

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: PARAZITOLOGIE ȘI BOLI PARAZITARE

Teză de doctorat

COORDONATOR DOCTORAT,
PROF. UNIV. DR. LIVIU DAN MIRON

DOCTORAND,
CÎMPAN ANDREI ALEXANDRU

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ “ION IONESCU DE LA
BRAD” IAȘI FACULTATEA DE MEDICINĂ
VETERINARĂ**

**DOMENIUL: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: PARAZITOLOGIE ȘI BOLI
PARAZITARE**

Școala doctorală de Medicină Veterinară

Doctorand,

CÎMPAN ANDREI ALEXANDRU

Teză de doctorat

Coordonator doctorat,

Prof. univ. dr. Liviu Dan MIRON

**IAȘI
2020**

**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND
VETERINARY MEDICINE
“ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION: PARASITOLOGY AND PARASITIC
DISEASES**

PhD student,

CÎMPAN ANDREI ALEXANDRU

DOCTORAL THESIS

PhD coordinator,

PhD, Prof. Liviu Dan MIRON

**IAȘI
2020**

TEZĂ DE DOCTORAT

EPIDEMIOLOGIA UNOR PARAZITAZE TRANSMISE DE VECTORI LA CÂINE ÎN ROMÂNIA

Coordonator doctorat,

Prof. univ. dr. Liviu Dan MIRON

Doctorand,

Cîmpan Andrei Alexandru

**IAȘI
2020**

DOCTORAL THESIS

THE EPIDEMIOLOGY OF VECTOR- BORNE PARASITIC DISEASES OF DOGS FROM ROMANIA

PhD coordinator,

PhD, Prof. Liviu Dan MIRON

PhD student,

Cîmpan Andrei Alexandru

**IAȘI
2020**

CUPRINS

MULȚUMIRI.....	i
REZUMAT.....	iii
INTRODUCERE.....	xiv

PARTEA I -STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII-

CAPITOLUL I IMPORTANȚA LEISHMANIOZEI CANINE.....	1
1.1 Importanța leishmaniozei.....	1
1.2 Biologia, ecologia și răspândirea flebotomilor	3
1.3 Metode de control a răspândirii leishmaniozei provocată de infecția cu <i>L. infantum</i>	5
1.3.1 Prevenția prin eutanasia câinilor seropozitivi	5
1.3.2 Prevenția prin controlul vectorilor	6
1.3.3 Prevenția prin vaccinare.....	7
1.4 Tablou clinic	8
1.4.1 Leziunile cutanate	9
1.4.2 Afecțiuni renale.....	10
1.4.3 Afecțiuni oculare și perioculare	10
1.4.4 Semne paraclinice	11
1.5 Răspândirea leishmaniozei canine	11
CAPITOLUL II IMPORTANȚA BABESIOZEI LA CÂINE	13
2.1 Introducere	13
2.2 Ciclul biologic.....	13
2.3 Manifestări clinice	14
2.3.1 Manifestări clinice și semne paraclinice generale.....	14
2.3.2 Manifestări clinice și paraclinice specifice infecțiilor cu <i>B. canis</i>	15
2.3.3 Manifestări clinice și paraclinice specifice infecțiilor cu <i>B. vogeli</i> ...	15
2.3.4 Manifestări clinice și paraclinice specifice infecțiilor cu <i>B. gibsoni</i> .	15
2.3.5 Manifestări clinice și paraclinice specifice infecțiilor cu <i>B. vulpes</i> ..	16
2.4 Epidemiologia babesiozei canine.....	16
CAPITOLUL III IMPORTANȚA HEPATOZOONOZEI LA CÂINE	17
3.1 Introducere	17
3.2 Ciclul biologic.....	17
3.3 Manifestări clinice și paraclinice	20
3.4 Epidemiologie	21
CAPITOLUL IV IMPORTANȚA DIROFILARIOZEI LA CÂINE.....	23

4.1	Dirofilarioza canină	23
4.2	Infecții umane	24
4.3	Infecții la animale sălbatice.....	24
4.4	Ciclul în vectorul artropod	25
4.5	Ciclul în gazda definitivă	27
4.6	Răspândirea în Europa	28

PARTEA A-II-A

-CERCETĂRI PROPRII-

CAPITOLUL V EPIDEMIOLOGIA LEISHMANIOZEI CANINE ÎN SUDUL ROMÂNIEI..... 31

5.1	Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor	31
5.2	Material și metodă.....	33
5.2.1	Colectarea probelor	33
5.2.2	Amplasarea capcanelor pentru flebotomi.....	34
5.2.3	Extracția de ADN și analiză qPCR	35
5.2.4	Analiză serologică.....	36
5.3	Rezultate și discuții	36
5.4	Concluzii parțiale	38

CAPITOLUL VI STUDIU SEROEPIDEMIOLOGIC AL LEISHMANIOZEI CANINE ÎN SUD-ESTUL ROMÂNIEI39

6.1	Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor	39
6.2	Material și metode.....	40
6.2.1	Colectarea probelor	40
6.2.2	Analiză serologică.....	41
6.2.3	Analiză statistică	42
6.3	Rezultate și discuții	42
6.4	Concluzii parțiale	44

CAPITOLUL VII DISTRIBUȚIA ȘI PREVALENȚA BABESIOZEI ȘI HEPATOZOONOZEI CANINE ÎN SUDUL ROMÂNIEI45

7.1	Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor	45
7.2	Material și metodă.....	47
7.2.1	Colectarea probelor	47
7.2.2	Extracția de ADN.....	47
7.2.3	Screening molecular.....	48
7.2.4	Secvențierea și analiza filogenetică	49
7.2.5	Analiză statistică	49
7.3	Rezultate	49

7.3.1 Diagnostic molecular și analiză statistică	49
7.3.2 Studiu filogenetic	54
7.4 Discuții.....	57
7.5 Concluzii parțiale.....	59
CAPITOLUL VIII EPIDEMIOLOGIA DIROFILARIOZEI LA CÂINI DIN ADĂPOSTURI DIN SUDUL ROMÂNIEI	61
8.1 Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor	61
8.2 Material și metodă.....	64
8.2.1 Colectarea probelor	64
8.2.2 Extracție de ADN.....	64
8.2.3 Screening molecular pentru filarii prin Real Time PCR și PCR clasic	64
8.3.4 Secvențiere.....	67
8.2.5 Analiză statistică	68
8.3 Rezultate	68
8.3.1 Diagnostic molecular și analiză statistică	68
8.3.2 Studiu filogenetic	70
8.4 Discuții.....	75
8.5 Concluzii parțiale.....	75
CAPITOLUL IX FOLOSIREA TEHNICII MALDI-TOF PENTRU IDENTIFICAREA SPECIEI DE FLEBOTOMI	77
9.1 Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor	77
9.2 Materiale și metode.....	79
9.2.1 Colectarea flebotomilor.....	79
9.2.2 Identificarea morfologică a flebotomilor	81
9.2.3 Prelucrarea probelor pentru tehnica MALDI-TOF	82
9.2.4 Setările spectrometrului de masă MALDI-TOF	84
9.2.5 Crearea bazei de date, de referință și identificarea de specie a flebotomilor, prin metoda “blind test”	85
9.3 Rezultate obținute	85
9.4 Concluzii parțiale.....	89
CAPITOLUL X CONCLUZII FINALE.....	91
BIBLIOGRAFIE.....	93
ANEXA I ABREVIERI.....	109
ANEXA II LISTA TABELELOR.....	110
ANEXA III LISTA FIGURILOR.....	112
ANEXA IV LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE.....	119

ABSTRACT

ACKNOWLEDGEMENTS.....	ii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUCTION.....	xv

PART I

-CURRENT STATE OF KNOWLEDGE-

CHAPTER I THE IMPORTANCE OF CANINE LEISHMANIOSIS.....	1
1.1 The importance of leishmaniosis	1
1.2 The biology, ecology and distribution of sandflies	3
1.3 <i>L. infantum</i> prevention methods.....	5
1.3.1 Prevention by culling seropositive dogs	5
1.3.2 Prevention by vector control	6
1.3.3 Prevention by vaccination.....	7
1.4 Clinical manifestations.....	8
1.4.1 Skin lesions	9
1.4.2 Renal involvement	10
1.4.3 Ocular and periocular lesions.....	10
1.4.4 Paraclinical signs.....	11
1.5 The epidemiology of canine leishmaniosis.....	11
CHAPTER II THE IMPORTANCE OF CANINE BABESIOSIS	13
2.1 Introduction.....	13
2.2 Life cycle	13
2.3 Clinical and paraclinical manifestations	14
2.3.1 General clinical and paraclinical manifestations.....	14
2.3.2 Clinical and paraclinical manifestations specific to <i>B. canis</i>	15
2.3.3 Clinical and paraclinical manifestations specific to <i>B. vogeli</i>	15
2.3.4 Clinical and paraclinical manifestations specific to <i>B. gibsoni</i>	15
2.3.5 Clinical and paraclinical manifestations specific to <i>B. vulpes</i>	16
2.4 The epidemiology of canine babesiosis	16
CHAPTER III THE IMPORTANCE OF CANINE HEPATOZOONOSIS	17
3.1 Introduction.....	17
3.2 Life cycle	17
3.3 Clinical manifestations.....	20
3.4 Epidemiology.....	21

CHAPTER IV THE IMPORTANCE OF CANINE DIROFILARIASIS	23
4.1 Canine dirofilariasis	23
4.2 Human infections	24
4.3 Wildlife infections	24
4.4 Life cycle in the arthropod host	25
4.5 Life cycle in the vertebrate host	27
4.6 Epidemiology in Europe	28

PART II
-PERSONAL CONTRIBUTIONS-

CHAPTER V THE EPIDEMIOLOGY OF CANINE LEISHMANIOSIS IN THE SOUTH OF ROMANIA	31
5.1 Context of scientific research.....	31
5.2 Materials and methods	33
5.2.1 Sample collection.....	33
5.2.2 Sandfly sampling.....	34
5.2.3 DNA extraction and qPCR analysis.....	35
5.2.4 Serological screening	36
5.3 Results and discussions.....	36
5.4 Partial conclusions	38
CHAPTER VI SEROEPIDEMIOLOGICAL STUDY OF CANINE LEISHMANIOSIS IN THE SOUTH-EAST OF ROMANIA	39
6.1 Context of scientific research.....	39
6.2 Materials and methods	40
6.2.1 Sample collection.....	40
6.2.2 Serological screening	41
6.2.3 Statistical analysis.....	42
6.3 Results and discussions.....	42
6.4 Partial conclusions	44
CHAPTER VII THE DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF BABESIOSIS AND HEPATOZOONOSIS IN DOGS FROM THE SOUTH OF ROMANIA	45
7.1 Context of scientific research.....	45
7.2 Materials and methods	47
7.2.1 Sample collection.....	47
7.2.2 DNA extraction.....	47
7.2.3 Molecular screening by PCR	48

7.2.4 Sequencing and phylogenetic analysis.....	49
7.2.5 Statistical analysis.....	49
7.3 Results.....	49
7.3.1 Molecular screening and statistical analysis	49
7.3.2 Phylogenetic analysis.....	54
7.4 Discussions	57
7.5 Partial conclusions	59
CHAPTER VIII EPIDEMIOLOGY OF CANINE DIROFILARIASIS IN SHELTER DOGS FROM THE SOUTH OF ROMANIA	61
8.1 Context of scientific research.....	61
8.2 Materials and methods	64
8.2.1 Sample collection.....	64
8.2.2 DNA extraction.....	64
8.2.3 Molecular screening by Real Time PCR and classical PCR.....	64
8.2.4 Sequencing.....	67
8.2.5 Statistical analysis.....	68
8.3 Results.....	68
8.3.1 Molecular screening and statistical analysis	68
8.3.2 Phylogenetic analysis.....	70
8.4 Discussions	75
8.5 Partial conclusions	75
CHAPTER IX THE USE OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY FOR THE IDENTIFICATION OF SANDFLIES	77
9.1 Context of scientific research.....	77
9.2 Materials and methods	79
9.2.1 Sandfly collection	79
9.2.2 Morphological identification of sandflies.....	81
9.2.3 Sample omogenisation for MALDI-TOF.....	82
9.2.4 MALDI-TOF parameters	84
9.2.5 Reference database creation and blind test	85
9.3 Results.....	85
9.4 Partial conclusions	89
CHAPTER X FINAL CONCLUSIONS.....	91
REFERENCES.....	93
ANNEX I ABBREVIATIONS.....	109
ANNEX II LIST OF TABLES.....	110
ANNEX III LIST OF FIGURES.....	112
ANNEX IV LIST OF SCIENTIFIC PAPERS.....	119

MULȚUMIRI

Doresc să adresez mulțumiri **D-lui Prof. Univ. Dr. Liviu Dan Miron**, conducătorul științific și colegilor de la disciplină.

