. Baneth, G., 2014 – *Tick-borne infections of animals and humans: a common ground*. International journal for parasitology, 44(9), 591-596.
24. Baneth, G., 2018 – *Antiprotozoal treatment of canine babesiosis*. Veterinary parasitology, 254, 58-63.
25. Baneth, G., Bates, P. A., & Olivieri, A., 2020a – *Host–parasite interactions in vector-borne protozoan infections*. European journal of protistology, 76, 125741.
26. Baneth, G., Cardoso, L., Brilhante-Simões, P., & Schnittger, L., 2019 – *Establishment of Babesia vulpes n. sp.(Apicomplexa: Babesiidae), a piroplasmid species pathogenic for domestic dogs*. Parasites & vectors, 12(1), 1-8.

27. Baneth, G., Harrus, S., Gal, A., & Aroch, I., 2015 – *Canine vector-borne co-infections: Ehrlichia canis and Hepatozoon canis in the same host monocytes*. Veterinary parasitology, 208(1-2), 30-34.
28. Baneth, G., Samish, M., & Shkap, V., 2007 – *Life cycle of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick Rhipicephalus sanguineus and domestic dog (Canis familiaris)*. Journal of Parasitology, 93(2), 283-299.
29. Baneth, G., Thamsborg, S. M., Otranto, D., Guillot, J., Blaga, R., Deplazes, P., & Solano-Gallego, L., 2016 – *Major parasitic zoonoses associated with dogs and cats in Europe*. Journal of comparative pathology, 155(1), S54-S74.
30. Banović, P. et al., 2021 – *A One Health approach to study the circulation of tick-borne pathogens: A preliminary study*. One Health, 13, 100270.
31. Barić Rafaj, R. et al., 2013 – *Markers of coagulation activation, endothelial stimulation, and inflammation in dogs with babesiosis*. Journal of veterinary internal medicine, 27(5), 1172-1178.
32. Barr, S.C., & Bowman, D. D. (Eds.), 2012 – *Blackwell's Five-minute Veterinary Consult Clinical Companion: Canine and Feline Infectious Diseases and Parasitology*. 2nd Edition. John Wiley & Sons.
33. Barutzki, D., Reule, M., Scheunemann, R., Heile, C., & Schein, E., 2007 – *Die Babesiose des Hundes*. Deutsches Tierärzteblatt, 3, 284-293.
34. Bauerfeind, R., Kreis, U., Weiß, R., Wieler, L. H., & Baljer, G., 1998 – *Detection of Borrelia burgdorferi in urine specimens from dogs by a nested polymerase chain reaction*. Zentralblatt für Bakteriologie, 287(4), 347-361.
35. Beck, S., et. al., 2014 – *Tick infestation and prophylaxis of dogs in northeastern Germany: a prospective study*. Ticks and tick-borne diseases, 5(3), 336-342.
36. Bellato, A. et. al., 2021 – *Risk of tick-borne zoonoses in urban green areas: A case study from Turin, northwestern Italy*. Urban Forestry & Urban Greening, 64, 127297.
37. Beugnet, F., & Chalvet-Monfray, K., 2013 – *Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores*. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 36(6), 559-566.
38. Beugnet, F., & Moreau, Y., 2015 – *Babesiosis*. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 34(2), 627-639.
39. Beugnet, F., Chalvet-Monfray, K., & Loukos, H., 2009 – *FleaTickRisk: a meteorological model developed to monitor and predict the activity and density of three tick species and the cat flea in Europe*. Geospatial health, 4(1), 97-113.
40. Beugnet, F., Halos, L., & Guillot, J. (Eds.), 2018 – *Textbook of clinical parasitology in dogs and cats*. Servet editorial-Grupo Asís Biomedica, SL.
41. Bhide, M., Travnicek, M., Curlik, J., & Stefancikova, A., 2004 – *The importance of dogs in eco-epidemiology of Lyme borreliosis: a review*. Veterinarni Medicina, 49(4), 135.

42. Birkenheuer, A. J., Buch, J., Beall, M. J., Braff, J., & Chandrashekar, R., 2020 – *Global distribution of canine Babesia species identified by a commercial diagnostic laboratory*. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 22, 100471.
43. Böhm, M., Leisewitz, A. L., Thompson, P. N., & Schoeman, J. P., 2006 – *Capillary and venous Babesia canis rossi parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise*. Veterinary Parasitology, 141(1-2), 18-29.
44. Borşan, S. D. et al., 2021 – *High Diversity, Prevalence, and Co-infection Rates of Tick-Borne Pathogens in Ticks and Wildlife Hosts in an Urban Area in Romania*. Frontiers in microbiology, 12.
45. Borşan, S. D., Toma-Naic, A., Péter, Á., Sándor, A. D., Peştean, C., & Mihalca, A. D., 2020 – *Impact of abiotic factors, habitat type and urban wildlife on the ecology of hard ticks (Acari: Ixodidae) in urban and peri-urban habitats*. Parasites & vectors, 13(1), 1-17.
46. Bouattour, A., Chabchoub, A., Hajjaji, I., & M'ghirbi, Y., 2021 – *Hepatozoon canis and Babesia vogeli infections of dogs in Tunisia*. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 23, 100512.
47. Bouchard, C., Leonard, E., Koffi, J. K., Pelcat, Y., Peregrine, A., Chilton, N., ... & Ogden, N.H., 2015 – *The increasing risk of Lyme disease in Canada*. The Canadian Veterinary Journal, 56(7), 693.
48. Bourdoiseau, G., 2006 – *Canine babesiosis in France*. Veterinary parasitology, 138(1-2), 118-125.
49. Braks, M. A., van Wieren, S. E., Takken, W., & Sprong, H. (Eds.), 2016 – *Ecology and prevention of Lyme borreliosis* (Vol. 4). Wageningen Academic Publishers.
50. Bratuleanu, B. E. et al., 2021 – *The virome of Rhipicephalus, Dermacentor and Haemaphysalis ticks from Eastern Romania includes novel viruses with potential relevance for public health*. Transboundary and emerging diseases.
51. Buczek, A., & Buczek, W., 2021 – *Importation of ticks on companion animals and the risk of spread of tick-borne diseases to non-endemic regions in Europe*. Animals, 11(1), 6.
52. Cabezas-Cruz, A., Vayssier-Taussat, M., & Greub, G., 2018 – *Tick-borne pathogen detection: what's new?*. Microbes and infection, 20(7-8), 441-444.
53. Callister, S. M., Jobe, D. A., Schell, R. F., Lovrich, S. D., Onheiber, K. L., & Korshus, J. B., 2000 – *Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with Borrelia burgdorferi-infected Ixodes scapularis ticks*. Journal of clinical microbiology, 38(10), 3670-3674.
54. Cayol, C., Koskela, E., Mappes, T., Siukkola, A., & Kallio, E. R., 2017 – *Temporal dynamics of the tick Ixodes ricinus in northern Europe: epidemiological implications*. Parasites & vectors, 10(1), 1-11.
55. Cazan, C. D., Ionică, A. M., Matei, I. A., D'Amico, G., Muñoz, C., Berriatua, E., & Dumitrache, M. O., 2020 – *Detection of Leishmania infantum DNA and antibodies*

- against *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sl and *Ehrlichia canis* in a dog kennel in South-Central Romania. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 1-4.
56. Cetin, M., 2015 – *Using GIS analysis to assess urban green space in terms of accessibility: case study in Kutahya*. *International Journal of Sustainable Development & World Ecology*, 22(5), 420-424.
 57. Cetinkaya, H., Matur, E., Akyazi, I., Ekiz, E. E., Aydin, L., & Toparlak, M., 2016 – *Serological and molecular investigation of Ehrlichia spp. and Anaplasma spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey*. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 706-714.
 58. Checa, R. et al., 2017 – *Efficacy, safety and tolerance of imidocarb dipropionate versus atovaquone or buparvaquone plus azithromycin used to treat sick dogs naturally infected with the Babesia microti-like piroplasm*. *Parasites & vectors*, 10(1), 1-12.
 59. Chirek, A., Silaghi, C., Pfister, K., & Kohn, B., 2017 – *Granulocytic anaplasmosis in 63 dogs: clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease*. *Journal of small animal practice*, 59(2), 112-120
 60. Chitimia-Dobler, L. Et al., 2017 – *Genetic analysis of Rhipicephalus sanguineus sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequences*. *Veterinary parasitology*, 239, 1-6.
 61. Chitimia-Dobler, L., 2015 – *Spatial distribution of Dermacentor reticulatus in Romania*. *Veterinary parasitology*, 214(1-2), 219-223.
 62. Christophers, S.R., 1907 – *The sexual life cycle of Leucocytozoon canis in the tick*. *Sci. Mem. By Officers Med Sanit. Dep. Gov. India*, 28, 1–11.
 63. Cimpan, A. A., Nachum-Biala, Y., Ben-Shitrit, B., Miron, L., & Baneth, G., 2020 – *Epidemiological study of canine babesiosis and hepatozoonosis in the South of Romania*. *Acta parasitologica*, 65(3), 669-678.
 64. Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Zajac, V., Sroka, J., & Dutkiewicz, J., 2012 – *Risk of Lyme disease at various sites and workplaces of forestry workers in eastern Poland*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(3).
 65. Ciuca, L., Martinescu, G., Miron, L. D., Roman, C., Acatrinei, D., Cringoli, G., Rinaldi L. & Maurelli, M. P., 2021 – *Occurrence of Babesia Species and Co-Infection with Hepatozoon canis in Symptomatic Dogs and in Their Ticks in Eastern Romania*. *Pathogens*, 10(10), 1339.
 66. Claerebout, E. et. al., 2013 – *Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium*. *Parasites & vectors*, 6(1), 1-9.
 67. Collett, M. G., 2000 – *Survey of canine babesiosis in South Africa*. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(3), 180-186.
 68. Colombo, M. Et al., 2021 – *Exposure to Major Vector-Borne Diseases in Dogs Subjected to Different Preventative Regimens in Endemic Areas of Italy*. *Pathogens*, 10(5), 507.