Mulțumesc în mod special colaboratorilor din străinătate pentru găzduire și îndrumare:

D-lui Prof. Dr. Gad Baneth, Facultatea de Medicină Veterinară “Koret”, Rehovot, Israel,

D-lui Prof. Dr. Elias Papadopoulos, Facultatea de Medicină Veterinară, Universitatea Aristotel, Salonic, Grecia,

D-nei Prof. Dr. Anastasia Diakou, Facultatea de Medicină Veterinară, Universitatea Aristotel, Salonic, Grecia,

D-lui Prof. Dr. Philippe Parola, Research unit for Vectors - Tropical and Mediterranean Infections (VITROME) - Aix Marseille University, Marsilia, Franța,

Mulțumesc acțiunii COST TD1303 “European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections” (EurNegVec) pentru suportul oferit desfășurării activităților de cercetare.

Adresez mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare pentru analiza competență a rapoartelor de cercetare și pentru recomandările oferite pe durata studiilor doctorale.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank **PhD, Prof. Liviu Dan Miron**, my scientific coordinator and my colleagues from the discipline.

I would also want to thank all the foreign colaborators for their hospitality and guidance:

PhD, Prof. Gad Baneth, Koret School of Veterinary Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel,

PhD, Prof. Elias Papadopulos, Faculty of Veterinary Medicine Aristotle University of Thessaloniki, Greece,

PhD, Prof. Anastasia Diakou, Faculty of Veterinary Medicine Aristotle University of Thessaloniki, Greece,

PhD, Prof. Philippe Parola, Research unit for Vectors - Tropical and Mediterranean Infections (**VITROME**) - Aix Marseille University, France,

I am also thankful to the COST Action TD1303 “European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections” (EurNegVec) for supporting the scientific research.

Finally I would like to thank the members of guidance committee for the competent analysis of research reports.

REZUMAT

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

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

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

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

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

Capitolului III este intitulat **“Importanța hepatozoozei la câine”**, și este organizat în mod asemănător cu capitolul II. Este format din patru subcapitole. Primul subcapitol este introductiv și este urmat de un subcapitol ce

descrie ciclul vital al parazitului *Hepatozoon canis*. Subcapitolul trei descrie manifestările clinice și paraclinice întâlnite la câinii infectați, iar ultimul subcapitol prezintă epidemiologia acestui parazit.

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

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

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

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

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

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

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

sud-estul României. Acest studiu are motivația de a înțelege dacă câinii din această regiune sunt expuși infecțiilor cu *L. infantum*.

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

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

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

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

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

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

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

Capitolul VIII este intitulat **“Epidemiologia dirofilariozei la câinii din adăposturi din sudul României”**. Acesta este ultimul capitol din partea a-II-a ce este bazat pe un studiu epidemiologic. Regiunea studiată este cea în care au avut

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

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

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

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

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

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

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

Nu toate speciile de flebotomi pot să transmită leishmanioza, iar din acest motiv identificarea de specie este importantă. Pentru foarte mult timp flebotomii au fost identificați morfologic, dar această metodă necesită personal specializat și

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

The title of this doctoral thesis is “**The epidemiology of vector-borne parasitic diseases of dogs from Romania**” and is composed of several studies meant to help understand the phenomenon that leads to changes in the prevalence and distribution of vector-borne parasitic diseases of dogs. These changes have not only been observed in Romania but also all over the world.

This thesis is structured in two parts, according to the required standards: the first part is named “**Current state of knowledge**” and the second part is named “**Personal contributions**” and describes all scientific results obtained during the doctoral thesis.

The first part of the thesis, called “**Current state of knowledge**”, provides up-to-date, general knowledge about each parasitic disease studied in this thesis. Each chapter of the first part presents information that highlights the impact the parasitic diseases studied in this thesis have on the health of dogs but also on that of humans.

The first chapter, called “**The importance of canine leishmaniosis**” is split in five subchapters. In the first subchapter we present data that shows the impact that *Leishmania* spp. infections have on the health of animals and humans. In the second subchapter we describe the biology and ecology of sandflies. These arthropods are vectors for *Leishmania infantum* and represent the main mode of transmission for this parasite. In subchapter three we present the main methods of prevention of canine leishmaniosis. The effectiveness of each method is also discussed and examples for the application of each method are provided. Subchapter four describes the clinical and paraclinical manifestations of *L. infantum* infections in dogs and the last subchapter describes the epidemiological situation of canine *L. infantum* infections in Europe and in Romania.

Chapter II is named “**The importance of canine babesiosis**”, it is divided in four subchapters and presents general and current knowledge that highlights the importance of canine babesiosis for the health of dogs. The first subchapter presents a short history that describes the first reports of *Babesia* spp. infections. Subchapter two describes the life cycle of *Babesia* spp. in the vertebrate and arthropod host.

Subchapter three describes the clinical and paraclinical signs that are specific to *Babesia* species that infect dogs from Europe: *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, and *Babesia gibsoni*. The last subchapter explains the epidemiological situation of canine babesiosis in Europe.

Chapter III is called “**The importance of canine hepatozoonosis**” and is structured similarly to chapter II. It is subdivided in four subchapters. The first subchapter is an introduction and the second describes the life cycle of *Hepatozoon canis*. The third subchapter describes the clinical and paraclinical signs of canine *H. canis* infections and the last subchapter describes the epidemiological situation of this infection in Europe

The last chapter of the first part is called “**The importance of canine dirofilariasis**” and is divided in six subchapters. Like in previous chapters, the first subchapter provides an introduction. We describe the first recorded reports of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* infections, the localisation of the parasite in the case of canine, feline or human infections and also a description of transmission of this parasite. In subchapter two, we present the particularities of *D. immitis* and *D. repens* infection in humans and in subchapter three we discuss about why infections in wild animals play a role in maintaining these infections in a region. Subchapter four and five describe the life cycle of *D. immitis* and *D. repens* in vertebrate host, but also in the arthropod, mosquito host. The final subchapter describes the epidemiology of *D. immitis* and *D. repens* in Europe and particularly in Romania.

The second part of the thesis, named “**Personal contributions**”, is divided in five chapters. In this part we present and discuss the results obtained during the experimental part of the thesis.

Chapter V is the first chapter of the second part and is named “**The epidemiology of canine leishmaniosis in the south of Romania**”. The south of Romania is the region where most canine and human *Leishmania infantum* infections have been reported. In this region there have also been the most reports of vector-competent sandflies. After a period of approximately 50 years since the last autochthonous *L. infantum* infections have been eliminated from Romania, there have been new reports of autochthonous canine infections, but also one infection in a jackal and one human infection.

In this study we present an epidemiological study of canine *L. infantum* infections in the south of Romania. This study is meant to determine if canine leishmaniosis is re-emerging in Romania.

We collected samples of serum, blood and eye swabs from 300 dogs, from the counties of Mehedinți, Dolj, Teleorman and Ialomița. The blood and eye

swabs samples from each dog were used to extract DNA. A qPCR assay was used to detect *L. infantum* specific DNA in the nucleic acid samples. The serum samples were used in an ELISA assay in order to detect anti-*L. infantum* antibodies.

Both qPCR and ELISA tests were negative for all samples but in spite of these results there is still the risk that canine leishmaniosis will become endemic in Romania again.

Chapter VI is entitled “**Seroepidemiological study of canine leishmaniosis in the south-east of Romania**”. As the previous chapter, this study is focused on canine *L. infantum* infections, but this is a serological study, focused on the south-east of Romania. As mentioned in the previous chapter most reports of *L. infantum* infections are from the south of the country, but there is no information about the epidemiology of this infection from the south east of Romania. The role of this study is to determine in dogs from the south-east of Romania are exposed to *L. infantum* infections.

Serum samples were collected from 110 dogs from the counties of Călărași and Galați. All samples were tested using an ELISA assay and 5/110 samples were positive for anti-*L. infantum* antibodies. All five positive samples were from Galați county and the total prevalence was 4.54%. This study shows that dogs from the south-east of Romania are exposed to *L. infantum* infections.

Chapter VII is entitled “**The distribution and prevalence of babesiosis and hepatozoonosis in dogs from the south of Romania**” and is an epidemiological study of canine hepatozoonosis and babesiosis that in the south of Romania. The studied region was the same as that of chapter V. There have been several studies in Romania about *Babesia* spp. infections but there is still a need for a comprehensive epidemiological study on this subject. Canine babesiosis is considered by most veterinarians to be a particularly important parasitic disease.

Hepatozoon canis infections are less pathogenic than *Babesia* spp. infections but there is very little known about the epidemiology of canine hepatozoonosis in Romania. This lack of epidemiological data is the main reason we chose to study this infection.

Blood samples were collected from 300 dogs, as mentioned in chapter V. DNA was extracted from all blood samples. All DNA samples were tested using an aspecific PCR assay meant to amplify DNA fragments of bot *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. All samples positive to this first assay were tested again using a PCR assay specific for *Babesia* spp. and one for *H. canis*. Samples that were

positive for the specific PCR assays were sequenced in order to confirm the diagnosis.

In this study we report a prevalence of 47.6% for *H. canis* and 9.6% for *Babesia* spp. (*B. canis* 7% and *B. vogeli* 2.6%). We reported statistically significant differences in the prevalence of these infections between counties. The highest prevalence of *H. canis* and *B. vogeli* infections were reported in the most western counties and the highest prevalence of *B. canis* infections was reported in the most eastern counties. The phylogenetic study showed that sequences from this study are similar to sequences previously reported in Romania or in nearby countries such as Hungary, Turkey or Slovakia.

This study reports a surprisingly high prevalence of *H. canis* in the south of Romania and infections with *B. canis* and *B. vogeli* in the counties from the south of Romania. We believe that the information presented in this study is of use to veterinarians working in this region.

Chapter VIII is entitled “**Epidemiology of canine dirofilariasis in shelter dogs from the south of the Romania**”. This is the last chapter of the second part that describes an epidemiological study. This epidemiological study was carried out in the same region as the studies from chapters V and VII. Like all the other diseases presented in this thesis, canine dirofilariosis is also a vector-borne disease that is of importance for veterinarians from Romania.

In Romania there have been published several studies about *D. repens* and *D. immitis* infections in dogs. The majority of these studies are based on morphological identification of microfilaria or the detection of anti-*D. immitis* antibodies. In our study, we take advantage of the sensibility and specificity of qPCR in order to determine the prevalence of filarial infections in dogs from the south of Romania.

Blood samples were collected from 300 dogs and DNA was extracted from all blood samples. All DNA samples were first tested using a qPCR in order to take advantage of the great sensibility of this method. All positive samples to this first screening were tested again using a classical PCR assay that produces a longer amplicon, suitable for sequencing. Coinfected samples confirmed with a third classical PCR assay using primers specific for *D. immitis* and *D. repens*. The amplicons of positive samples were purified and sequenced.

We report a prevalence of 11.66% (35/300) for *D. repens*, 4.66% (14/300) for *D. immitis* and 1.33% (4/300) for *A. reconditum*. There were no statistically significant differences of prevalence between counties.

This study achieved the objective of providing accurate data about the prevalence of *Dirofilaria* spp. infections in stray dogs from the south of Romania.

We believe this information is of use to veterinarians but considering the zoonotic potential of these infections, we consider this study to be of interest to human health professionals as well.

Chapter IX is named “**The use of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of sandflies**”. This is the last chapter of the thesis and it is focused on the use of the MALDI-TOF mass spectrometry technique in order to identify sandflies.

The MALDI-TOF technique has been used for a long time in the field of microbiology as a cheap, fast and reliable alternative method to identify microorganism such as bacteria or fungi. In time, new applications have been discovered for this technique. The use of this technique in the field entomology, to identify important arthropods, is particularly relevant to our study.

Sandflies are arthropods important for the spread of canine leishmaniosis. The bite of female sandflies is the main mode of transmission of *Leishmania infantum*. Not all sandfly species are vectors for canine leishmaniosis and because of this it is very important to be able to identify accurately the species of sandfly. For many years, sandflies have been identified morphologically but this method is time-consuming and requires specialised, experienced personnel. In recent years, many researchers have chosen to use molecular biology techniques in order to identify sandflies but this can be a very costly alternative. The MALDI-TOF technique has been proven to be an efficient, cheap and fast alternative to reliably identify sandflies.