69. Colwell, D. D., Dantas-Torres, F., & Otranto, D., 2011 – *Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives*. Veterinary parasitology, 182(1), 14-21.
70. Comandatore, F. et al., 2021 – *Modeling the Life Cycle of the Intramitochondrial Bacterium “Candidatus Midichloria mitochondrii” Using Electron Microscopy Data*. mBio, 12(3), e00574-21.
71. Cook, M. J., 2015 – *Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment*. International journal of general medicine, 8, 1.
72. Criado-Fornelio, A. et al., 2007 – *Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of Hepatozoon sp.* Veterinary parasitology, 150(4), 352-356.
73. Cull, B., Pietzsch, M. E., Hansford, K. M., Gillingham, E. L., & Medlock, J. M., 2018 – *Surveillance of British ticks: an overview of species records, host associations, and new records of Ixodes ricinus distribution*. Ticks and tick-borne diseases, 9(3), 605-614.
74. Cull, B., Vaux, A. G., Ottowell, L. J., Gillingham, E. L., & Medlock, J. M., 2017 – *Tick infestation of small mammals in an English woodland*. Journal of Vector Ecology, 42(1), 74-83.
75. Da Silva, A. S., et al., 2013 – *Relationship between butyrylcholinesterase activity and liver injury in mice acute infected with Toxoplasma gondii*. Pathology-Research and Practice, 209(2), 95-98.
76. Dantas-Torres, F., 2008 – *The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): from taxonomy to control*. Veterinary parasitology, 152(3-4), 173-185.
77. Dantas-Torres, F., 2015 – *Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: the butterfly effect*. International Journal for Parasitology: parasites and wildlife, 4(3), 452-461.
78. Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D., 2012 – *Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective*. Trends in parasitology, 28(10), 437-446.
79. Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., & Otranto, D., 2013 – *Morphological and genetic diversity of Rhipicephalus sanguineus sensu lato from the New and Old Worlds*. Parasites & vectors, 6(1), 1-17.
80. Dantas-Torres, F., Maia, C., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Cardoso, L., & Otranto, D., 2017 – *Genetic characterization of Rhipicephalus sanguineus (sensu lato) ticks from dogs in Portugal*. Parasites & vectors, 10(1), 1-5.
81. Dantas-Torres, F., Martins, T. F., Muñoz-Leal, S., Onofrio, V. C., & Barros-Battesti, D. M., 2019 – *Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys*. Ticks and tick-borne diseases, 10(6), 101252.
82. Dautel, H., Dippel, C., Kämmer, D., Werkhausen, A., & Kahl, O., 2008 – *Winter activity of Ixodes ricinus in a Berlin forest*. International Journal of Medical Microbiology, 298, 50-54.

-
83. Day, M. J. (Ed.), 2016 – *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. CRC Press.
 84. De Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E. B., & Otranto, D., 2011 – *Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens*. Veterinary microbiology, 149(1-2), 206-212.
 85. De Tommasi, A. S., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Breitschwerdt, E. B., & de Caprariis, D., 2013 – *Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs?*. Parasites & vectors, 6(1), 1-5.
 86. Diakou, A. et al., 2019 – *Endoparasites and vector-borne pathogens in dogs from Greek islands: pathogen distribution and zoonotic implications*. PloS neglected tropical diseases, 13(5), e0007003.
 87. Diuk-Wasser, M. A., Vannier, E., & Krause, P. J., 2016 – *Coinfection by Ixodes tick-borne pathogens: ecological, epidemiological, and clinical consequences*. Trends in parasitology, 32(1), 30-42.
 88. Dongus, H., Zahler, M., & Gothe, R., 1996 – *The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Ixodidae), in Germany: an epidemiologic study and control measures*. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 109(6-7), 245-248.
 89. Dumitrache, M. O., et al., 2015 – *Prevalence of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi sensu lato, in Ixodes ricinus parasitizing on Red Foxes (Vulpes vulpes) from Romania*. Bul USAMV Cluj Vet Med, 72, 134-137.
 90. Dumitrache, M. O., Kiss, B., Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., D'Amico, G., Sándor, A. D., & Mihalca, A. D., 2014 – *Seasonal dynamics of Rhipicephalus rossicus attacking domestic dogs from the steppic region of southeastern Romania*. Parasites & vectors, 7(1), 1-6.
 91. Duscher, G. G., Feiler, A., Leschnik, M., & Joachim, A., 2013 – *Seasonal and spatial distribution of ixodid tick species feeding on naturally infested dogs from Eastern Austria and the influence of acaricides/repellents on these parameters*. Parasites & vectors, 6(1), 1-8.
 92. Dutto, M., & Selmi, M., 2009 – *Report on ticks (Acari: Ixodidae) collected on dogs in Piedmont: The potential transmission of tick-borne pathogens to man*. Parassitologia, 51, 113-117.
 93. Eichenberger, R. M., Deplazes, P., & Mathis, A., 2015 – *Ticks on dogs and cats: a pet owner-based survey in a rural town in northeastern Switzerland*. Ticks and Tick-borne Diseases, 6(3), 267-271.
 94. Eichenberger, R. M., Ramakrishnan, C., Russo, G., Deplazes, P., & Hehl, A. B., 2017 – *Genome-wide analysis of gene expression and protein secretion of Babesia canis during virulent infection identifies potential pathogenicity factors*. Scientific reports, 7(1), 1-14.

95. Eichenberger, R. M., Riond, B., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., & Deplazes, P., 2016 – *Prognostic markers in acute Babesia canis infections*. Journal of veterinary internal medicine, 30(1), 174-182.
96. Elsheikha, H., 2019 – *Management of ticks and tick-borne diseases: challenges and opportunities*. The Veterinary Nurse, 10(2), 60-63.
97. Estrada-Peña, A., 2004 – *Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species*. 1st ed., University of Zaragoza, Spain.
98. Estrada-Peña, A., Ayllón, N., & De La Fuente, J., 2012 – *Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission*. Frontiers in physiology, 3, 64.
99. Estrada-Peña, A., et al., 2013 – *Ticks and Tick-borne Diseases. Geographical Distribution and Control Strategies in the Euro-Asia Region*. CAB International, 292.
100. Estrada-Peña, A., Mihalca, A. D., & Petney, T. N. (Eds.), 2018 – *Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification*. Springer.
101. Estrada-Peña, A., Roura, X., Sainz, A., Miró, G., & Solano-Gallego, L., 2017 – *Species of ticks and carried pathogens in owned dogs in Spain: results of a one-year national survey*. Ticks and tick-borne diseases, 8(4), 443-452.
102. Fabisiak, M. I. C. H. A. Ł., Sapierzynski, R., & Klucinski, W., 2010 – *Analysis of haematological abnormalities observed in dogs infected by a large Babesia*. Bull Vet Inst Pulawy, 54, 167-170.
103. Far, D., Takács, N., Gyurkovszky, M., Solymosi, N., & Farkas, R., 2021 – *Ticks and Tick-Borne Infections of Dogs in Two Jordanian Shelters*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 21, 573–578.
104. Farkas, R., Gyurkovszky, M., Lukács, Z., Aladics, B., & Solymosi, N., 2014 – *Seroprevalence of some vector-borne infections of dogs in Hungary*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 14(4), 256-260.
105. Filipović, M. M. K. Et al., 2018 – *Molecular and serological prevalence of Anaplasma phagocytophilum, A. platys, Ehrlichia canis, E. chaffeenses, E. ewingii, Borrelia burgdorferi, Babesia canis, B. gibsoni and B. vogeli among clinically healthy outdoor dogs in Serbia*. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 14, 117-122.
106. Fisher, M., & McGarry, J., 2006 – *Focus on Small Animal Parasitology*. Bayer Health Care AG, Animal Health Division.
107. Földvári, G., & Farkas, R., 2005 – *Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary*. Veterinary Parasitology, 129(1-2), 125-131.
108. Földvári, G., Márialigeti, M., Solymosi, N., Lukács, Z., Majoros, G., Kósa, J. P., & Farkas, R., 2007 – *Hard ticks infesting dogs in Hungary and their infection with Babesia and Borrelia species*. Parasitology Research, 101(1), 25-34.
109. Földvári, G., Šíroký, P., Szekeres, S., Majoros, G., & Sprong, H., 2016 – *Dermacentor reticulatus: a vector on the rise*. Parasites & vectors, 9(1), 1-29.

110. Fritz, C.L., & Kjemtrup, A.M., 2003 – *Lyme borreliosis*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 223(9), 1261-1270.
111. Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., & Solano-Gallego, L., 2005 – *Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form Babesia from dogs of northeastern Italy*. Veterinary parasitology, 134(1-2), 77-85.
112. Gabrielli, S. Et al., 2015 – *Canine babesioses in noninvestigated areas of Serbia*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 15(9), 535-538.
113. Galán, A., Mayer, I., Rafaj, R. B., Bendelja, K., Sušić, V., Cerón, J. J., & Mrljak, V., 2018 – *MCP-1, KC-like and IL-8 as critical mediators of pathogenesis caused by Babesia canis*. PloS One, 13(1), e0190474.
114. Galay, R. L. Et al., 2018 – *Molecular detection of tick-borne pathogens in canine population and Rhipicephalus sanguineus (sensu lato) ticks from southern Metro Manila and Laguna, Philippines*. Parasites & vectors, 11(1), 1-8.
115. Garcia-Vozmediano, A. et al., 2021 – *The Genetic Diversity of Rickettsiella Symbionts in Ixodes ricinus Throughout Europe*. Microbial Ecology, 1-14.
116. Gaunt, S. D., Beall, M. J., Stillman, B. A., Lorentzen, L., Diniz, P. P. V. P., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E. B., 2010 – *Experimental infection and co-infection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis: hematologic, serologic and molecular findings*. Parasites & vectors, 3(1), 33.
117. Geurden, T., Becskei, C., Six, R. H., Maeder, S., Latrofa, M. S., Otranto, D., & Farkas, R., 2018 – *Detection of tick-borne pathogens in ticks from dogs and cats in different European countries*. Ticks and tick-borne diseases, 9(6), 1431-1436.
118. Giannelli, A., Ramos, R. A. N., Dantas-Torres, F., Mencke, N., Baneth, G., & Otranto, D., 2013 – *Experimental evidence against transmission of Hepatozoon canis by Ixodes ricinus*. Ticks and tick-borne diseases, 4(5), 391-394.
119. Gillingham, E. L., Cull, B., Pietzsch, M. E., Phipps, L. P., Medlock, J. M., & Hansford, K., 2020 – *The unexpected holiday souvenir: The public health risk to UK travellers from ticks acquired overseas*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(21), 7957.
120. Goddard, A., Wiinberg, B., Schoeman, J. P., Kristensen, A. T., & Kjelgaard-Hansen, M., 2013 – *Mortality in virulent canine babesiosis is associated with a consumptive coagulopathy*. The Veterinary Journal, 196(2), 213-217.
121. Goodman, J. L., Nelson, C., Vitale, B., Madigan, J. E., Dumler, J. S., Kurtti, T. J., & Munderloh, U. G., 1996 – *Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis*. New England Journal of Medicine, 334(4), 209-215.
122. Goossens, H. A. T., Van Den Bogaard, A. E., & Nohlmans, M. K. E., 2001 – *Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands*. Journal of clinical microbiology, 39(3), 844-848.

123. Gray, J. S., & Ogden, N. H., 2021 – *Ticks, Human Babesiosis and Climate Change*. Pathogens, 10(11), 1430.
124. Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., & Lindgren, E., 2009 – *Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe*. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases. <https://doi.org/10.1155/2009/593232>.
125. Gray, J. S., Estrada-Peña, A., & Zintl, A., 2019 – *Vectors of babesiosis*. Annual review of entomology, 64, 149-165.
126. Greene, C.E., 2012 – *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th edn., St Louis. Missouri: Elsevier.
127. Grochowska, A. et. al., 2020 – *Comparison of tick-borne pathogen prevalence in Ixodes ricinus ticks collected in urban areas of Europe*. Scientific reports, 10(1), 1-9.
128. Gultekin, M., Ural, K., Pasa, S., Balikci, C., & Asici, G. S. E., 2017 – *Oxidative status and lipid profile in mono and co-infection with canine monocytic ehrlichiosis*. Medycyna Weterynaryjna, 73(12), 797-801.
129. Guo, H. et al., 2017 – *A PCR survey of vector-borne pathogens in different dog populations from Turkey*. Acta parasitologica, 62(3), 533-540.
130. Hamel, D., Röhrig, E., & Pfister, K., 2011 – *Canine vector-borne disease in travelled dogs in Germany—a retrospective evaluation of laboratory data from the years 2004–2008*. Veterinary Parasitology, 181(1), 31-36.
131. Hamel, D., Silaghi, C., Lescai, D., & Pfister, K., 2012 – *Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on Babesia spp.* Parasitology research, 110(4), 1537-1545.
132. Hansford, K. M., Medlock, J. M., Atkinson, B., & Santos-Silva, M. M., 2016 – *Importation of a Hyalomma lusitanicum tick into the UK on a dog*. The Veterinary Record, 179(16), 415.
133. Hansford, K. M., Medlock, J. M., Atkinson, B., & Santos-Silva, M. M., 2016 – *Importation of a Hyalomma lusitanicum tick into the UK on a dog*. The Veterinary Record, 179(16), 415.
134. Harrus, S., Perlman-Avrahami, A., Mumcuoglu, K. Y., Morick, D., Eyal, O., & Baneth, G., 2011 – *Molecular detection of Ehrlichia canis, Anaplasma bovis, Anaplasma platys, Candidatus Midichloria mitochondrii and Babesia canis vogeli in ticks from Israel*. Clinical Microbiology and Infection, 17(3), 459-463.
135. Hartemink, N., Vanwambeke, S. O., Purse, B. V., Gilbert, M., & Van Dyck, H., 2015 – *Towards a resource-based habitat approach for spatial modelling of vector-borne disease risks*. Biological Reviews, 90(4), 1151-1162.
136. Harvey, J. W., 2001 – *Atlas of veterinary hematology–blood and bone marrow of domestic animals*. Saunders Company.

137. Heile, C., Heydorn, A. O., & Schein, E., 2006 – *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794)-distribution, biology and vector for *Babesia canis* in Germany. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 119(7-8), 330-334.
138. Hii, S. F. et al., 2015 – *Canine tick-borne pathogens and associated risk factors in dogs presenting with and without clinical signs consistent with tick-borne diseases in northern Australia*. Australian veterinary journal, 93(3), 58-66.
139. Hollingsworth, T. D., Pulliam, J. R., Funk, S., Truscott, J. E., Isham, V., & Lloyd, A. L., 2015 – *Seven challenges for modelling indirect transmission: vector-borne diseases, macroparasites and neglected tropical diseases*. Epidemics, 10, 16-20.
140. Hussain, S. Et al., 2021 – *The Role of Ticks in the Emergence of Borrelia burgdorferi as a Zoonotic Pathogen and Its Vector Control: A Global Systemic Review*. Microorganisms, 9(12), 2412.
141. Ilie, M. S. Et al., 2011 – *Seroprevalence of anti-Borrelia burgdorferi sensu lato antibodies in dogs from Timis county*. Lucrări Științifice-Universitatea de Științe Agricole a Banatului, Timișoara, Medicina Veterinara, 44(1), 42-46.
142. Ilie, M. S., D. G., Imre, M., Imre, K., Hotea, I., & Sorescu, I. D., 2010 – *Survey of canine babesiosis in Banat area*. Bulletin UASVM-CN, Vet. Med, 67, 125-130.
143. Ilie, M., et al., 2012 – *New data's in canine borreliosis from Romania: Serological approach*. Journal of Biotechnology, (161), 34.
144. Imre, M. Et al., 2013b – *Seroprevalence of Babesia canis infection in clinically healthy dogs from western Romania*. The Journal of parasitology, 99(1), 161-163.
145. Imre, M., Dudu, A., Ilie, M. S., Morariu, S., Imre, K., & Dărăbuș, G., 2015 – *Molecular survey of Hepatozoon canis in red foxes (Vulpes vulpes) from Romania*. The Journal of parasitology, 101(4), 490-491.
146. Imre, M., Farkas, R., Ilie, M. S., Imre, K., & Dărăbuș, G., 2013a – *Survey of babesiosis in symptomatic dogs from Romania: Occurrence of Babesia gibsoni associated with breed*. Ticks and tick-borne diseases, 4(6), 500-502.
147. Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K., & Onishi, T., 2002 – *Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs*. Veterinary Parasitology, 106(3), 265-271.
148. Ionică, A. M. Et al., 2016 – *Role of golden jackals (Canis aureus) as natural reservoirs of Dirofilaria spp. in Romania*. Parasites & vectors, 9(1), 1-6.
149. Ioniță M., 2019 – *Ecologia căpușelor ixodide*, ed. Ceres, București.
150. Ioniță, M., & Mitrea, I. L., 2003b – *Observations on the life cycle of the brown dog tick (Rhipicephalus sanguineus Latreille 1806, Acari: Ixodidae), in the Buchraest's environment conditions*. Sci. Parasitol, 4, 167-171.

151. Ioniță, M., & Mitrea, I. L., 2017 – *Actualities on vector-borne diseases: risks to human health and animals (i. Tick-borne diseases)*. Revista Română de Medicină Veterinară, 27(2), 8-14.
152. Ioniță, M., 2003a – *Research on the ecology of Ixodidae in Subcarpathian regions; epidemiology of parasitic disease transmitted by these*. PhD Dissertation. University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine Bucharest, Romania.
153. Ioniță, M., Mitrea, I. L., Buzatu, M. C., & Dascalu, L., 2010 – *Seasonal dynamics of tick (Acari: Ixodidae) populations in different areas of Romania and the associated risks of tick-borne diseases*. In Proceedings of the XIIth International Congress of Parasitology (ICOPA), Melbourne, Australia (p. 665).
154. Ioniță, M., Mitrea, I. L., Pfister, K., Hamel, D., & Silaghi, C., 2013 – *Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania*. Veterinary parasitology, 196(1-2), 71-76.
155. Ioniță, M., Mitrea, I. L., Pfister, K., Hamel, D., Buzatu, C. M., & Silaghi, C., 2012 – *Canine babesiosis in Romania due to Babesia canis and Babesia vogeli: a molecular approach*. Parasitology research, 110(5), 1659-1664.
156. Irwin, P. J., 2009 – *Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control*. Parasites & vectors, 2(1), 1-9.
157. Irwin, P. J., 2014 – *It shouldn't happen to a dog... or a veterinarian: clinical paradigms for canine vector-borne diseases*. Trends in parasitology, 30(2), 104-112.
158. Ismail, N., & McBride, J. W., 2017 – *Tick-borne emerging infections: ehrlichiosis and anaplasmosis*. Clinics in laboratory medicine, 37(2), 317-340.
159. Ivanov, A., & Tsachev, I., 2008 – *Mini-review Hepatozoon canis and Hepatozoonosis in the dog*. Trakia Journal of Sciences, 6(2), 27.
160. Jacobson, L. S., 2006 – *The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004*. Veterinary parasitology, 138(1-2), 126-139.
161. Jaenson, T. G., Jaenson, D. G., Eisen, L., Petersson, E., & Lindgren, E., 2012 – *Changes in the geographical distribution and abundance of the tick Ixodes ricinus during the past 30 years in Sweden*. Parasites & vectors, 5(1), 1-15.
162. Jameson, L. J., Phipps, L. P., & Medlock, J. M., 2010 – *Surveillance for exotic ticks on companion animals in the UK*. The Veterinary Record, 166(7), 202-203.
163. Jenkins, S., Ketzis, J. K., Dundas, J., & Scorpio, D., 2018 – *Efficacy of minocycline in naturally occurring nonacute ehrlichia canis infection in dogs*. Journal of veterinary internal medicine, 32(1), 217-221.
164. Juasook, A., Siriporn, B., Noppakhun, N., Phetpoang, P., & Khamyang, S., 2021 – *Molecular detection of tick-borne pathogens in infected dogs associated with Rhipicephalus sanguineus tick infestation in Thailand*. Veterinary World, 14(6), 1631–1637.