CDC light traps are indispensable tools for studying hematophagous arthropods with positive phototropism but these instruments come at a significant cost. There are few producers worldwide and because of this, there is often a significant shipping cost added to the total cost of these traps. To circumvent this cost issue, we built our own CDC style light traps using available materials. The light traps were used to collect sandflies from 21 collection points, from all four regions from the north of Greece. We identified morphologically a total of 110 sandflies (44 female and 66 male) of which 48 were identified as *Phlebotomus tobbi*, 21 *Sergentomya minuta*, 25 *Phlebotomus neglectus*, 13 *Phlebotomus perfiliewi*, 1 *Phlebotomus papatasi* and 2 *Phlebotomus simici*.

Sample homogenisation is an important step for the MALDI-TOF analysis but manual homogenisation is time-consuming and very often leads to differences in the quality of the spectra between operators. To avoid this type of issues we developed an automatic homogenisation protocol for sandflies.

Some of the spectra obtained after the MALDI-TOF analysis were used for the creation of a database necessary for identification. We created a database

for the identification of *Phlebotomus tobbi*, *Sergentomya minuta*, *Phlebotomus neglectus*, and *Phlebotomus perfiliewi*. It was not possible to create a database for *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus simici* because of the small number of samples. These last two species were only identified morphologically.

This last study has completed the objective of facilitating the study of sandflies by improving the methods of capture and identification of sandflies by MALDI-TOF.

The objective of this thesis is to complete and update our knowledge about the epidemiology of canine leishmaniosis, babesiosis, hepatozoonosis and dirofilariosis in the context of the world-wide changes of prevalence and distribution of vector-born diseases.

INTRODUCERE

Bolile transmise de artropode sau bolile vectoriale reprezintă una dintre principalele probleme ce afectează sănătatea oamenilor și animalelor din toată lumea. Leishmanioza, malaria, filariozele, babesioza, virusul zika și west nile sunt doar câteva dintre cele mai cunoscute infecții transmise de vectori.

Specificul acestui grup de infecții este că sunt influențate foarte mult de climă și, din acest motiv, zone geografice și climatice diferite sunt în general afectate în proporții diferite, de boli diferite. Zone cu climă propice pentru dezvoltarea unui artropod ce poate fi vector prezintă, în general, prevalențe crescute ale acestor infecții. Datorită schimbărilor climatice, dar și altor schimbări de habitat induse sau nu de om, au fost raportate modificări semnificative ale prevalenței și distribuției ale multor boli vectoriale.

Aceste schimbări epidemiologice prezintă o provocare pentru foarte multe țări dezvoltate din vestul Europei, ce au investit de-a lungul anilor resurse considerabile pentru a preveni și a înțelege răspândirea acestor boli și, cu atât mai mult, pentru țările din Europa de Est, unde pentru mult timp au fost posibilități mult mai reduse și nu a fost cu putinta efectuarea de testări în masă bazate pe biologia moleculară. Este clar că în România încă există regiuni în care cunoștințele despre epidemiologia unor boli de importanță pentru medicina veterinară nu sunt la un nivel asemănător cu cel din vestul Europei. Această lucrare caută să contribuie la remedierea acestei disparități de cunoștințe

Scopul acestei lucrări este de a obține noi informații despre epidemiologia unor boli vectoriale, importante pentru sănătatea câinilor, dar și cu posibile implicații pentru sănătatea umană. Am ales să studiem babesioza canină pentru impactul semnificativ asupra sănătății câinilor, *Dirofilaria* spp. și *Leishmania* spp., care prezintă un risc pentru sănătatea animalelor, dar și a oamenilor, și hepatozoonoza canină, o infecție a cărei epidemiologii este foarte puțin cunoscută în România.

Pentru îndeplinirea scopului propus au fost stabilite și îndeplinite cinci obiective generale: (i) studii epidemiologice ale leishmaniozei canine în sudul României prin metode serologice și de biologie moleculară, (ii) studiu epidemiologic bazat pe biologie moleculară al babesiozei și hepatozoonozei în sudul României, (iii) studiu epidemiologic bazat pe biologie moleculară a dirofilariozei canine în sudul României (iv) stabilirea unei metode de omogenizare automată a flebotomilor pentru analiza MALDI-TOF (v) crearea unei baze de date de referință MALDI-TOF și folosirea acesteia pentru identificarea cu succes a patru specii de flebotomi capturați.

INTRODUCTION

Diseases that are transmitted by arthropods or vector-borne diseases are one of the main health concerns that affect both animals and humans around the world. Diseases such as leishmaniosis, malaria, filariasis, babesiosis, Zika and West Nile are only some of the most well-known vector-borne infections.

The particularity of this group of diseases is that climate plays an important role on what diseases are present in a certain region and on the prevalence of the diseases. Because of this characteristic, regions with different climate are affected by different diseases and in different proportions. Naturally this happens because regions with a climate suitable for one particular vector are often seen to have a higher prevalence of infections transmitted by said vector.

For some years, scientists reported significant changes in the prevalence and distribution of many vector-borne diseases and this is mainly attributed to climate change and other changes of habitat.

These changes represent a significant challenge to many countries from the west of Europe that had to invest considerable resources to understand and to prevent the spread of these diseases. This situation represented an even bigger challenge to the counties of Eastern Europe that did not have in the past the resources to carry large-scale epidemiological studies based on molecular biology.

It is clear that for the reasons mentioned above, in Romania the knowledge about vector-borne diseases is not at the same level as in the west of Europe. This scientific work is meant to help bridge the gap of knowledge in this field, between the west and east of Europe.

Our study aims to obtain new information about the epidemiology of some vector-borne diseases that are important for the health of dogs but also have a role to play in the health of humans. In this study we chose to focus on four vector-borne diseases. We chose to study canine babesiosis for the significant impact of this disease on the health of dogs. We chose to study canine filariasis and canine leishmaniosis two important diseases in dogs that can also affect the health of humans. Finally, we also chose to study canine hepatozoonosis because there is scarce knowledge about the epidemiology of this disease in Romania.

In order to carry out our study we fixed and fulfilled five main objectives: (i) epidemiological study of canine leishmaniosis in the south and south-east of Romania using serology and molecular biology techniques, (ii) epidemiological study of canine babesiosis and hepatozoonosis in the south of Romania, using

molecular biology techniques, (iii) epidemiological study of canine filariasis in the south of Romania, using molecular biology techniques, (iv) develop a method for automatic homogenization of sandfly samples for MALDI-TOF analysis, (v) development of a MALDI-TOF database that can be used for the identification of four species of sandflies and successfully using said database to identify captured sandflies.

PARTEA I
-STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII-

PART I
-CURRENT STATE OF KNOWLEDGE-

CAPITOLUL I IMPORTANȚA LEISHMANIOZEI CANINE

CHAPTER I THE IMPORTANCE OF CANINE LEISHMANIOSIS

1.1 Importanța leishmaniozei

Leishmanioza este una dintre cele mai importante boli infecțioase la nivel mondial dar afectează în mod special populații din țări în curs de dezvoltare și populații sărace din zone rurale sau suburbane (Alvar, Yactayo, și Bern 2006).

Câinii pot fi infectați cu mai multe specii de *Leishmania*, dar cel mai important agent etiologic al leishmaniozei canine (CanL) este *L. infantum*. Infecțiile cu *L. infantum* pot duce la manifestări cutanate și viscerale (Dantas-Torres et al. 2012).

După cum se poate observa și din tabelul 1.1, câinii pot fi infectați de cel puțin 11 alte specii de *Leishmania*. În pofida acestui fapt, aceștia reprezintă un rezervor important doar pentru infecțiile cu *L. infantum* (Dantas-Torres 2007; Dantas-Torres et al. 2012).

Infecțiile umane cu mai multe specii zoonotice de *Leishmania* pot duce la leishmanioză umană, ce se poate manifesta în diverse moduri, depinzând de statusul imunitar al gazdei și de specia de *Leishmania* în cauză. Leishmanioza umană se poate manifesta ca leishmanioză viscerală, ce implică organele interne și poate duce la moarte dacă rămâne netratată, leishmanioza cutanată, ce se manifestă prin leziuni și ulceratii la nivelul pielii, ce în timp cicatrizează, și leishmanioza mucocutanată, ce se manifestă prin leziuni la nivelul mucoaselor și a pielii, ce pot duce la desfigurare (Solano-Gallego et al. 2009).

Paraziții din genul *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) sunt protozoare ce au un impact important asupra sănătății animalelor, dar și a oamenilor. Acești paraziți infectează câini de pe toate continentele, în afară de Oceania, și sunt transmiși de la o gazdă la alta prin intermediul flebotomilor din genul *Phlebotomus* în Europa, Asia și Africa sau din genul *Lutzomyia* pe continentul American (Dantas-Torres 2007).

Tabel 1.1: Tabelul reprezintă speciile de leishmania ce afectează câinii, distribuția geografică și vectorii ce transmit fiecare specie de leishmania. Cu excepția *L. arabica*, toate speciile au potențial zoonotic dar câinele este considerat un rezervor important doar pentru *L. infantum* (Dantas-Torres et al. 2012)

Table 1.1: The table presents all leishmania species that infect dogs. The geographic distribution and the competent vector is presented for each species as well. With the exception of *L. arabica*, all species are zoonotic but the dog is only considered the main reservoir for *L. infantum* (Dantas-Torres et al. 2012)

<i>Leishmania</i> spp.	Vector	Distribuție geografică
<i>L. amazonensis</i>	<i>L. flaviscutellata</i> , <i>L. nociva</i> , <i>L. whitmani</i>	Brazilia
<i>L. arabica</i>	<i>P. papatasi</i>	Arabia Saudită
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. intermedia</i> , <i>L. migonei</i> , <i>L. wellcomei</i> , <i>L. whitmani</i> , și alții	America de Sud
<i>L. colombiensi</i>	<i>L. hartmanni</i>	Venezuela
<i>L. guyanensis</i>	<i>L. anduzei</i> , <i>L. umbratilis</i> , <i>L. whitmani</i>	Columbia
<i>L. infantum</i>	<i>L. longipalpis</i> , <i>L. evansi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. perniciosus</i> , și alții	Africa, America, Asia, Europa
<i>L. major</i>	<i>P. papatasi</i>	Egipt, Arabia Saudită
<i>L. mexicana</i>	<i>L. ayacuchensis</i> , <i>L. olmeca</i>	Ecuador, SUA
<i>L. panamensis</i>	<i>L. hartmanni</i> , <i>L. gomezi</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. trapidoi</i> , <i>L. sanguinaria</i>	Columbia, Ecuador, Panama
<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruensis</i> , <i>L. verrucarum</i>	Peru
<i>L. pifanoi</i>	<i>L. flaviscutellata</i> , <i>L. youngi</i>	Ecuador
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i>	India, Iran, Maroc, Siria

Infecțiile cu paraziții din genul *Leishmania* sunt considerate cele mai importante boli vectoriale după malaria și filariozele ce afectează sistemul limfatic. Leishmanioza este endemică în 88 de țări și în majoritatea țărilor tropicale și subtropicale (Solano-Gallego et al. 2009). Peste 350 de milioane de persoane sunt expuse acestei infecții, iar în fiecare an sunt raportate aproximativ 2 milioane de cazuri noi, dintre care 0.5 milioane de leishmanioză viscerală și 1.5 milioane leishmanioză cutanată (Desjeux 2004). Doar cazurile de leishmanioză viscerală sunt responsabile de aproximativ 59000 de morți anual, o rată a mortalității depășită doar de malaria (Desjeux 2004). Aceste cazuri de leishmanioză cutanată și mucocutanată se manifestă cum se poate observa în figura 1.1.

1.2 Biologia, ecologia și răspândirea flebotomilor

Singurul mod de transmitere a leishmaniozei, ce este important din punct de vedere epidemiologic, este prin intermediul înțepăturii flebotomului care a înțepat anterior un animal deja infectat. A fost raportată și transmiterea sexuală, congenitală și prin intermediul transfuziilor cu sânge contaminat dar aceste modalități de transmitere a leishmaniozei sunt raportate foarte rar și nu reprezintă modalitatea principală de răspândire a acestei infecții (Rosypal et al. 2005; Silva et al. 2009; Tabar et al. 2008).

Distribuția, taxonomia, ecologia și biologia flebotomilor este studiată intensiv de foarte mulți cercetători datorită faptului că aceste insecte transmit la oameni și animale flebovirusuri, bacteria *Bartonella bacilliformis*, dar și paraziții din genul *Leishmania*.

Flebotomii fac parte din familia *Psychodidae*, ordinul *Diptera*, subordinului *Nematocera*, clasa *Insecta*, încrengătura *Artropoda*.

Flebotomii din genul *Phlebotomus* transmit leishmanioza în Europa, Africa și Asia, iar flebotomii din genul *Lutzomya* transmit leishmanioza pe continentul Nord American și Sud American. Nu toți flebotomii transmit paraziți, bacterii sau viruși, aproximativ 10% din speciile cunoscute de flebotomi sunt vectori.

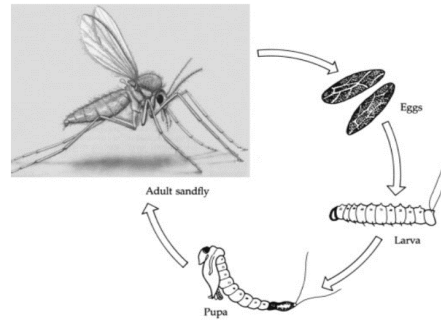
Au fost observate diferențe între preferințele de habitat ale flebotomilor întâlniți în emisfera vestică și preferințele flebotomilor din restul lumii. Flebotomii din emisfera vestică sunt găsiți cel mai des în zonele împădurite și în general oamenii ce petrec mult timp la exterior și lângă zone împădurite sunt cei mai expuși la infecțiile cu paraziții din genul *Leishmania*. Flebotomii din emisfera estică se găsesc în număr mai mare în zonele cu o climă aridă sau semi-aridă și se găsesc mai des în zone locuite de oameni sau apropierea acestor zone (Killick-Kendrick 1999; Sharma și Singh 2008).

Chiar dacă flebotomii se găsesc cu preponderență în zone calde, prezența acestor insecte a fost raportată puțin la nord de paralela 50°N în Canada și puțin la sud de această paralelă la în Franța și Mongolia. În emisfera sudică, flebotomii au fost raportați până la paralela 40°S, dar nu se găsesc în Noua Zeelandă. Flebotomii pot fi găsiți de la sub nivelul mării până la o înălțime de 3300 metri deasupra nivelului mării (Maroli et al. 2013).

După cum se poate observa și din figura 1.1 flebotomii au patru stadii de dezvoltare: ou, larvă, pupă și adult.



(a)



(b)

Figura 1.1: (a) Stadiul larval al flebotomului *Phlebotomus perniciosus* (Maroli et al. 2013) (b) Reprezentare grafică a ciclului vital al flebotomilor (Burton, Carter, și Oeltmann 2018)

Figure 1.1: (a) The larval stage of *Phlebotomus perniciosus* (Maroli et al. 2013) (b) The graphical representation of the sandfly life cycle (Burton et al. 2018)

După împerechere (figura 1.2), femele depun între 15 și 80 ouă în locuri ce oferă hrana necesară, umiditate adecvată larvelor și umbră. Pentru ca larvele să aibă toate condițiile necesare supraviețuirii, foarte des flebotomii depun ouăle în scorburi, peșteri, în fecale de animale, în sol bogat în material organic, în material vegetal în descompunere, crăpături din ziduri și adăposturile animalelor. Ouăle sunt albe după depunere, dar devin maronii în scurt timp. Eclozarea ouălor depinde de temperatura externă. Larvele au formă de omidă și prezintă peri în zona caudală, ce permit identificarea acestora ca larve de flebotomi (Maroli et al. 2013; Sharma și Singh 2008).

Flebotomii adulți sunt de dimensiuni mici, nu depășesc 3.5 mm în lungime, sunt acoperiți de peri și țin aripile ridicate, într-o poziție specifică ce amintește de litera “V”. Se pot prezenta în culori diferite, de la culoarea nisipului până la negru, iar picioarele sunt foarte lungi și delicate (Sharma și Singh 2008).

Flebotomii se hrănesc cu material vegetal, iar femelele au nevoie de proteine din sânge pentru a produce ouă. Foarte puține specii nu au nevoie de sânge pentru a depune ouăle (Killick-Kendrick 1999; Maroli et al. 2013).

Flebotomii sunt activi seara, noaptea și dimineața, zboară fără să facă zgomot, cu o viteză de sub un metru pe secundă și pe distanțe mici. Din acest motiv, flebotomii se îndepărtează doar câteva sute de metri de locurile unde își depun ouăle pentru a găsi mamifere, păsări sau reptile pentru a obține sângele necesar pondei (Killick-Kendrick 1999; Maroli et al. 2013).



Figura 1.2: Împerecherea a doi flebotomi adulți *Phlebotomus duboscqi*. Se poate observa în dreapta flebotomul masculin cu abdomenul mai subțire ce se folosește de organul genital extern pentru a fixa și copula femela (Lawyer et al. 2017)

Figure 1.2: Two adult *Phlebotomus duboscqi* can be observed mating. The male can be observed to the right, with narrow abdomen and using the external copulatory organ to mate the female (Lawyer et al. 2017)

1.3 Metode de control a răspândirii leishmaniozei provocată de infecția cu *L. infantum*

Având în vedere potențialul zoonotic al infecțiilor cu *L. infantum*, și schimbare distribuției și prevalenței acestei infecții, a fost investigată eficiența metodelor de prevenție și control.

1.3.1 Prevenția prin eutanasia câinilor seropozitivi

Prevenția infecțiilor cu *L. infantum* la oameni și animale prin eutanasia câinilor seropozitivi este o metodă controversată, ce a fost aplicată doar în unele țări endemice, cu rezultate nesatisfăcătoare.

Poate unul dintre cele mai reprezentative exemple ale eficienței acestei strategii de control este cel al Braziliei.

Eutanasia câinilor seropozitivi pentru anticorpi anti-*L. infantum* este una dintre principalele strategii implementate în Brazilia pentru a controla leishmaniaza canină, dar și cea umană (Costa 2011; Dantas-Torres et al. 2012).

Această metodă de control a bolii a fost implementată încă din anul 1950. În baza acestui program au fost eutanasiați aproximativ 3500 câini seropozitivi pe an. Între anii 1990 și 1994 au fost testați 4.5 milioane de câini și au fost

eutanasiați 80000 de câini. Tot în această perioadă, incidența infecțiilor umane cu *L. infantum* a crescut cu aproape 100%.

Mai multe studii arată că această metodă nu a oprit creșterea incidenței infecțiilor cu *L. infantum* la câine dar și la om. Aplicarea acestei strategii a dus la dezbatere. Aceasta a fost întâlnită cu rezistență din partea societății din motive etice și nu este acceptată nici de o mare parte a comunității științifice din cauza lipsei de dovezi științifice ce demonstrează eficacitatea acestei strategii de a limita răspândirea leishmaniozei (Dantas-Torres et al. 2012).

Studiile ce au monitorizat rezultatele aplicării acestei strategii au generat rezultate și concluzii diferite din cauza unor limitări legate de metodologie, cum ar fi numărul prea mic de subiecți studiați, dar nu au reușit să demonstreze o eficiență majoră a acestei strategii. Această lipsă de eficiență poate fie explicată de faptul că subiecții eutanasiați sunt înlocuiți foarte rapid de alți câini susceptibili.

Această strategie a provocat moartea a mii de câini în Brazilia și nu a reușit să diminueze semnificativ transmiterea acestei boli și nici să prevină creșterea în număr a cazurilor de leishmanioză la câini și oameni. Din această cauză, marea majoritate a cercetătorilor din domeniu pledează pentru renunțarea la această strategie în favoarea planurilor de control împotriva vectorilor și prin intermediul vaccinării (Dantas-Torres et al. 2012; Quinnell și Courtenay 2009; Romero și Boelaert 2010).

1.3.2 Prevenția prin controlul vectorilor

Folosirea substanțelor repelente pentru a împiedica transmiterea leishmaniozei de către flebotomii infectați este o metodă eficientă, folosită în toate zonele endemice. Această metodă de control are un cost relativ redus și substanțele repelente pot fi obținute cu ușurință în toate regiunile lumii.

Eficiența zgărzilor impregnate cu deltametrină utilizate pentru a preveni apariția leishmaniozei canine a fost raportată în studii ce au avut loc în America de Sud, în sudul Europei și în Asia. Zgărzile cu deltametrină au un efect repelent împotriva flebotomilor pe o perioadă îndelungată, de peste 6 luni (David et al. 2001; Killick-Kendrick et al. 1997; Maroli et al. 2001; Mazloui Gavvani et al. 2002; Miró et al. 2008).

Substanțele repelente previn transmiterea leishmaniozei între câini, dar folosirea în masă, într-o anumită regiune, a acestor substanțe previne indirect și infecțiile umane, deoarece *L. infantum* este transmisă la om de la un câine infectat. Acest lucru a fost demonstrat în Iran. Folosirea zgărzilor impregnate cu deltametrină a dus la scăderea numărului de câini seropozitivi, dar a scăzut și

numărul de copii seropozitivi din regiunea în care a avut loc studiul (Mazloumi Gavvani et al. 2002).

Produsele topice spot-on cu piretroizi au avut de asemenea eficiență demonstrată în respingerea flebotomilor, dar pentru o durată mai scurtă. Produse pe bază de permetrină, combinație de permetrină și piriproxifen sau de permetrină și imidacloprid oferă protecție față de flebotomi pentru aproximativ 20 de zile. Eficiența acestor substanțe a fost testată atât în condiții de laborator, cât și în zone endemice din sudul Europei. Foarte des sunt folosite combinații de substanțe ca permetrină și imidacloprid sau permetrină și piriproxifen (Miró et al. 2007; Molina et al. 2006, 2012; Otranto et al. 2007).

1.3.3 Prevenția prin vaccinare

Deși folosirea piretroizilor au un efect important împotriva înțepăturilor de flebotomi și sunt eficiente în prevenirea leishmaniozei dacă sunt folosite pe scară largă, acestea nu oferă protecție absolută împotriva tuturor speciilor de flebotomi sau dacă prevenția cu piretroizi este făcută de către stăpânii animalelor (Gradoni 2015). Din această cauză elaborarea de vaccinuri pentru leishmanioză a fost și este în continuare un obiectiv foarte important pentru cercetătorii din domeniul medicinei veterinare, dar și al sănătății publice (Gradoni 2015).

Un răspuns imunitar eficient al gazdei este celular, specific și mediat de limfocitele Th1. Din această cauză, pentru a oferi protecție și a reduce răspândirea bolii vaccinul trebuie să conțină un antigen ce poate să inducă un răspuns imunitar mediat de limfocitele Th1. Găsirea antigenului și adjuvantului potrivit a reprezentat una dintre cele mai mari piedici în obținerea a unor vaccinuri eficiente (Gradoni 2015). Mai multe combinații de antigeni și adjuvanți au fost încercate în căutarea unor vaccinuri eficiente și antigenii au fost obținuți din paraziți inactivați, fracțiuni celulare purificate, proteine celulare sau subunități de proteine, proteine recombinante, ADN plasmidic și particule virale ce conțin factori de virulență ai parazitului. După această căutare intensivă, doar trei vaccinuri cu o eficiență crescută au fost găsite și au fost înregistrate două în Brazilia și un vaccin în Europa (Gradoni 2015; Otranto și Dantas-Torres 2013). Unul dintre primele vaccinuri înregistrate în Brazilia are ca antigen proteina A2 recombinată și folosește saponina ca adjuvant.

Proteina A2 a fost descoperită pentru prima oară în *Leishmania donovani* și este primul factor de virulență identificat ce este specific pentru forma amastigotă. Proteina A2 este una dintre antigenii recunoscuți de limfocitele T în infecția cu *Leishmania infantum*.

Eficacitatea acestui vaccin a fost analizată în laborator prin injectarea intravenoasă a unei doze mari de promastigote de *Leishmania infantum* (5×10^7). Prin testarea doar în laborator al acestui vaccin a fost demonstrat că protejează 40% de infecție și a fost înregistrat ca vaccin canin în Brazilia sub numele de LeishTec®, produs de Hertape Calier. Deoarece în infecția naturală joacă un rol și saliva dar și enzimele digestive ale flebotomilor, eficiența acestui vaccin trebuie evaluată și pe teren (Fernandes et al. 2008; Gradoni 2015; Otranto și Dantas-Torres 2013).

Un alt exemplu îl reprezintă un vaccin ce are ca antigen glicoproteina FML, purificată din *Leishmania donovani* și amestecată cu saponina QuilA, cu rol de adjuvant. Acest vaccin oferă o protecție de 92% și o eficacitate de 76% la testele făcute pe teren și folosirea lui în zone endemice din Brazilia a corelat cu o scădere în incidența infecțiilor canine și umane. Acest vaccin este înregistrat în Brazilia și a fost demonstrat de folos și în imunoterapia câinilor infectați (Borja-Cabrera et al. 2010; Gradoni 2015; Otranto și Dantas-Torres 2013).