-
165. Kalinowski, M., Staniec, M., Grądzki, Z., Salmons, B., & Winiarczyk, S., 2015 – *Changes in selected subpopulations of lymphocytes in dogs infected with Babesia canis treated with imidocarb*. Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere, 43(02), 94-100.
166. Kalmár, Z. et al., 2020 – *Multiple Tick-borne pathogens in Ixodes ricinus ticks collected from humans in Romania*. Pathogens, 9(5), 390.
167. Kalmár, Z. et al., 2021 – *Seroprevalence of antibodies against Borrelia burgdorferi sensu lato in healthy blood donors in Romania: an update*. Parasites & vectors, 14(1), 1-10.
168. Karagenc, T. I. et al., 2006 – *A parasitological, molecular and serological survey of Hepatozoon canis infection in dogs around the Aegean coast of Turkey*. Veterinary parasitology, 135(2), 113-119.
169. Karbowiak, G., 2014 – *The occurrence of the Dermacentor reticulatus tick-its expansion to new areas and possible causes*. Annals of parasitology, 60(1).
170. Keller, N., Jacobson, L. S., Nel, M., de Clerq, M., Thompson, P. N., & Schoeman, J. P., 2004 – *Prevalence and risk factors of hypoglycemia in virulent canine babesiosis*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 18(3), 265-270.
171. Kettner, F., Reyers, F., & Miller, D., 2003 – *Thrombocytopaenia in canine babesiosis and its clinical usefulness*. Journal of the South African Veterinary Association, 74(3), 63-68.
172. Kirtz, G., Leschnik, M., Hooijberg, E., Tichy, A., & Leidinger, E., 2012 – *In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (Babesia canis canis) for veterinary practitioners in Central Europe*. Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere, 40(02), 87-94.
173. Kiss, T. Et al., 2011 – *Serological reactivity to Borrelia burgdorferi sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 11(9), 1259-1262.
174. Kock, N., & Kelly, P., 1991 – *Massive hepatic necrosis associated with accidental imidocarb dipropionate toxicosis in a dog*. Journal of comparative pathology, 104(1), 113-116.
175. Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., & Pfister, K., 2011 – *Infections with Anaplasma phagocytophilum in dogs in Germany*. Research in veterinary science, 91(1), 71-76.
176. Kohn, M., Krücken, J., McKay-Demeler, J., Pachnicke, S., Krieger, K., & von Samson-Himmelstjerna, G., 2019 – *Dermacentor reticulatus in Berlin/Brandenburg (Germany): activity patterns and associated pathogens*. Ticks and tick-borne diseases, 10(1), 191-206.
177. Köster, L. S., Lobetti, R. G., & Kelly, P., 2015 – *Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment*. Veterinary medicine: research and reports, 6, 119.
-

178. Kraje, A. C., 2001 – *Canine haemobartonellosis and babesiosis*. Compendium on continuing education for the practising veterinarian-North American edition, 23(4), 310-319.
179. Kramer, V. L., Randolph, M. P., Hui, L. T., Irwin, W. E., Gutierrez, A. G., & Vugia, D. J., 1999 – *Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 60(1), 62-65.
180. Krupka, I., & Straubinger, R.K., 2010 – *Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 40(6), 1103-1119.
181. Kuleš, J., Bilić, P., Ljubić, B. B., Gotić, J., Crnogaj, M., Brkljačić, M., & Mrljak, V., 2018 – *Glomerular and tubular kidney damage markers in canine babesiosis caused by Babesia canis*. Ticks and tick-borne diseases, 9(6), 1508-1517.
182. Kumar, A., Varshney, J. P., & Patra, R. C., 2006 – *A comparative study on oxidative stress in dogs infected with Ehrlichia canis with or without concurrent infection with Babesia gibsoni*. Veterinary Research Communications, 30(8), 917-920.
183. Kumsa, B. E., & Mekonnen, S., 2011 – *Ixodid ticks, fleas and lice infesting dogs and cats in Hawassa, southern Ethiopia*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 78(1), 1-4.
184. Kybicová, K., Schánilec, P., Hulínská, D., Uherková, L., Kurzová, Z., & Spejchalová, S., 2009 – *Detection of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi sensu lato in dogs in the Czech Republic*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 9(6), 655-661.
185. Leica, L., Mitrea, I. L., & Ionita, M., 2017 – *Clinical study and pathological findings on babesiosis in dogs, on seaside of Romania*. Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine, 63(2), 73-78.
186. Leica, L., Mitrea, I. L., & Ionita, M., 2019 – *Clinical occurrence of canine babesiosis in the coastal area of the Black Sea (Dobrogea) in Southeastern Romania and associated epidemiological implications*. Journal of Parasitology, 105(4), 491-496.
187. Leisewitz, A., Goddard, A., De Gier, J., Van Engelshoven, J., Clift, S., Thompson, P., & Schoeman, J. P., 2019 – *Disease severity and blood cytokine concentrations in dogs with natural Babesia rossi infection*. Parasite immunology, 41(7), e12630.
188. Lempereur, L. Et al., 2017 – *Guidelines for the detection of Babesia and Theileria parasites*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 17(1), 51-65.

189. Lengauer, H., Just, F. T., Edelhofer, R., & Pfister, K., 2006 – *Tick infestation and the prevalence of Borrelia burgdorferi and Babesia divergens in cattle in Bavaria*. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 119(7-8), 335-341.
190. Leschnik, M., 2013 – *Canine borreliosis: Are we facing the facts?*. Veterinary Journal (London, England: 1997), 199(2), 197-198.
191. Léveillé, A. N., Baneth, G., & Barta, J. R., 2019 – *Next generation sequencing from Hepatozoon canis (Apicomplexa: Coccidia: Adeleorina): complete apicoplast genome and multiple mitochondrion-associated sequences*. International journal for parasitology, 49(5), 375-387.
192. Levi, M. M., Nachum-Biala, Y., King, R., & Baneth, G., 2018 – *A survey of Babesia spp. and Hepatozoon spp. in wild canids in Israel*. Parasites & vectors, 11(1), 1-11.
193. Li, Y. Et al., 2008 – *Diagnosis of canine Hepatozoon spp. infection by quantitative PCR*. Veterinary parasitology, 157(1-2), 50-58.
194. Lindgren, E., Jaenson, T. G., Menne, B., & World Health Organization, 2006 – *Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures* (No. EUR/04/5046250). Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.
195. Little, S. E., Allen, K. E., Johnson, E. M., Panciera, R. J., Reichard, M. V., & Ewing, S. A., 2009 – *New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review*. Parasites & Vectors, 2(1), 1-4.
196. Littman, M.P., Gerber, B., Goldstein, R.E., Labato, M.A., Lappin, M.R., & Moore, G.E., 2018 – *ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats*. Journal of veterinary internal medicine, 32(3), 887-903.
197. Livanova, N. N., Fomenko, N. V., Akimov, I. A., Ivanov, M. J., Tikunova, N. V., Armstrong, R., & Konyaev, S. V., 2018 – *Dog survey in Russian veterinary hospitals: tick identification and molecular detection of tick-borne pathogens*. Parasites & vectors, 11(1), 1-10.
198. Lobetti, R. G., & Jacobson, L. S., 2001 – *Renal involvement in dogs with babesiosis*. Journal of the South African Veterinary Association, 72(1), 23-28.
199. Lobetti, R.G., 2003 – *Hematological changes in TBDs*. In: Proceedings of the 21st American College of Veterinary Internal Medicine forum, Charlotte, NC, pp. 554-556.
200. Lorusso, V., Dantas-Torres, F., Lia, R. P., Tarallo, V. D., Mencke, N., Capelli, G., & Otranto, D., 2010 – *Seasonal dynamics of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus, on a confined dog population in Italy*. Medical and Veterinary Entomology, 24(3), 309-315.
201. Low, V. L., Prakash, B. K., Lim, Y. A. L., Tan, T. K., Vinnie-Siow, W. Y., Sofian-Azirun, M., & AbuBakar, S., 2018 – *Detection of Anaplasmataceae agents*