În Europa este înregistrat produsul “CaniLeish”, un vaccin ce are în compoziție antigenul ES purificat din supernatantul culturii de *Leishmania infantum* și conține saponina QA21 obținută din scoarța copacului *Quillaja saponaria* ca adjuvant (Gradoni 2015; Otranto și Dantas-Torres 2013). Acest vaccin a demonstrat o eficacitate de 57% la proba în laborator prin injectarea intravenoasă a $10^{8.5}$ promastigote de *Leishmania infantum* la un an după vaccinare (Martin et al. 2014). Acest vaccin are o eficacitate de 68.4% pe teren și o rată de protecție de 92.7% dar pentru a concluda în ce măsură folosirea lui ar ajuta controlul leishmaniozei pe continentul European este nevoie de studii la scară mare (Gradoni 2015; Oliva et al. 2014; Otranto și Dantas-Torres 2013).

1.4 Tabloul clinic

Tabloul clinic al leishmaniozei canine poate să varieze foarte mult și acest aspect depinde de parazit dar și de răspunsul imunitar al câinelui infectat. Leishmanioza canină este o boală sistemică ce poate să afecteze mai multe organe și se manifestă prin semne clinice ce nu sunt specifice. Simptomele pot să includă letargie, inapetență, splenomegalie, poliurie, polidipsie, leziuni oculare, epistaxis, onicogrifoză, diaree, voma, leziuni ale pielii, limfadenomegalie generalizată, pierdere în greutate, atrofie musculară și intoleranța la efort. Tabloul clinic ce variază și simptomele clinice nespecifice îngreunează diagnosticul clinic al acestei boli, mai ales în țările unde această boală nu este endemică și nu este bine cunoscută de medicii veterinari și medicii umani.

Chiar dacă în leishmanioza canină pot să apară un număr mare de simptome ce implică organe diferite, există semne clinice ce sunt întâlnite mai des și altele întâlnite rar (Koutinas et al. 1999; Solano-Gallego et al. 2009).

1.4.1 Leziunile cutanate

Leziunile cutanate reprezintă simptomul cel mai des întâlnit în manifestarea clinică a leishmaniozei canine și poate să fie singura modificare sau se poate prezenta în paralel cu alte simptome.

Leziunile cutanate pot se prezenta în diferite forme:

- a) dermatită exfoliativă, non pruriginoasă, însoțită sau nu de alopecie, ce poate fi localizată sau generalizată;
- b) dermatită ulcerativă prezentă deasupra proeminențelor osoase, pe pernute, la nivelul joncțiunilor muco-cutanate sau pe pavilionul auricular după cum se poate observa în figura 1.3;
- c) dermatită nodulară focală sau multifocală;
- d) dermatită muco-cutanată proliferativă;
- e) dermatită papulară.



Figura 1.3: Câine din vestul Greciei cu semne clinice specifice leishmaniozei: cașexie, limfadenopatie, ulcerații la nivelul urechii și leziuni specifice cu alopecie în zona perioculară (original)

Figure 1.3: Dog from the west of Greece manifesting clinical signs specific for leishmaniasis: cachexia, lymphadenomegaly, skin ulcerations on the ear, specific lesions with alopecia in the periocular region (original)

Leziuni cutanate atipice includ depigmentație, paniculită, hiperkeratoză nazală și digitală, erupții de pustule și eritem (Bottero, Poggi, și Viglione 2006; Koutinas et al. 1999; Solano-Gallego et al. 2009).

1.4.2 Afecțiuni renale

Funcțiile renale ale câinilor infectați trebuie evaluate, deoarece leishmanioza canină este însoțită foarte des de insuficiență renală cronică.

Această insuficiență renală se datorează glomerulonefritei membrano-proliferative și/sau mezangio-proliferative provocată de distrugerea glomerulului și a tubului renal ce rezultă în urma depunerii de complexe imune la nivelul nefronului. Aceste complexe imune sunt imunoglobuline G anti-*Leishmania* produse în cursul răspunsului imun umoral.

De multe ori insuficiența renală este singurul simptom. Diagnosticul precoce al insuficienței renale poate prelungi considerabil viața pacientului deoarece aceasta reprezintă cauza principală de moarte a animalelor cu leishmanioză. Deși insuficiența renală este frecventă, azotemia nu este un indiciu paraclinic întâlnit des deoarece nefronii își pierd din funcționalitate în stadiul terminal al bolii (Alvar et al. 2004; Solano-Gallego et al. 2009).

1.4.3 Afecțiuni oculare și perioculare

Afecțiunile oculare în cazul leishmaniozei canine se prezintă frecvent și în diverse moduri. De multe ori se prezintă conjunctivită împreună cu secreții mucoase sau mucopurulente după cum poate fi observat în figura 1.4. Alte manifestări frecvente sunt: keratită, keratoconjunctivită (figura 1.4), uveită, blefarită sau sclerită. Keratita poate evolua cu ulcerări și poate duce la orbire. De asemenea uveita poate evolua în glaucom secundar sau panoftalmie, urmată de pierderea vederii. Mucoasele pot fi palide datorită anemiei.

Afecțiunile oculare sunt datorate prezenței parazitului, dar există posibilitatea ca acestea să fie provocate și de răspunsul imun (Alvar et al. 2004; Koutinas et al. 1999).

Există și leziuni întâlnite mai rar în rândul câinilor cu leishmanioză iar acestea sunt: leziuni ale mucoaselor, artrită sau poliartită, hepatită cronică, colită, miozită, manifestări nervoase provocate de meningită, boli autoimune, pericardită, vasculită, tromboembolism.



Figura 1.4: Keratoconjunctivită și secreții oculare mucopurulente la un câine cu leishmanioză viscerală (Freitas et al. 2017)

Figure 1.4: Keratoconjunctivitis and mucopurulent discharge in a dog with visceral leishmaniosis (Freitas et al. 2017)

1.4.4 Semne paraclinice

Următoarele semne paraclinice indică o posibilă infecție cu *Leishmania infantum*: proteinurie și azotemie persistentă, anemie nonregenerativă, leucocitoză sau leucopenie, hipergammaglobulinemie, hipoalbuminemie, trombocitopenie.

Au fost raportate schimbări în distribuția și prevalența infecțiilor cu *L. infantum* în toată lumea iar în estul Europei au fost raportate cazuri noi în zone considerate non-endemice. Și în România au fost raportate cazuri noi după o perioadă de 70 de ani în care nu a mai fost identificată această infecție pe teritoriul țării.

Studiul nostru are rolul de a folosi metode specifice și sensibile de biologie moleculară și serologie pentru a identifica prezența infecțiilor canine cu *L. infantum* la câinii fără stăpân din sudul României și pentru a stabili distribuția și prevalența acestei infecții.

1.5 Răspândirea leishmaniozei canine

Pentru mult timp, această boală a fost considerată să fie endemică doar în țările cu climat tropical sau subtropical de pe continentul American, European Asiatic și African (Solano-Gallego et al. 2009), dar ultimele studii arată că răspândirea acestei boli este în schimbare pe tot globul și a fost demonstrată prezența *L. infantum* în țări cu climă temperată și în zone ce nu au fost considerate

endemice în trecut. Acest fenomen poate fi observat atât în emisfera vestică, cât și în emisfera estică. Au fost găsite cazuri de infecții autohtone cu *L. infantum* în nordul Argentinei, în sudul Canadei și în Korea de Sud (Bhang et al. 2013; Cruz et al. 2010; Díaz et al. 2019; Duprey et al. 2006).

Acest fenomen de schimbare a distribuției și prevalenței a infecțiilor canine cu *L. infantum* a fost observat și în Europa.

În Europa, *L. infantum* este endemic în țările mediteraneene dar ca și pentru celelalte boli vectoriale, a fost observată o schimbare în distribuția și prevalența acestui parazit. Aceste schimbări sunt, în mare parte atribuite schimbărilor climatice și a altor schimbări ale mediului induse de oameni (Medlock și Leach 2015; Otranto, Capelli, și Genchi 2009).

Oamenii și animalele ce călătoresc între zone endemice și non-endemice joacă un rol important în răspândirea bolii (Day 2011; Maia și Cardoso 2015). Acest mecanism de răspândire a infecției este în mod special eficient deoarece câinele reprezintă rezervorul principal al acestei infecții iar în contextul libertății de circulație din Uniunea Europeană, există un număr mare de animale și oameni ce călătoresc între țările din sudul Europei și țările din nord sau est (Maia și Cardoso 2015; Solano-Gallego et al. 2009).

Aceste schimbări ale distribuției și prevalenței leishmaniozei canine în Europa sunt bine documentate. Există exemple de leishmanioză canină în zone non-endemice din Italia (Otranto et al. 2009) și Spania (Mirá et al. 2012). În estul Europei există o situație similară, au fost raportate cazuri de leishmanioză canină în țări considerate non endemice cum sunt Bulgaria (Tsatchev et al. 2010), Ungaria (Tánczos et al. 2012) sau România (Dumitrache et al. 2016). De asemenea, în Serbia au fost raportați flebotomi infectați cu *L. infantum* (Vaselek et al. 2017).

Prin acest studiu, încercăm o abordare comparativă a evoluției leishmaniozei, de la raportarea primelor cazuri și până în prezent.

CAPITOLUL II IMPORTANȚA BABESIOZEI LA CÂINE

CHAPTER II THE IMPORTANCE OF CANINE BABESIOSIS

2.1 Introducere

Babesioza este o boală parazitară provocată de infecția cu protozoare din genul *Babesia* spp. Paraziții din genul *Babesia* pot infecta mai multe animale domestice și sălbatice, dar au fost raportate chiar și infecții umane (Solano-Gallego et al. 2016). Acești paraziți au fost descriși pentru prima oară în 1888 de către medicul Victor Babeș în eritrocite de bovine (Babeș 1888). În anul 1892 Victor Babeș raportează prezența unor organisme similare în eritrocitele unor ovine cu hemoglobinurie (Babeș 1892). În anul 1893, Starcovici numește acești paraziți *Babesia bovis* și *Babesia ovis*, după persoana ce a descoperit acești paraziți (Schnittger et al. 2012). Această boală este caracterizată de anemie hemolitică, splenomegalie, febră și este transmisă de căpușe. Paraziții din genul *Babesia* spp. fac parte din încregătura Apicomplexa.

2.2 Ciclul biologic

Aceste organisme parazitează eritrocitele gazdelor vertebrate unde are loc și reproducerea asexuată. Reproducerea sexuată are loc în gazda definitivă, reprezentată de căpușă. După cum se poate observa și din figura 2.1, sporozoiții (Sz) ajung în sângele gazdei vertebrate în timp ce căpușa se hrănește. După ce pătrund în eritrocite, aceștia se transformă în trofozoți (T) ce se multiplică asexuat prin merogonie formând merozoți (M). Merozoții părăsesc eritrocitele și pătrund în noi eritrocite unde continuă multiplicarea. O parte din merozoți se opresc din multiplicare și se transformă în pregametociți (G). Dezvoltarea gametogonică și sporogonia au loc în căpușă. În lumenul intestinal al căpușelor pregametociții se diferențiază în micro- și macro-gameți (Sk) ce fuzionează și formează zigotul (Z). Prin procesul de sporogonie, zigoții se multiplică prin meioză și se diferențiază în oochineți. Oochineții ajung în limfă, unde continuă multiplicarea. Din limfă, ookineții ajung în glandele salivare unde are loc ultima multiplicare și se diferențiază în sporozoiți (Sz). Acești sporozoiți vor fi transmiși gazdei vertebrate după ce căpușa se va transforma din stadiul de larvă în nimfă

sau din nimfă stadiul adult. Acest proces se numește transmitere trans-stadială (Ts). Oochineții ajung și în ovare de unde vor ajunge în ouă și la generațiile de căpușe viitoare prin transmiterea trans-ovariană (To) (Bowman 2013a; Greene 2012b; Schnittger et al. 2012).