- and co-infection with other tick-borne protozoa in dogs and *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 75(4), 429-435.
202. Manciu, C., Vata, A., Filip-Ciubotaru, F., Luca, M. C., Largu, A., & Iordan, I. F., 2019 – *Environmental changes in north-eastern romania—a trigger factor for lyme disease*. *Environmental Engineering and Management Journal*, 18(3), 775-779.
 203. Manilla, G., 1998 – *Acari, Ixodida (Fauna d'Italia 36)*. Edizioni Calderoni, Bologna, Italy, 280.
 204. Marchiondo, A. A., Holdsworth, P. A., Green, P., Blagburn, B. L., & Jacobs, D. E., 2007 – *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestation on dogs and cats*. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4), 332-344.
 205. Mariconti, M. Et al., 2012 – *Humans parasitized by the hard tick Ixodes ricinus are seropositive to Midichloria mitochondrii: is Midichloria a novel pathogen, or just a marker of tick bite?*. *Pathogens and global health*, 106(7), 391-396.
 206. Massung, R. F., Levin, M. L., Munderloh, U. G., Silverman, D. J., Lynch, M. J., Gaywee, J. K., & Kurtti, T. J., 2007 – *Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of Anaplasma phagocytophilum in a tick cell line*. *Journal of clinical microbiology*, 45(7), 2138-2143.
 207. Matei, I. A., Ionică, A. M., D'Amico, G., Corduneanu, A., Daskalaki, A. A., Lefkaditis, M., & Mihalca, A. D., 2017a – *Altitude-dependent prevalence of canine granulocytic anaplasmosis in Romania*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(2), 147-151.
 208. Matei, I. A., Stuen, S., Modrý, D., Degan, A., D'Amico, G., & Mihalca, A. D., 2017b – *Neonatal Anaplasma platys infection in puppies: Further evidence for possible vertical transmission*. *The Veterinary Journal*, 219, 40-41.
 209. Máthé, A., Dobos-Kovács, M., & Vörös, K., 2007 – *Histological and ultrastructural studies of renal lesions in Babesia canis infected dogs treated with imidocarb*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55(4), 511-523.
 210. Máthé, A., Vörös, K., Papp, L., & Reiczigel, J., 2006 – *Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases)*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 54(3), 367-385.
 211. Matjila, T. P. et al., 2005 – *Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands*. *Veterinary parasitology*, 131(1-2), 23-29.
 212. Maurelli, M. P. et al., 2018 – *A national survey of Ixodidae ticks on privately owned dogs in Italy*. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-10.
 213. Mehlhorn, H. (Ed.), 2008 – *Encyclopedia of parasitology*. AM. Springer Science & Business Media.

214. Menn, B., Lorentz, S., & Naucke, T. J., 2010 – *Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany*. Parasites & vectors, 3(1), 1-7.
215. Meyers, A. C. Et al., 2021 – *Epidemiology of Vector-Borne Pathogens Among US Government Working Dogs*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 21(5), 358-368.
216. Michalski, M. M., Kubiak, K., Szczotko, M., Chajęcka, M., & Dmitryjuk, M., 2020 – *Molecular detection of Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum in ticks collected from dogs in urban areas of North-Eastern Poland*. Pathogens, 9(6), 455.
217. Micu, I., Mitrea, I. L., & Ioniță, M., 2018 – *Serological investigation of Borrelia burgdorferi sensu lato infection in dogs, in Southern Romania*. Scientia Parasitologica, 19(1/2), 15-22.
218. Mierzejewska, E. J., Welc-Faleciak, R., Karbowski, G., Kowalec, M., Behnke, J. M., & Bajer, A., 2015 – *Dominance of Dermacentor reticulatus over Ixodes ricinus (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland*. Experimental and Applied Acarology, 66(1), 83-101.
219. Mihalca, A. D. et al., 2012 – *Synopsis of the hard ticks (Acari: Ixodidae) of Romania with update on host associations and geographical distribution*. Experimental and applied acarology, 58(2), 183-206.
220. Miller, A. Austin., 2019 – Routledge. In *Climatology*. Tylor Press: New York, NY, USA.
221. Mircean, V., Dumitrache, M. O., Györke, A., Pantchev, N., Jodies, R., Mihalca, A. D., & Cozma, V., 2012 – *Seroprevalence and geographic distribution of Dirofilaria immitis and tick-borne infections (Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Ehrlichia canis) in dogs from Romania*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 12(7), 595-604.
222. Miró, G. Et al., 2021 – *Seropositivity of Main Vector-Borne Pathogens in Dogs Across Europe*. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1135277/v1>.
223. Miterpáková, M., Komjáti-Nagyová, M., Hurníková, Z., & Víchová, B., 2017 – *Retrospective molecular study on canine hepatozoonosis in Slovakia–Does infection risk for dogs really exist?*. Ticks and tick-borne diseases, 8(4), 567-573.
224. Mizock, B. A., 1995 – *Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature*. The American journal of medicine, 98(1), 75-84.
225. Modrý, D., Beck, R., Hrazdilová, K., & Baneth, G., 2017 – *A review of methods for detection of Hepatozoon infection in carnivores and arthropod vectors*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 17(1), 66-72.
226. Morar, D., Dărăbuș, G., Imre, M., Ilie, M. S., & Imre, K., 2015 – *First record of autochthonous canine ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis in Romania*. Veterinary clinical pathology, 44(2), 200-204.

227. Morelli, S. Et al., 2021 – *First record of Hepatozoon spp. in domestic cats in Greece*. Ticks and Tick-borne Diseases, 12(1), 101580.
228. Moutailler, S. Et al., 2016 – *Co-infection of ticks: the rule rather than the exception*. PloS neglected tropical diseases, 10(3), e0004539.
229. Najm, N. A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Pfister, K., & Silaghi, C., 2014 – *Hepatozoon canis in German red foxes (Vulpes vulpes) and their ticks: molecular characterization and the phylogenetic relationship to other Hepatozoon spp.* Parasitology research, 113(7), 2679-2685.
230. Namina, A. et al., 2019 – *Tick-borne pathogens in ticks collected from dogs, Latvia, 2011–2016*. BMC veterinary research, 15(1), 1-10.
231. Nebogatkin, I. V., 2013 – *Ticks of the Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae) and their distribution in Ukraine*. Vestnik zoologii, 47(3), 28-34.
232. Neer, T. M., Breitschwerdt, E. B., Greene, R. T., & Lappin, M. R., 2002 – *Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 16(3), 309-315.
233. Nel, M., Lobetti, R. G., Keller, N., & Thompson, P. N., 2004 – *Prognostic value of blood lactate, blood glucose, and hematocrit in canine babesiosis*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 18(4), 471-476.
234. Nijhof, A. M. Et al., 2007 – *Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands*. Vector-borne and zoonotic diseases, 7(4), 585-596.
235. Oechslin, C. P. et al., 2017 – *Prevalence of tick-borne pathogens in questing Ixodes ricinus ticks in urban and suburban areas of Switzerland*. Parasites & vectors, 10(1), 1-18.
236. Ogbu, K. I., Olaolu, O. S., Ochai, S. O., & Tion, M. T., 2018 – *A review of some tick-borne pathogens of dogs*. JASVM, 3, 140-153.
237. Ogden, N. H., Ben Beard, C., Ginsberg, H. S., & Tsao, J. I., 2021 – *Possible effects of climate change on ixodid ticks and the pathogens they transmit: Predictions and observations*. Journal of Medical Entomology, 58(4), 1536-1545.
238. Onyiche, T. E., Răileanu, C., Fischer, S., & Silaghi, C., 2021 – *Global Distribution of Babesia Species in Questing Ticks: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on Published Literature*. Pathogens, 10(2), 230.
239. Otranto, D. et al., 2011 – *Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR*. Parasites & vectors, 4(1), 1-6.
240. Otranto, D., 2018 – *Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: from pathways and times of transmission to disease control*. Veterinary parasitology, 251, 68-77.

241. Otranto, D., Dantas-Torres, F., & Breitschwerdt, E. B., 2009 – *Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one*. Trends in Parasitology, 25(4), 157-163.
242. Paduraru, O. A. et al., 2012 – *Zoonotic transmission of pathogens by Ixodes ricinus ticks, Romania*. Emerging infectious diseases, 18(12), 2089.
243. Pantchev, N. et al., 2015 – *Tick-borne diseases (borreliosis, anaplasmosis, babesiosis) in German and Austrian dogs: status quo and review of distribution, transmission, clinical findings, diagnostics and prophylaxis*. Parasitology Research, 114(1), 19-54.
244. Papa, A., Tsioka, K., Kontana, A., Papadopoulos, C., & Giadinis, N., 2017 – *Bacterial pathogens and endosymbionts in ticks*. Ticks and tick-borne diseases, 8(1), 31-35.
245. Papp, C. R., Banea, O. C., & Szekely-Sitea, A. I., 2014 – *Applied ecology and management aspects related to the golden jackal specific ecological system in Romania*. Acta Musei Maramorosiensis I, 1, 1-18.
246. Parry, N., 2016 – *Canine borreliosis: epidemiology, pathogenesis, clinical signs, and diagnostics*. Companion Animal, 21(6), 323-331.
247. Patel, P. K., Patel, S. K., Kumari, P., Garg, R., Saxena, A. C., & Dixit, S. K., 2019 – *Therapeutic management of Babesia canis vogeli infection associated with hepato-renal complications in a dog*. Journal of Entomology and Zoology Studies. 7(2): 202-205.
248. Pavel, I., Miron, L., Raileanu, C., Macovei, I. I., Tronciu, C., & Acatrinei, D. M. 2014 – *Seasonal dynamics of ixodid ticks in Iași urban area*. Lucr. Șt. USAMV Iași, 57, 135-139.
249. Penzhorn, B. L., 2020 – *Don't let sleeping dogs lie: unravelling the identity and taxonomy of Babesia canis, Babesia rossi and Babesia vogeli*. Parasites & vectors, 13(1), 1-9.
250. Penzhorn, BL, Lewis, BD, De Waal, DT și colab., 1995 – *Sterilisation of Babesia canis infections by imidocarb alone or in combination with diminazene*. Journal of the South African Veterinary Association, 66(3), 157-159.
251. Petra, B., Josipa, K., Renata, B. R., & Vladimir, M., 2018 – *Canine babesiosis: where do we stand?*. Acta Veterinaria, 68(2), 127-160.
252. Potkonjak, A. et al., 2016 – *Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia*. Ticks and tick-borne diseases, 7(1), 199-203.
253. Radzijeuskaja, J., Tamoliūnaitė, D., Sabūnas, V., Aleksandravičienė, A., & Paulauskas, A., 2020 – *Prevalence and co-infection of mosquito-and tick-borne pathogens in domestic dogs suspected for canine babesiosis in Lithuania*. Biologija, 66(2).
254. Răileanu, C. Et. al., 2018 – *Molecular evidence of Rickettsia spp., Anaplasma phagocytophilum, and "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" in ticks from natural*

- and urban habitats in Eastern Romania. *Vector-borne and zoonotic Diseases*, 18(7), 343-349.
255. Răileanu, C., Aniță, A., Porea, D., & Savuta, G., 2015 – *Serological survey of lyme disease in dogs from Eastern Romania*. *Lucrări Științifice-Universitatea de Științe Agricole a Banatului, Timișoara, Medicină Veterinară*, 48(3), 179-184.
 256. Răileanu, C., Moutailler, S., Pavel, I., Porea, D., Mihalca, A. D., Savuta, G., & Vayssier-Taussat, M., 2017 – *Borrelia diversity and co-infection with other tick borne pathogens in ticks*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 36.
 257. Reddy, B. S., Sivajothi, S., Reddy, L. V., & Raju, K. S., 2016 – *Clinical and laboratory findings of Babesia infection in dogs*. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(2), 268-272.
 258. René-Martellet, M., Chêne, J., Chabanne, L., Chalvet-Monfray, K., & Bourdoiseau, G., 2013 – *Clinical signs, seasonal occurrence and causative agents of canine babesiosis in France: Results of a multiregional study*. *Veterinary parasitology*, 197(1-2), 50-58.
 259. Reye, A. L., Hübschen, J. M., Sausy, A., & Muller, C. P., 2010 – *Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing Ixodes ricinus ticks from Luxembourg*. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 2923-2931.
 260. Reyers, F., 1992 – *Is azotaemia in canine babesiosis an indication of renal disease*. *Proceedings of the 9th Faculty Day, University of Pretoria, Faculty of Veterinary Science*, 17.
 261. Rizzoli, A. et al., 2014 – *Ixodes ricinus and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health*. *Frontiers in public health*, 2, 251.
 262. Rogovskyy, A. S., Nebogatkin, I. V., & Scoles, G. A., 2017 – *Ixodid ticks in the megapolis of Kyiv, Ukraine*. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(1), 99-102.
 263. Röhrig, E., Hamel, D., & Pfister, K., 2011 – *Retrospective evaluation of laboratory data on canine vector-borne infections from the years 2004-2008*. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 124(9-10), 411-418.
 264. Roopali, B., Mahadappa, P., Satheesha, S. P., Sandeep, H., Kasaralika, V., & Patil, N. A., 2017 – *Acute hepatozoonosis in dogs: a case report*. *Journal of parasitic diseases*, 41(3), 747-749.
 265. Rossati, A., 2017 – *Global warming and its health impact*. *The international journal of occupational and environmental medicine*, 8(1), 7.
 266. Rubel, F. et al., 2016 – *Geographical distribution of Dermacentor marginatus and Dermacentor reticulatus in Europe*. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(1), 224-233.
 267. Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I. G., Acevedo, P., Gortázar, C., & de la Fuente, J., 2012 – *Factors driving the abundance of Ixodes ricinus ticks and the prevalence of zoonotic I. ricinus-borne pathogens in natural foci*. *Applied and environmental microbiology*, 78(8), 2669-2676.

268. Saari, S., Näreaho, A., & Nikander, S., 2018 – *Canine parasites and parasitic diseases*. Academic press.
269. Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., & Solano-Gallego, L., 2015 – *Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe*. Parasites & vectors, 8(1), 1-20.
270. Saleh, M. N., Sundstrom, K. D., Duncan, K. T., Ientile, M. M., Jordy, J., Ghosh, P., & Little, S. E., 2019 – *Show us your ticks: a survey of ticks infesting dogs and cats across the USA*. Parasites & Vectors, 12(1), 1-11.
271. Sarma, K., Mondal, D., Saravanan, M., & Mahendran, K., 2015 – *Evaluation of haemato-biochemical and oxidative indices in naturally infected concomitant tick borne intracellular diseases in dogs*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 5(1), 60-66.
272. Savić, S., Vidić, B., Lazić, S., Lako, B., Potkonjak, A., & Lepšanović, Z., 2010 - *Borrelia burgdorferi in ticks and dogs in the province of Vojvodina, Serbia*. Parasite, 17(4), 357-361
273. Schäfer, I., Volkmann, M., Beelitz, P., Merle, R., Müller, E., & Kohn, B., 2019 – *Retrospective evaluation of vector-borne infections in dogs imported from the Mediterranean region and southeastern Europe (2007–2015)*. Parasites & vectors, 12(1), 1-10.
274. Scheepersa, E., Leisewitz, A. L., Thompson, P. N., & Christopher, M. M., 2011 – *Serial haematology results in transfused and non-transfused dogs naturally infected with Babesia rossi*. Journal of the South African Veterinary Association, 82(3), 136-143.
275. Schoeman, J. P., Rees, P., & Herrtage, M. E., 2007 – *Endocrine predictors of mortality in canine babesiosis caused by Babesia canis rossi*. Veterinary Parasitology, 148(2), 75-82.
276. Semenza, J. C., & Suk, J. E., 2018 – *Vector-borne diseases and climate change: a European perspective*. FEMS microbiology letters, 365(2), fnx244.
277. Sgroi, G., et. al, 2021 – *Tick exposure and risk of tick-borne pathogens infection in hunters and hunting dogs: a citizen science approach*. Transboundary and Emerging Diseases.
278. Shaw, S. E., Binns, S. H., Birtles, R. J., Day, M. J., Smithson, R. C., & Kenny, M. J., 2005 – *Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom*. Veterinary Record, 157(21), 645-648.
279. Shukullari, E., Rapti, D., Visser, M., Pfister, K., & Rehbein, S., 2017 – *Parasites and vector-borne diseases in client-owned dogs in Albania: infestation with arthropod ectoparasites*. Parasitology Research, 116(1), 399-407.
280. Skotarczak, B., & Wodecka, B., 2003 – *Molecular evidence of the presence of Borrelia burgdorferi sensu lato in blood samples taken from dogs in Poland*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 10(1).

281. Skotarczak, B., 2018 – *The role of companion animals in the environmental circulation of tick-borne bacterial pathogens*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 25(3), 473-480.
282. Solano-Gallego, L., & Baneth, G., 2011 – *Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra*. Veterinary parasitology, 181(1), 48-60.
283. Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., & Miró, G., 2016 – *A review of canine babesiosis: the European perspective*. Parasites & vectors, 9(1), 1-18.
284. Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., & Furlanello, T., 2008 – *Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease*. Veterinary parasitology, 157(3-4), 211-221.
285. Sonnberger, B. W. Et al., 2021 – *Vector-borne pathogens in clinically healthy military working dogs in eastern Austria*. Parasitology International, 84, 102410.
286. Sormunen, J. J. et al., 2016 – *Tick-borne bacterial pathogens in southwestern Finland*. Parasites & vectors, 9(1), 1-10.
287. Springer, A., Glass, A., Probst, J., & Strube, C., 2021 – *Tick-borne zoonoses and commonly used diagnostic methods in human and veterinary medicine*. Parasitology research, 1-16.
288. Sréter, T., Széll, Z., & Varga, I. (2005). *Spatial distribution of Dermacentor reticulatus and Ixodes ricinus in Hungary: evidence for change?*. Veterinary parasitology, 128(3-4), 347-351.
289. Stensvold, C. R., Al Marai, D., Andersen, L. O. B., Krogfelt, K. A., Jensen, J. S., Larsen, K. S., & Nielsen, H. V., 2015 – *Babesia spp. and other pathogens in ticks recovered from domestic dogs in Denmark*. Parasites & vectors, 8(1), 1-4.
290. Strobl, A., Künzel, F., Tichy, A., & Leschnik, M., 2020 – *Complications and risk factors regarding the outcomes of canine babesiosis in Central Europe—A retrospective analysis of 240 cases*. Acta Veterinaria Hungarica, 68(2), 160-168.
291. Sykes, J.E., 2013 – *Canine and feline infectious diseases*. Elsevier Health Sciences.
292. Szade, A., Grochot-Przeczek, A., Florczyk, U., Jozkowicz, A., & Dulak, J., 2015 – *Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis*. IUBMB life, 67(3), 145-159.
293. Tack, W., Madder, M., Baeten, L., Vanhellemont, M., Gruwez, R., & Verheyen, K., 2012 – *Local habitat and landscape affect Ixodes ricinus tick abundances in forests on poor, sandy soils*. Forest ecology and management, 265, 30-36.
294. Taylor, M.A., Coop, R.L., & Wall, R.L., 2007 – *Veterinary Parasitology*. Blacwell. Science (3rd edn), UK, 475-484.