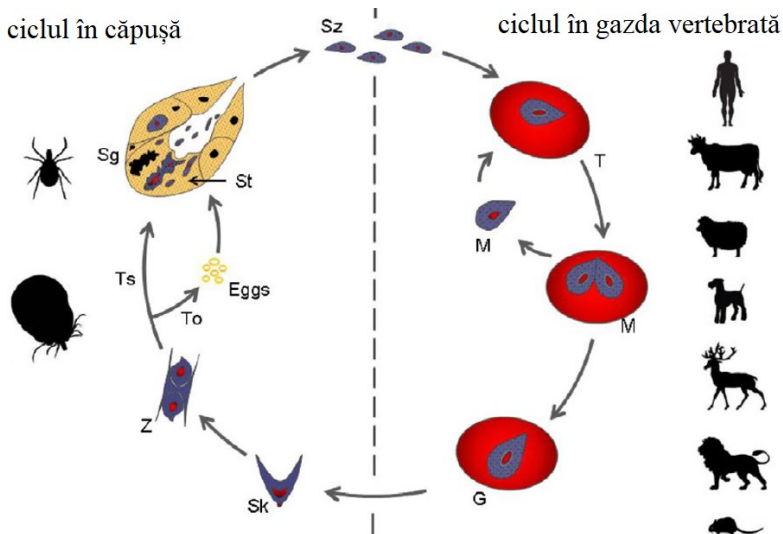


Figura 2.1: Reprezentare grafică a ciclului paraziților din genul *Babesia* (Sz)=sporozoiți, (T)=trofozoiți, (M)=merozoiți, (G)=pregametociți, (Sk)= micro- și macro-gameți, (Z)= zigotul, (Sg)=glande salivare, (Ts)= transmitere trans-stadială (To)= transmiterea trans-ovariană. Toate etapele marcate cu litere în figură sunt descrise în textul de mai sus (Schnittger et al. 2012)

Figure 2.1: Graphical representation of the *Babesia* spp. life cycle (Sz)= sporozoites, (T)=trophozoites, (M)= merozoites, (G)=pregametocytes, (Sk)=microgametes and macrogametes, (Z)=zygote, (Sg)=salivary glands, (Ts)= transstadial transmission, (To)= transovarial transmission. All stages of the cycle, marked by letters in the figure are described in the text above (Schnittger et al. 2012)

2.3 Manifestări clinice

2.3.1 Manifestări clinice și semne paraclinice generale

Manifestările clinice asociate infecțiilor cu paraziți din genul *Babesia* pot varia foarte mult de la o specie la alta, dar există variații chiar și în cazul infecțiilor cu aceeași specie. Deși tabloul clinic și paraclinic variază odată cu specia de căpușe ce provoacă infecția, există unele simptome și semne paraclinice ce sunt comune și pot ajuta clinicianul să pună diagnosticul de babesioză. De cele mai

multe ori, infecțiile sunt însoțite de febră, anemie hemolitică, splenomegalie, trombocitopenie, letargie, anorexie, mucoase palide și icter (Bowman 2013a; Greene 2012b; Köster, Lobetti, și Kelly 2015).

În cazuri severe pot apărea tulburări de coagulare a sângelui, insuficiență renală acută, tulburări neurologice, șoc și edem pulmonar (Greene, 2012a).

2.3.2 Manifestări clinice și paraclinice specifice infecțiilor cu *B.*

canis

Infecțiile cu *B. canis* prezintă simptome de o intensitate moderată sau severă și prezintă o evoluție acută. Tabloul clinic poate să varieze foarte mult în cazul acestor infecții dar de cele mai multe ori este caracterizat de anemie hemolitică, febră, letargie și splenomegalie. Uneori se pot observa următoarele simptome: peteșii, epistaxis, limfadenopatie, vomă.

Prin intermediul examenelor paraclinice ale câinilor infectați cu *B. canis* se pot descoperi: hipotensiune, neutropenie, leucopenie, limfopenie, hipoalbuminemie, hipokalemie, hiponatremie, hiperfosfatemie, hipertrigliceridemie, hipoglicemie, azotemia, valori crescute ale enzimelor hepatice, fosfatază alcalină (ALP), aspartataminotransferază (AST), alaninaminotransferază (ALT), dar și anemie normocromică, nonregenerativă și normocitică (Solano-Gallego et al. 2016).

2.3.3 Manifestări clinice și paraclinice specifice infecțiilor cu

Babesia vogeli

Infecțiile cu *B. vogeli*, pot evolua acut sau cronic. De cele mai multe ori sunt asimptomatice sau prezintă simptome moderate. Unii câini se pot prezenta cu febră dar fără alte simptome. Pot să apară simptome severe în cazul cățeilor. În cazul câinilor infectați cu *B. vogeli*, sunt frecvente coinfecțiile cu *Ehrlichia canis* sau *Hepatozoon canis* (Baneth 2018; Greene 2012b).

2.3.4 Manifestări clinice și paraclinice specifice infecțiilor cu *B.*

gibsoni

Infecțiile câinilor cu *B. gibsoni* pot avea o evoluție acută sau cronică, iar simptomele au o intensitate moderată sau severă. Această infecție se poate manifesta cu letargie, febră, anorexie, vomă, splenomegalie, limfadenopatie, diaree (Greene 2012b; Solano-Gallego et al. 2016).

La examenele paraclinice se pot descoperi: hipoalbuminemie, anemie hemolitică, nivel crescut al enzimelor hepatice fosfatază alcalină (ALP) și

alaninaminotransferază (ALT), trombocitopenie, hipoalbuminemie, neutropenie, ascită, azotemie, leukocitoză, nefropatie (Solano-Gallego et al. 2016).

Câinii tratați pentru babesioză provocată de infecția cu *B. gibsoni* prezintă o ameliorare a simptomelor clinice, dar de cele mai multe ori rămân cu o infecție asimptomatică (Bowman 2013a).

2.3.5 Manifestări clinice și paraclinice specifice infecțiilor cu *Babesia vulpes*

Infecțiile cu *B. vulpes* se observă preponderent la câinii de vânătoare și cei ce sunt ținuti afară. Această infecție poate avea o evoluție acută sau cronică, iar intensitatea simptomelor poate să fie moderată sau severă. Câinii infectați cu *B. vulpes* pot avea mucoasele palide, tahipnee, tahicardie și hemoglobinurie. Prin intermediul examenelor paraclinice se pot descoperi: anemie hemolitică regenerativă, trombocitopenie de multe ori însoțită de insuficiență renală, anemie non regenerativă, proteinurie, azotemie, hiperglobulinemie (Greene 2012b; Solano-Gallego et al. 2016).

La câinii infectați cu *B. vulpes*, la care examenul paraclinic relevă azotemie, se observă o probabilitate de deces de zece ori mai mare. De fapt azotemia este principala cauză de moarte la câinii infectați cu *Babesia vulpes*. Câinii cu azotemie prezintă de cele mai multe ori și hiperfosfatemie, hipoalbuminemie, hipercolesterolemie și proteinurie (Camacho et al. 2004).

2.4 Epidemiologia babesiozei canine

Babesioza canină este o boală cu răspândire mondială dar specia de *Babesia* ce provoacă această boală variază odată cu locația geografică. Fiecare specie are o anumită răspândire geografică. Cunoașterea răspândirii geografice pentru fiecare specie este o informație foarte utilă pentru clinicieni, atât pentru diagnostic cât și pentru tratament (Greene 2012b). Cu toate acestea, cunoștințele legate de răspândirea geografică a fiecărei specii de *Babesia* încă sunt incomplete. Odată cu popularizarea metodelor de diagnostic moleculare, PCR și secvențiere, ce permit diferențierea speciilor din punct de vedere genetic, au devenit și mai evidente diferențele dintre infecțiile cu diferite specii de *Babesia* (Greene 2012b).

În Europa au fost raportate infecții la câini cu *B. canis*, *B. vogeli*, *B. vulpes* și *B. gibsoni*. În România au fost raportate infecții la câini doar cu *B. canis*, *B. vogeli*, și *B. gibsoni* (Solano-Gallego et al. 2016). Chiar dacă încă nu au fost raportate infecții la câini cu *B. vulpes*, această infecție a fost raportată la vulpi și la șacali (Daskalaki et al. 2018; Mitková et al. 2017).

CAPITOLUL III IMPORTANȚA HEPATOZOONOZEI LA CÂINE

CHAPTER III THE IMPORTANCE OF CANINE HEPATOZOONOSIS

3.1 Introducere

Hepatozoonoza este o boală vectorială produsă de protozoare ce fac parte din genul *Hepatozoon*, familia *Hepatozoidae* subordinul *Adeleorina*, încregătura *Apicomplexa*.

Există un număr mare de paraziți din genul *Hepatozoon* ce pot să infecteze mai multe specii de vertebrate. Au fost descoperite peste 300 de specii de *Hepatozoon* ce pot să infecteze păsări, reptile amfibieni, marsupiale și mamifere. Dintre cele 300 de specii de *Hepatozoon*, aproximativ 50 sunt specifice mamiferelor (Baneth 2011; Greene 2012a; Modrý et al. 2017).

Principalele specii de *Hepatozoon*, ce prezintă interes pentru medicii veterinari sunt speciile ce afectează carnivorele, ca *Hepatozoon canis* și *Hepatozoon americanum*. Infecțiile cu *Hepatozoon americanum* sunt întâlnite cel mai des în sud-estul Statelor Unite, dar au fost raportate infecții cu acest parazit și în nordul Statelor Unite, America Centrală și nordul Americii de Sud.

Paraziții din genul *Hepatozoon* pot fi transmiși de mai multe tipuri de artropode ce parazitează vertebratele. Printre acestea se numără căpușele, țânțarii, flebotomii, muște, purici sau păduchii. Acești paraziți nu sunt transmiși prin înțepătura artropodelor, ci prin înghițirea artropodelor infectate, ce conțin oochiști maturi, de către gazda intermediară vertebrată.

3.2 Ciclul biologic

Artropodul este gazda definitivă a parazitului, unde are loc reproducerea sexuată a parazitului, iar vertebratul este gazda intermediară, unde are loc reproducerea asexuată (Greene 2012a).

Vectorul responsabil pentru transmiterea *H. canis* la câine este forma matură a căpușei *Rhipicephalus sanguineus* adultă. În Brazilia a fost demonstrat că și *Amblyomma ovale* este vector pentru *H. canis*. A fost demonstrat experimental că acest parazit poate fi transmis și intrauterin, de la cățea, la pui (Murata et al, 1993). Căpușe ca *Haemophysalis longicornis* și *Haemophysalis*

flava sunt potențiali vectori pentru *H. canis* dar abilitatea lor de a transmite acest parazit nu a fost încă demonstrată. Nu a fost demonstrată în cazul infecțiilor cu *H. canis* nici transmiterea prin prădarea unor vertebrate infectate, metodă confirmată în cazul altor specii din genul *Hepatozoon* (Baneth 2011).

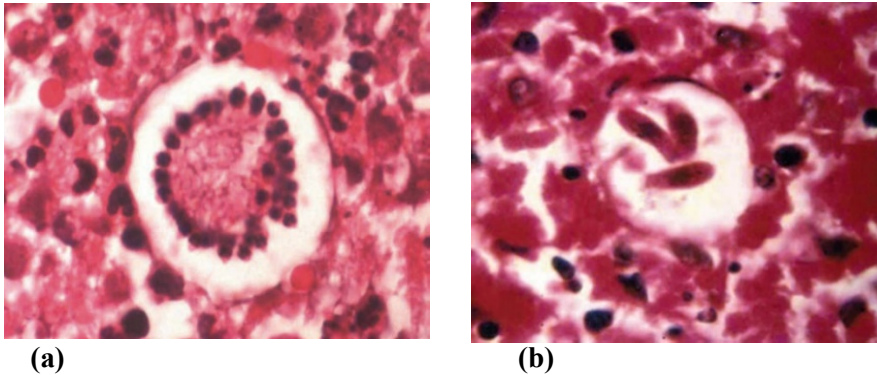


Figura 3.1: (a) Meront al parazitului *Hepatozoon canis* din splină, ce conține mai mulți micromerozoizi colorația hematoxilină-eozină (x 400) (b) Meront al parazitului *Hepatozoon canis* din splină, ce conține trei macromerozoizi colorația hematoxilină-eozină (x 400) (Greene 2012a)

Figure 3.1: (a) *Hepatozoon canis* meront containing micromerozoites from splenic tissue (Hematoxylin-Eosin staining, $\times 400$) (b) *Hepatozoon canis* meront containing three macromerozoites in splenic tissue (Hematoxylin-Eosin staining, $\times 400$) (Greene 2012a)

Gazda intermediară vertebrată este infectată când ingerează căpușa ce joacă rol de vector. Sporozoiții trec prin peretele tubului digestiv, pătrund în limfocite și monocite, prin intermediul cărora ajung în diferite organe țintă ca: măduva, splina, limfonozii, ficatul, rinichi, plămâni. După ce au ajuns în organul țintă, se formează meronții, ce conțin merozoizi, ce se divid asexuat prin procesul de merogonie. Au fost descrise două tipuri de meronți: primul tip conține între 20 și 30 de micromerozoizi și al doilea tip ce conține trei sau patru macromerozoizi. Diferențele microscopice dintre cele două tipuri de meronți pot fi vizualizate în figura 3.1. Micromerozoizii părăsesc meronții maturi și invadează neutrofilele și monocitele, unde se transformă în gamonți prin procesul de gametogonie. Paraziții sunt transmiși căpușelor, în timpul hrănirii, prin intermediul leucocitelor infectate. Gameții fuzionează în tubul digestiv al căpușei, unde formează zigoții. Zigoții se multiplică, iar prin procesul de sporogonie se formează un oochist localizat în hemocel. Oochistul este o structură mare ce conține sute de sporozoiți. Câinele este infectat când ingerează oochistul odată cu căpușa.