295. Trouwborst, A., Krofel, M., & Linnell, J. D., 2015 – *Legal implications of range expansions in a terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (Canis aureus) in Europe*. Biodiversity and Conservation, 24(10), 2593-2610.
296. Tsatsaris, A. et. al., 2016 – *Species composition, distribution, ecological preference and host association of ticks in Cyprus*. Experimental and Applied Acarology, 70(4), 523-542.
297. Tudor, P., Brăslașu, D. E., & Fernoagă, C., 2010 – *Study on natural infestation with hard ticks on dogs in Bucharest*. Scientific Works-University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest Series C, Veterinary Medicine, 56(3/4), 458-462.
298. Tudor, P., Cretu, C. M., Tudor, N., Joita, S., & Fernoaga, C., 2008 – *Babesia canis infection in dogs from Bucharest, Romania*. Program and Abstract Book of the Xth European Multicollloquium of Parasitology, Paris, France, 188.
299. Tulloch, J. S. P., McGinley, L., Sánchez-Vizcaíno, F., Medlock, J. M., & Radford, A. D., 2017 – *The passive surveillance of ticks using companion animal electronic health records*. Epidemiology & Infection, 145(10), 2020-2029.
300. Ullal, T., Birkenheuer, A., & Vaden, S., 2018 – *Azotemia and proteinuria in dogs infected with Babesia gibsoni*. Journal of the American Animal Hospital Association, 54(3), 156-160.
301. Valiakos, G., 2016 – *Bacterial canine vector-borne zoonotic diseases in "One Health" concept*. Int J One Health, 2, 58-68.
302. Vasiliu, G. D., 1961 – *Verzeichnis der Säugetiere Rumäniens*. Säugetierkundliche Mitteilungen, 9(2), 56-58.
303. Veneziano, V. Et al., 2018 – *Distribution and risk factors associated with Babesia spp. infection in hunting dogs from Southern Italy*. Ticks and tick-borne diseases, 9(6), 1459-1463.
304. Vercammen, F., De Deken, R., & Maes, L., 1997 – *Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge*. Veterinary parasitology, 68(1-2), 51-55.
305. Vial, H. J., & Gorenflot, A., 2006 – *Chemotherapy against babesiosis*. Veterinary parasitology, 138(1-2), 147-160.
306. Viljoen, S., O'Riain, M. J., Penzhorn, B. L., Drouilly, M., Vorster, I., & Bishop, J. M., 2021 – *Black-backed jackals (Canis mesomelas) from semi-arid rangelands in South Africa harbour Hepatozoon canis and a Theileria species but apparently not Babesia rossi*. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 24, 100559.
307. Vonesch, N., D'Ovidio, M. C., Melis, P., Remoli, M. E., grazia Ciufolini, M., & Tomao, P., 2016 – *Climate change, vector-borne diseases and working population*. Annali dell'Istituto superiore di sanita, 52(3), 397-405.

308. Wagner, B. et al., 2012 – *Antibodies to Borrelia burgdorferi OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs*. Clinical and Vaccine Immunology, 19(4), 527-535.
309. Walker, M., 2018 – *The biology and ecology of the Sheep Tick Ixodes ricinus*. Antenna: The Royal Entomological Society, 42, 61-65.
310. Weese, J., & Evason, M., 2019 – *Infectious Diseases of the Dog and Cat: A Color Handbook*. CRC Press.
311. Welzl, C., Leisewitz, A. L., Jacobson, L. S., Vaughan-Scott, T., & Myburgh, E., 2001 – *Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis*. Journal of the South African Veterinary Association, 72(3), 158-162.
312. Wright, I., Cull, B., Gillingham, E. L., Hansford, K. M., & Medlock, J., 2018 – *Be tick aware: when and where to check cats and dogs for ticks*. The Veterinary Record, 182(18), 514.
313. Zając, Z., Bartosik, K., Kulisz, J., & Woźniak, A., 2020 – *Ability of adult Dermacentor reticulatus ticks to overwinter in the temperate climate zone*. Biology, 9(7), 145.
314. Zanet, S. Et al., 2020 – *Tick-borne pathogens in Ixodidae ticks collected from privately-owned dogs in Italy: a country-wide molecular survey*. BMC veterinary research, 16(1), 1-10.
315. Zygmier, W., Gójska, O., Rapacka, G., Jaros, D., & Wędrychowicz, H., 2007 – *Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large Babesia in domestic dogs in Warsaw (Poland)*. Veterinary Parasitology, 145(1-2), 146-151.
316. Zygmier, W., Jaros, S., & Wędrychowicz, H., 2008 – *Prevalence of Babesia canis, Borrelia afzelii, and Anaplasma phagocytophilum infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland)*. Veterinary parasitology, 153(1-2), 139-142.

***<https://veterinaryjournalist.ro/totul-despre-transfuzia-de-sange-la-animalele-de-companie/>
accesat în data de 11.01.2022

ANEXA 1 – LISTA ABREVIERILOR

ANNEX 1 – ABBREVIATION LIST

μL – microlitru
μm – micrometru
°C – grade Celsius
adm. – administrare
ADN – acidul dezoxiribonucleic
ALP – fosfataza alcalină
ALT – alaninaminotransferază
BAS – bazofile
BUN – urea nitrogen
C.A. – cale de administrare
CK - creatin kinază
CRE – creatinină
D. – Doză
D.T. – durata tratament
dL – decilitru
EDTA – acidul etilendiaminotetraacetic
ELISA – test imunoabsorbant legat de enzimă
EOS – eozinofile
eșant. – eșantion
F – femele
GGT – Gama-glutamyltransferază
GLOB – globulină
GLU – glucoza serică
h – oră
HCT – hematocrit
HGB – hemoglonină
I. – interval
IFAT – teste de imunofluorescență indirectă
IM – intramuscular
IV – intravenos
kg – kilogram
L – larve
LYM – limfocite
M – masculi
MCH – hemoglobină eritrocitară medie
MCV – volum eritrocitar mediu

mg – miligram
MODS - Sindromul de disfuncție multiplă de organe
MON – monocite
N – nimfe
NEU – neutrofile
NN – nu e necesar
Nr. – număr;
Osp – proteine de suprafață specifice
PCR – reacția de polimerizare în lanț (polymerase chain reaction)
PLT – trombocite
PO – per os
RBC – hematii
RT-PCR – reacția de polimerizare în lanț cu detecție în timp real (reverse transcription polymerase chain reaction)
SC – subcutanat
SIRS - Sindromul de răspuns inflamator sistemic
Spp. – specii
TBIL – bilirubina totală
TP – proteine totale
UI – unități internaționale
WBC – leucocite

ANEXA 2 – LISTA FIGURILOR

ANNEX 2 - FIGURES LIST

Figura 5.1 (a), (b) <i>Babesia canis</i> – frotiu colorant, metoda Diff-Quick, x1000	30
Figura 5.2 Identificare morfologică a căpușelor, stereomicroscop Zeiss Stemi 305, x40	30
Figura 7.1 Teste rapide: (a) Kit SNAP 4DX PLUS; (b) Kit <i>Babesia gibsoni</i> -anticorpi	51
Figura 7.2 Reprezentare grafică a semnelor clinice predominante întâlnite în babesioza canină	54
Figura 7.3 Icter generalizat, câine, femelă, metis ciobănesc	55
Figura 7.4 <i>Babesia canis</i> – identificare morfologică, colorație rapidă Diff-Quick, x1000	55
Figura 7.5 Test <i>Babesia gibsoni</i> -anticorpi – pozitiv	59
Figura 8.1 Stereomicroscop Leica M250c	65
Figura 8.2 Stereomicroscop Zeiss Stemi 305	65
Figura 8.3 Structura studiului	66
Figura 8.4 Reprezentare grafică a speciilor de căpușe identificate morfologic	67
Figura 8.5 Prevalența speciei <i>Dermacentor reticulatus</i>	68
Figura 8.6 Prevalența speciei <i>Ixodes ricinus</i>	69

ANEXA 3 – LISTA TABELELOR

ANNEX 3 – TABLES LIST

Tabelul 2.1 – Speciile <i>Babesia</i> identificate la câini și vectorii acestora	7
Tabelul 2.2 – Protocol terapeutic în babesioza canină	11
Tabelul 2.3 - Protocol terapeutic în erlichioza și anaplasmoza canină	16
Tabelul 2.4 - Protocoale terapeutice utilizate borelioza canină	20
Tabelul 5.1 - Structura studiului	31
Tabelul 5.2 - Gen, categorii de vârstă, rasă, stil de viață, formă clinică de babesioză, istoric de infestare cu căpușe, expunerea căpușelor în timpul vizitei de rutină și prevalența <i>Babesia</i> spp. pentru cei 90 de câini incluși în studiu	33
Tabelul 5.3 - Rezultatele speciilor și stadiilor de dezvoltare a căpușelor (numărul total de căpușe colectate și totalul eșantioanelor) și speciile patogene identificate	35
Tabelul 6.1 - Primerii utilizați în PCR	40
Tabelul 6.2 - Rezultatele speciilor patogene întâlnite în probele de sânge canin	43
Tabelul 6.3 - Prevalența câinilor pozitivi cu <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. incluși în studiu	44
Tabelul 6.4 - Identificarea probelor cu căpușele recoltate de pe câini	45
Tabelul 6.5 - Rezultatele speciilor patogene și co-infecțiile identificate în eșantioanele cu căpușe	46
Tabelul 7.1- Prevalența cazurilor pozitive a babesiozei canine în raport cu rasa, vârsta și genul	52
Tabelul 7.2 - Informații obținute de la proprietari (anamneza)	53
Tabelul 7.3 - Rezultatele analizelor de sânge hematologice	56
Tabelul 7.4 - Rezultatele analizelor de sânge biochimice	58
Tabelul 7.5 - Formule de calcul utilizate în transfuzia sangvină	61
Tabelul 8.1 - Prevalența speciei <i>Rhipicephalus sanguineus</i> complex colectate de la câini	70
Tabelul 8.2 - Prevalența căpușelor colectate de pe câini în urma examinării clinice	71
Tabelul 8.3 - Prevalența infestărilor și a co-infestărilor cu căpușe la câini	72

ANEXA 4 – LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ANNEX 4 – LIST OF PUBLISHED PAPERS

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN REVISTE INTERNAȚIONALE COTATE ISI

În domeniul tezei de doctorat:

1. Ciuca, Lavinia, **Gabriela Martinescu***, Liviu D. Miron, Constantin Roman, Dumitru Acatrinei, Giuseppe Cringoli, Laura Rinaldi, and Maria P. Maurelli 2021. "Occurrence of *Babesia* Species and Co-Infection with *Hepatozoon canis* in Symptomatic Dogs and in Their Ticks in Eastern Romania" *Pathogens* 10, no. 10: 1339. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101339>. IF 3,492.