Tot acest ciclu parazitului în câine are loc în 81 de zile iar durata fiecărui stadiu de dezvoltare este ilustrată în figura 3.2.

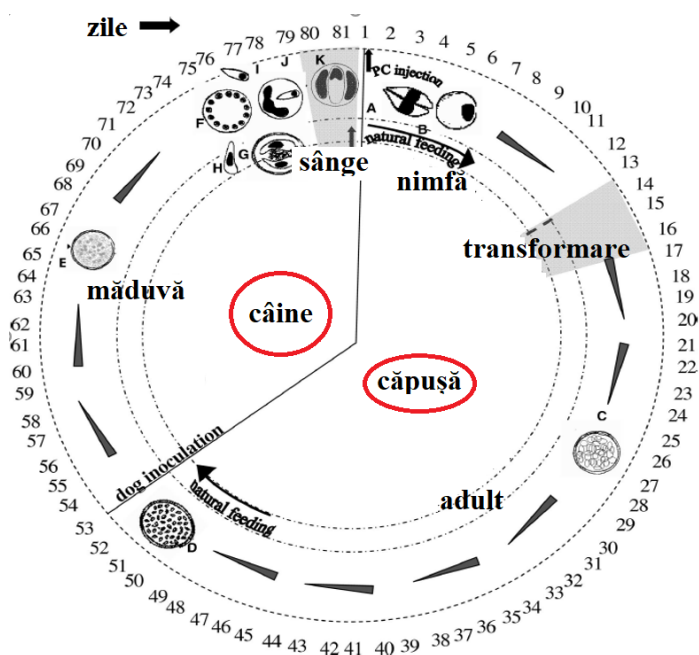


Figura 3.2: Reprezentarea grafică a ciclului vieții parazitului *H. canis* în gazda intermediară și gazda definitivă. Este marcat numărul de zile din momentul infecției nimfei. (A) Gameții fuzionează. (B) Oochist imatur. (C) Oochist în dezvoltare. (D) Oochist matur în hemocel. (E) Meront în măduvă. (F) Meront ce conține mai mulți micromerozoizi. (G) Meront ce conține doi macromerozoizi. (H) Macromerozoizi liberi în măduva osoasă. (I) Micromerozoizi în măduva osoasă (J) Micromerozoizi ce au penterat un neutrofil și s-au transformat într-un gameți (K) Gamont matur în sângele periferic (Baneth, Samish, și Shkap 2007)

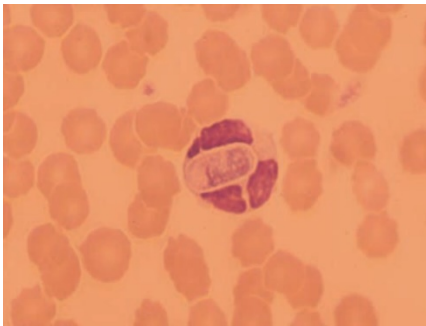
Figure 3.2: Sequence of events during experimental infection with *H. canis*. Days from infection of nymph ticks are marked on the circumference of the circle. (A) Association of gamonts in syzygy. (B) Early oocyst. (C) Developing oocyst. (D) Mature oocyst in the tick hemocoel. (E) Early meront in the bone marrow. (F) Meront containing micromerozoites aligned in a circle around a basal material mass. (G) Meront containing 2 macromerozoites. (H) Free macromerozoite in the bone marrow. (I) Free micromerozoite in the bone marrow. (J) Micromerozoite after penetration into neutrophil and during transformation to gamont. (K) Mature gamont in the peripheral blood (Baneth et al. 2007)

3.3 Manifestări clinice și paraclinice

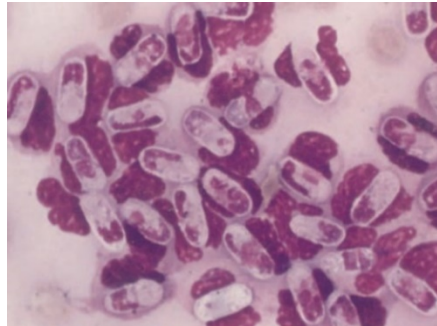
Câinii infectați cu *H. canis* se pot prezenta cu manifestări clinice de o intensitate diferită. Manifestările clinice depind de parazitemie. Câinii cu o parazitemie crescută se pot prezenta cu letargie, cașexie, anemie și neutrofilie. Aceștia pot prezenta aproape toate neutrofilele din sângele periferic infectate, cum se poate observa în frotiul din figura 3.3 (b). În acest caz semnele clinice sunt de o intensitate crescută, iar infecția poate să pună în pericol viața pacientului.

Câinii ce prezintă o parazitemie scăzută, între 1% și 5%, de cele mai multe ori sunt asimptomatici, sau prezintă semne clinice de o intensitate scăzută. Acești câini se prezintă de cele mai multe ori cu anemie și fără neutrofilie, cum poate fi observat în frotiul din figura 3.3 (a) (Baneth 2011; Greene 2012a).

Intensitatea semnelor clinice și a parazitemiei poate să depindă de sistemul imunitar al pacientului. Câinii cu un sistem imunitar subdezvoltat, ce au o altă infecție sau urmează tratamente ce afectează sistemul imun, sunt predispuși să prezinte o parazitemie crescută și să prezinte semne clinice.



(a)



(b)

Figura 3.3: (a) Gamont de *Hepatozoon canis* într-un neutrofil. Frotiu cu sânge de la câine cu o colorație Giemsa (x 1000) (b) Un frotiu cu sânge de la câine și cu o colorație Giemsa. Câinele avea o parazitemie ridicată și prezenta neutrofilie iar în frotiu se observă o aglomerare de neutrofile ce conțin meronți de *Hepatozoon canis* (x 1000) (Greene 2012a)

Figure 3.3: (a) *Hepatozoon canis* gamont in the cytoplasm of a neutrophil on a Giemsa-stained blood smear (x 1000) (b) A Giemsa-stained blood smear from a dog with leukocytosis and a high *Hepatozoon canis* parasitemia. Almost all of the neutrophils are parasitized with gamonts (x 1000) (Greene 2012a)

Printre semnele paraclinice ale câinilor infectați cu *H. canis*, se pot număra: hiperproteinemia, hiperglobulinemie, hiperalbuminemie, un nivel crescut al creatinkinazei și al fosfatazei alcaline. În cazul câinilor cu parazitemie crescută, vor fi mai mulți meronții localizați în diferite organe ce pot provoca hepatită, penumonie, glomerulonefrită sau, mai rar, periostită.

Printre cele mai frecvente coinfectii întâlnite la câinii cu *Hepatozoon canis*, sunt cele cu: *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, sau *Ehrlichia canis* (Baneth 2011; Greene 2012a).

3.4 Epidemiologie

Infecțiile canine cu *H. canis* au o răspândire mondială, după cum poate fi observat din figura 3.4, prezența acestui parazit a fost raportat în America de sud, America de nord, Europa, Africa și Asia. Chiar dacă este câinele principală gazdă intermediară a acestui parazit, aceste infecții sunt raportate și la animale sălbatice ca vulpea, șacalul sau hiena (Baneth 2011).

În Europa, *H. canis* a fost raportat în mai multe țări, la câini, la animale sălbatice ca vulpe sau șacal dar și la căpușe (Farkas et al. 2014; Geurden et al. 2018; Hodžić et al. 2018; Johnson 2018; Licari et al. 2017; Mitková et al. 2016).

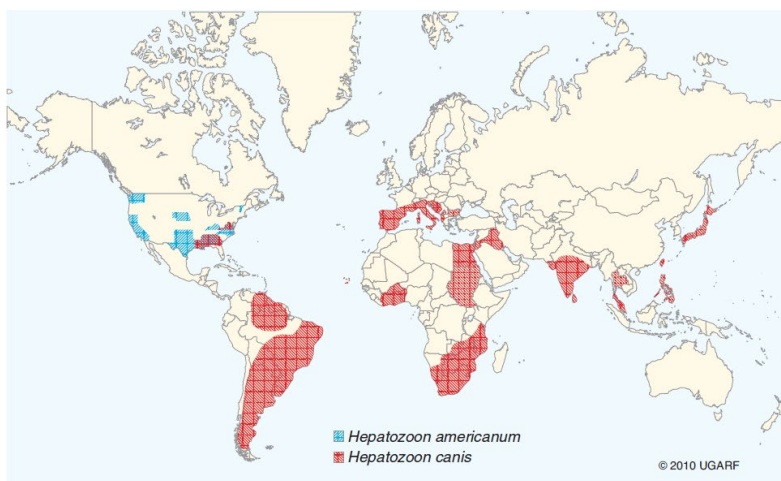


Figura 3.4: Harta distribuției infecțiilor cu *Hepatozoon americanum* și *Hepatozoon canis* (Greene 2012a)

Figure 3.4: A map of the reported geographic distributions of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* (Greene 2012a)

Există pericolul ca infecțiile canine cu *H. canis* să se extindă și în țările europene ce încă nu sunt endemice. Acest fapt este evident în Regatul Unit, unde se raportează importul unor câini infectați cu paraziți, printre care și cu *H. canis* (Johnson 2018).

O situație asemănătoare este găsită și în România. Au fost raportate infecții cu *H. canis* la vulpi, la șacali și câini, dar au fost raportate și căpușe ce conțineau acest parazit (Andersson, et al., 2017 (1); Andersson, et al., 2017 (2); Imre et al., 2015; Mitková et al., 2017).

Deși au fost raportate cazuri de infecții canine cu *H. canis* în România, există doar un studiu epidemiologic pe acest subiect și acoperă o zonă geografică foarte restrânsă. Unul din obiectivele acestui studiu, este să investigheze distribuția și prevalența infecțiilor canine cu *H. canis* pe o suprafață geografică extinsă, din sudul României.

CAPITOLUL IV IMPORTANȚA DIROFILARIOZEI LA CÂINE

CHAPTER IV THE IMPORTANCE OF CANINE DIROFILARIASIS

4.1 Dirofilarioza canină

Dirofilarioza este un grup de parazitoze transmise de vectori, provocate speciile din genul *Dirofilaria*. Paraziții din genul *Dirofilaria* sunt nematode ce fac parte din familia *Onchocercidae*, subfamilia *Dirofilarinae* și ordinul *Spirurida*.

Printre cele mai studiate și relevante specii de filarii se numără *D. immitis* și *D. repens* datorită patogenicității crescute, a prevalenței ridicate dar și pentru impactul important ce îl au asupra sănătății publice. Infecțiile cu *D. immitis* se găsesc în toate zonele temperate și tropicale iar infecțiile cu *D. repens* se găsesc doar în Europa, Africa și Asia (Baptista-Fernandes et al. 2015).

D. immitis a fost descrisă pentru prima oară în secolul XVII de către un nobil lombard, ce a descris prezența unui parazit în inima câinilor săi de vânatoare (Simón et al. 2012). Prima raportare a parazitului *D. repens* a fost cel mai probabil în anul 1566, de către medicul portugez Amato Lusitano ce descrie prezența parazitului în ochiul unui copil de trei ani (Capelli et al. 2018).

Femelele acestor paraziți sunt ovovivipare și depun microfiliariile în sângele gazdei definitive. Aceste filarii sunt sensibile la schimbările fiziologice ale gazdei definitive și pot să ajungă în sistemul circulator periferic doar în anumite momente ale zilei. De cele mai multe ori acest lucru le ajută să fie prezente în sistemul circulator periferic doar când este prezent vectorul hematofag (Manfredi, Cerbo, și Genchi 2007).

Infecțiile cu *D. immitis* la canide și la feline sunt localizate la nivel cardiac și pulmonar dar infecțiile cu *D. repens* sunt localizate la nivel subcutanat. Infecțiile cu *D. immitis* și *D. repens* la om sunt localizate de cele mai multe ori la nivel pulmonar și subcutanat sau ocular (Simón et al. 2012).

Au fost identificate aproximativ 70 de specii de țânțari, în general membri al genurilor *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta*, și *Coquilletidia*, ce sunt potențiali vectori ai dirofilariozei la om și animale. Chiar dacă există un număr mare de specii ce sunt potențiali vectori pentru *Dirofilaria spp.*, capacitatea de vector a fost confirmată doar pentru puține specii de țânțari. Mai multe studii, în diferite zone geografice, au căutat potențiali vectori pentru *D. immitis* și *D. repens*. Au

fost amplasate capcane, în mai multe zone endemice ce se foloseau de animale sau oameni pentru a stabili preferințele de hrănire a diferitelor specii de țânțari și pentru a detecta paraziții transmiși de aceștia. Detectarea ADN-ului specific pentru *D. repens* sau *D. immitis* în țânțari, nu demonstrează cu certitudine, că respectiva specie de țânțar este vector. Pentru a confirma că anumită specie de țânțar este vector, trebuie confirmată prezența parazitului la nivelul capului sau a toracelui. Prezența ADN-ului la nivelul acestor regiuni indică că larva filariilor a reușit să se dezvolte până la stadiul L3, stadiu ce este capabil să infecteze gazda definitivă (Capelli et al. 2018; Morchón et al. 2012).