Alte publicații:

1. Andrei-Cristian LUPU, Mihaela BOMBOȘ, Cristian-Alin BARBACARIU, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, **Gabriela Victoria MARTINESCU**, Liviu Dan MIRON, - Conditioning of praziquantel and florfenicol for some heterologous coinfections of farmed carp, *Revista de Chimie*, vol. 70, nr. 7.2019. IF 1.412.

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE ÎN BAZE DE DATE INTERNAȚIONALE (BDI)

În domeniul tezei de doctorat:

1. **Gabriela MARTINESCU**, Lavinia CIUCĂ, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Andrei LUPU, Larisa IVĂNESCU, Dumitru ACATRINEI, Olimpia IACOB, Liviu MIRON, 2021 - *Correlations regarding the diagnosis and the optimal therapeutic protocol in canine babesiosis*, *Journal Veterinary Medicine Iasi, Scientific Papers Journal*, vol. 64, no.3/2021, 53-58, ISSN 2393-4603.
2. **Gabriela MARTINESCU**, Lavinia Ciucă, Constantin Roman, Dumitru Acatrinei, Larisa Ivănescu, Olimpia Iacob, Maria Paola Maurelli, Liviu Dan Miron, 2022 - *Detection of the co-infections with Borrelia, Anaplasma and Ehrlichia species in dogs with babesiosis in north-eastern Romania*, *Revista Română de Medicină Veterinară –acceptată pentru publicare*.

Alte publicații:

1. Larisa IVĂNESCU, Simona MĂTIUȚ, **Gabriela MARTINESCU**, Adrian BĂLBĂRĂU, Liviu Miron, 2021 - *Toxoplasmosis-a disease with high epidemiological risk in humans and animals*, Journal Veterinary Medicine Iasi, Scientific Papers Journal – vol. 64, no. 1/2021, VETERINARY SERIES, p. 61-71. ISSN 2393-4603.
2. Larisa IVĂNESCU, Simona MĂTIUȚ, **Gabriela MARTINESCU**, Liviu MIRON, 2021 - *Epidemiological risk of toxocarosis in humand and animals in Iași county*, Journal Veterinary Medicine Iasi, Scientific Papers Journal – vol. 64, no. 1/2021, VETERINARY SERIES, p. 52-58. ISSN 2393-4603.
3. Maria Larisa IVĂNESCU, **Gabriela MARTINESCU**, Simona MĂTIUȚ, Dumitru ACATRINEI, Olimpia IACOB, Liviu MIRON, 2020 - *The prevalence of giardiosis in animals and humans in Iasi county with the establishment of zoonotic risk*, Scientific Papers, Veterinary Medicine Series 63 (3) / 2020, USAMV Iași, p. 200-206.
4. IVĂNESCU Larisa, Doina-Simona MĂTIUȚ, **Gabriela MARTINESCU**, Raluca MÎNDRU, MIRON Liviu, 2019 - Case Report: *Demodex Cornei* of Dog Can Also Affect Humans. *ISI Proceedings of the Int.Sci.Congress "Life sciences, a challenge for the future"* p.401-404. ISBN: 978-88-85813-63-2.
5. MÎNDRU Raluca, ROMAN Constantin, LUPU C. Andrei, **Gabriela MARTINESCU** Larisa, IVĂNESCU, ACATRINEI M. Dumitru, GUILLOT Jacques, MIRON Liviu, 2019 - Efficacy Assessment of Afoxolaner (Nexgard®) in Dogs Naturally Infected with *Sarcoptes Scabiei*. . *ISI Proceedings of the Int.Sci.Congress "Life sciences, a challenge for the future"* p.426-431. ISBN: 978-88-85813-63-2.
6. Andrei-Cristian LUPU, Alin BARBACARIU, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, **Gabriela Victoria MARTINESCU**, Andrei-Alexandru CÎMPAN, Liviu Dan MIRON, In vivo study of conjugated diminazene aceturate for ichthyophthiriosis of farmed carp, *Lucr. ȘT. USAMV Iași, seria Medicină Veterinară*, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 61/2018, ISSN 2393-4603, p. 65-75.
7. Andrei-Cristian LUPU, Alin BARBACARIU, Constantin ROMAN, Andrei-Alexandru CÎMPAN, Raluca MÎNDRU, **Gabriela-Victoria MARTINESCU**, Liviu Dan MIRON, (2018) - In vitro study of diminazene aceturate complex with β -cyclodextrin for *Ichthyophthirius multifiliis*, *Lucr. ȘT. USAMV Iași, seria Medicină Veterinară*, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 61/2018, ISSN 2393-4603, p. 58-64.

PREZENTĂRI ORALE

1. **Gabriela MARTINESCU**, Lavinia CIUCĂ, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Andrei LUPU, Larisa IVĂNESCU, Dumitru ACATRINEI, Olimpia IACOB, Liviu MIRON, 2021 - *Correlations regarding the diagnosis and the optimal therapeutic protocol in canine babesiosis*, Life Sciences today for tomorrow – International Congress, octomber 21-22, 2021, Iasi University of Life Sciences (IULS).
2. **Gabriela-Victoria MARTINESCU**, Liviu MIRON (2020) - *"Prevalența infestării cu căpușe și a babesiozei la câinii din Iași (România)"*, Simpozionul Științific Studentesc USAMV Iași, secțiunea Școli doctorale, 27 noiembrie - **mențiune**.
3. **Gabriela-Victoria MARTINESCU**, Lavinia Ciucă, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Larisa IVĂNESCU, Dumitru ACATRINEI, Laura RINALDI, Liviu MIRON (2019) - Occurrence of *Babesia* species in symptomatic dogs from Iasi (Romania), The Anniversary Symposium of Parasitology with International Participation "Celebrating a Century of Romanian Veterinary Parasitology", 21-22 Noiembrie, București.

CĂRȚI

Coautor:

1. HANDBOOK of main zoonotic diseases identified in 4 EU countries: Romania, Italy, Croatia and Lithuania - Miron Liviu (coord.), Dumitru Acatrinei, Olimpia Iacob, Larisa Ivanescu, Lavinia Ciuca, Constantin Roman, Raluca Mindru, Andrei Lupu, Andrei Cimpan, **Gabriela Martinescu**, Elena Velescu, Mioara Matei, Carmen Manciu, Alina Manole, Doina Azoicai, Florentina-Manuela Miron, Gianina-Ana Massari, Anca Colibaba, Cintia Colibaba, Stefan Colibaba, Elza Gheorghiu, Andreea Ionel (2016- 2019) - ZOE/Zoonosis Online Education Project 2016-1-RO01-KA203-024732, Editura "Ion Ionescu de la Brad", ISBN 978-973-147-334-5.
2. Dirofilariosis in humans and animals - Dirofilarioza la om și animale - Miron Liviu (coord.), Dumitru Acatrinei, Olimpia Iacob, Larisa Ivanescu, Lavinia Ciuca, Constantin Roman, Raluca Mindru, Andrei Lupu, Andrei Cimpan, **Gabriela Martinescu**, Elena Velescu, Mioara Matei, Carmen Manciu, Alina Manole, Doina Azoicai, Florentina-Manuela Miron, Gianina-Ana Massari, Anca Colibaba, Cintia Colibaba, Stefan Colibaba, Elza Gheorghiu, Andreea Ionel (2016- 2019) - ZOE/Zoonosis Online Education Project 2016-1-RO01-KA203-024732, Editura "Ion Ionescu de la Brad", ISBN 978-973-147-313-0.
3. La dirofilariose chez les humains et les animaux - Dirofilarioza la om și animale - Miron Liviu (coord.), Dumitru Acatrinei, Olimpia Iacob, Larisa Ivanescu, Lavinia Ciuca, Constantin Roman, Raluca Mindru, Andrei Lupu, Andrei Cimpan, **Gabriela Martinescu**, Elena Velescu, Mioara Matei, Carmen Manciu, Alina Manole, Doina Azoicai, Florentina-Manuela Miron, Gianina-Ana

- Massari, Anca Colibaba, Cintia Colibaba, Stefan Colibaba, Elza Gheorghiu, Andreea Ionel (2016- 2019) - ZOE/Zoonosis Online Education Project 2016-1-RO01-KA203-024732, Editura "Ion Ionescu de la Brad", ISBN 978-973-147-314-7.
4. Malaria - Miron Liviu (coord.), Dumitru Acatrinei, Olimpia Iacob, Larisa Ivanescu, Lavinia Ciuca, Constantin Roman, Raluca Mindru, Andrei Lupu, Andrei Cimpan, **Gabriela Martinescu**, Elena Velescu, Mioara Matei, Carmen Manciu, Alina Manole, Doina Azoicai, Florentina-Manuela Miron, Gianina-Ana Massari, Anca Colibaba, Cintia Colibaba, Stefan Colibaba, Elza Gheorghiu, Andreea Ionel (2016- 2019) - ZOE/Zoonosis Online Education Project 2016-1-RO01-KA203-024732, Editura "Ion Ionescu de la Brad", ISBN 978-973-147-315-4.
5. Le paludisme - Malaria - Miron Liviu (coord.), Dumitru Acatrinei, Olimpia Iacob, Larisa Ivanescu, Lavinia Ciuca, Constantin Roman, Raluca Mindru, Andrei Lupu, Andrei Cimpan, **Gabriela Martinescu**, Elena Velescu, Mioara Matei, Carmen Manciu, Alina Manole, Doina Azoicai, Florentina-Manuela Miron, Gianina-Ana Massari, Anca Colibaba, Cintia Colibaba, Stefan Colibaba, Elza Gheorghiu, Andreea Ionel (2016- 2019) - ZOE/Zoonosis Online Education Project 2016-1-RO01-KA203-024732, Editura "Ion Ionescu de la Brad", ISBN 978-973-147-316-1.