4.2 Infecții umane

Oamenii sunt gazde accidentale pentru aceste filarii, fapt demonstrat și de ciclul biologic modificat în cazul infecțiilor umane. *D. repens* se dezvoltă subcutanat timp de mai multe luni de zile înainte să ajungă la maturitate. De cele mai multe ori paraziții mor înainte să producă microfiliarii și să își completeze ciclul dar pot să producă edem, inflamație locală tranzitorie și granuloame subcutanate (Baptista-Fernandes et al. 2015). Majoritatea infecțiilor umane, cu *D. repens* sunt localizate în partea superioară a corpului (75.8%). Au fost raportate foarte multe cazuri de infecții localizate la nivel ocular sau periocular, mai exact la nivelul pleoapelor sau la nivel subconjunctival. Infecțiile cu *D. repens* au mai fost raportate și la nivelul sânelui, la nivelul organelor genitale masculine, la nivelul plămânilor sau la nivelul viscerelor din cavitatea abdominală (Pampiglione și Rivasi 2000).

Infecțiile umane cu *D. immitis* sunt localizate de cele mai multe ori la nivelul arterelor mici de la nivel pulmonar. Ocluzia acestor artere poate duce la infarct și producerea unei leziuni granulomatoase bine delimitată ce poartă numele de leziune cu forma unei monede, sau “coin lesion”, în literatura anglosaxonă. Aceste leziuni au o mărime de 1-3 cm iar după o examinare radiografică, pot fi confundate cu tumori, tuberculoză sau infecții micotice (Orihel și Eberhard 1998).

4.3 Infecții la animale sălbatice

Infecțiile cu *D. immitis* și *D. repens* au fost identificate și la carnasierile sălbatice din mai multe regiuni geografice. Au fost identificate infecții cu *D. immitis*, cu microfiliarii, la mai multe animale sălbatice, din regiuni diferite din Statele Unite ale Americii. Cele mai multe infecții au fost raportate la animale ce

trăiesc în apropierea zonelor locuite de oameni, cum sunt coioții (*Canis latrans*) sau vulpile (*Vulpes vulpes*). Au fost raportate infecții cu *D. immitis* la șacali, vulpi și lupi din țări din vestul dar și estul Europei. În Italia, au fost raportate la vulpi și infecții cu *D. repens*. Au fost raportate infecții cu filarii la feline sălbatice și urși din grădinile zoologice, dar aceste infecții nu sunt importante din punct de vedere epidemiologic deoarece animalele infectate nu prezentau microfilarii.

Având în vedere prezența infecțiilor cu *D. repens* și *D. immitis* la animale sălbatice, este foarte important să se ia în considerare rolul acestora în menținerea acestor infecții într-un teritoriu (McCall et al. 2008; Simón et al. 2012).

4.4 Ciclul biologic în vectorul artropod

După cum se poate observa și din reprezentarea grafică a ciclului, din figura 4.1, microfiliariile sunt ingerate de către țânțarii femele, în timpul hrănirii acestora. Dezvoltarea microfiliariilor, poate avea loc doar dacă țânțarul infectat este un vector competent, iar numărul de microfilarii ce se dezvoltă depinde de eficiența ca vector a țânțarului. După hrănirea țânțarului, microfiliariile trec prin faringe, ajung în intestinul țânțarului și apoi în tuburile Malpighi, în decurs de 24 de ore. În celulele din zona distală a tuburilor Malpighi, microfiliariile se transformă în larve de stadiul 1, sau L1, denumite în literatura anglo-saxonă și “sausage stage”.

Tot în celulele din tuburile Malpighi, are loc și transformarea în larve L2, la 8-10 zile după infecție, și în larve L3, la aproximativ 3 zile după transformarea în larva L2. Larvele L3 părăsesc tuburile Malpighi, trec prin hemocel și ajung la labium (Cancrini și Gabrielli 2007; Simón et al. 2012).

Dezvoltarea larvelor la stadiul L3, capabil să infecteze vertebratele este dependentă de factori climatici. Această dezvoltare are loc doar dacă temperatura exterioară este mai mare de 14°C. Temperaturi externe mai mari, pe o perioadă mai îndelungată vor permite o dezvoltare mai rapidă a larvelor L3.

Pentru a cuantifica timpul și temperatura necesară pentru dezvoltarea larvelor L3 a *D. immitis* se calculează HDUs (Heartworm development units). Valoarea HDUs reprezintă numărul de grade, cu care media zilnică a temperaturii, depășește valoarea de 14°C. Numărul HDUs se cumulează de la o zi, la alta până la 130 HDUs. Numărul de zile necesar pentru a ajunge la valoarea de 130 HDUs corespunde cu durata necesară pentru dezvoltarea larvei L3. Această metodă, folosită pentru a determina durata dezvoltării larvei L3, a fost concepută în 1989, de către Slocombe et. al. (Slocombe, J.O.D., Surgeoner și Srivastava 1989).

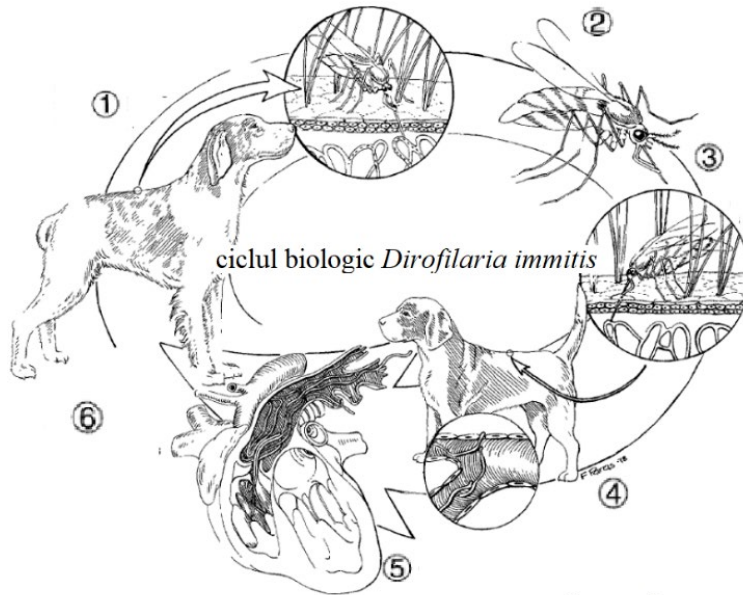


Figura 4.1: Ciclul vital al parazitului *D. immitis* în gazda definitivă, vertebrată. Ciclul durează 6.5 luni și depinde de maturarea microfilariei, într-un țânțar ce este vector, până la stadiu de larvă L3. Această maturare este dependentă de temperatura externă. **1:** țânțarii ingera microfilarii înțepând câini infectați, **2:** microfilariele se transformă în larve L3 în interiorul țânțarului **3:** țânțarii infectați depun larvele L3 pe pielea animalului după hrănire **4:** larvele L3 pătrund în corpul câinelui prin leziune și se transformă în larve L5 **5:** larvele L5 ajung în sistemul circulator și embolizează la nivelul arterelor pulmonare **6:** ciclul este încheiat după 6.5 luni, când vor fi produse noi microfilarii (Knight și Lok 1998)

Figure 4.1: The life cycle of *D. immitis* in the mammalian host. The cycle lasts 6.5 months and transmission depends on the temperature-dependent maturation of microfilaria to L3 larva, in a vector-competent mosquito. **1:** the mosquito bites the microfilaremic dog and ingests the microfilaria **2:** the microfilaria transform in L3 larvae inside the mosquito, **3:** the infected mosquito deposit the L3 larva in the skin while biting the vertebrate host, **4:** the L3 larva enter through the bite wound and mature inside the tissue to the stage of L5, **5:** L5 larva penetrate the systemic veins and embolize in the pulmonary arteries **6:** the life cycle is completed after approximately 6.5 months, when new microfilaria are produced (Knight și Lok 1998)

Această metodă a fost folosită pentru prima oară pe continentul Nord American și este utilă pentru identificarea zonelor cu risc ridicat, unde se pot dezvolta mai multe generații pe sezon dar și pentru identificarea perioadei din an când chemo-profilaxia este necesară (Genchi et al. 2005; Knight și Lok 1998; Slocombe, J.O.D., Surgeoner și Srivastava 1989).

Sistemul imunitar al țânțarului reprezintă un alt factor important ce poate să împiedice dezvoltarea larvelor L3. Artropodele au un sistem imunitar ce implică un răspuns imun celular dar și umoral. Acest sistem imunitar este capabil să recunoască și să fagociteze sau să încapsuleze cauza infecției. Încapsularea implică depunerea de melanină în jurul parazitului, oprind dezvoltarea larvelor (Infanger et al. 2004).

Cantitatea de larve ce infectează țânțarul reprezintă un alt factor important ce poate duce la oprirea dezvoltării larvelor. Un număr prea mare de larve poate duce la moartea țânțarului datorită compromiterii funcției tuburilor Malpighi. Acest lucru se poate întâmpla mai ales când larvele L1 pătrund în tuburile Malpighi sau când larvele L3 părăsesc acest organ. Numărul maxim de larve ce pot infecta fără a duce la moarte gazdei depinde de specia țânțarului și cea a dirofilariei. Numărul larvelor ce pot infecta un țânțar și să fie compatibile cu viața este mai mare pentru *D. repens*, în comparație cu *D. immitis* (Cancrini și Gabrielli 2007).

4.5 Ciclul biologic în gazda definitivă

În timpul hrănirii, țânțarii depun hemolimfă infectată cu larve în apropierea rănii ce rezultă în urma puncției pielii gazdei definitive. În cazul infecțiilor cu *D. immitis*, larvele în stadiul 3 (L3) pătrund în pielea gazdei și se dezvoltă în larve (L4), între 3 și 12 zile după infecție. Dezvoltarea de la larve (L4) la pre-adult are loc între 50 și 70 de zile după infecție. Pre-adulții ajung în artera pulmonară și în ventricolul drept între 70 și 85 de zile și până la 120 de zile de la infecție parașitii devin maturi. Larvele (L3) ale *D. repens* rămân la nivel subcutanat unde se transformă în larve (L4), pre-adult și în final în adult. Adulții *D. repens* pot produce microfilarii după cel puțin 164 de zile de la infecția gazdei definitive (Bowman 2013b; Simón et al. 2012).

Femelele *D. immitis* au o lungime între 250 mm și 300 mm și o lățime între 1 mm și 1.3 mm, iar masculii au o lungime între 120 mm și 200 mm și o lățime între 0.7 mm și 0.9 mm. În cazul *D. repens*, femelele au o lungime între 100 mm și 170 mm și o grosime între 4.6 mm și 6.3 mm masculii au o lungime între 50 mm și 70 mm și o grosime între 3.7 mm și 4.5 mm. Adulții *D. immitis* și

D. repens pot să trăiască până la 7 respectiv 10 ani iar microfiliariile până la 2 ani (Capelli et al. 2018; Simón et al. 2012).

4.6 Răspândirea în Europa

Dirofilaria immitis și *Dirofilaria repens* sunt infecții endemice în multe țări din Europa.

În trecut, mai multe studii au raportat prevalențe mari ale infecțiilor canine cu *D. immitis* în țări cu un climat mediteranean, ca Italia, Spania sau Portugalia. În nordul Italiei, în apropierea râului Po au fost raportate prevalențe de 35% pe când în regiuni din sudul Italiei au fost raportate prevalențe scăzute (0.01% - 0.6%). Au fost raportate prevalențe mari și în sudul și în estul Spaniei, și în Insulele Canare (între 37% și 8%), dar și în sudul Portugaliei și în Insula Madeira (30%-12%) (McCall et al. 2008). Studii mai recente raportează o scădere a prevalenței în unele regiuni din aceste țări. În nordul Italiei au fost raportate prevalențe de 8%, în Insulele Canare (Spania) de 19%, în estul Spaniei de 2.8% și în Portugalia de 4% (Genchi și Kramer 2020).

Printre primele studii epidemiologice ce au studiat infecțiile canine cu *D. repens*, în Italia au avut loc în nordul țării și au raportat o prevalență crescută în comparație cu infecțiile cu *D. immitis*. Studii recente raportează că infecțiile canine cu *D. repens* sunt endemice în toate regiunile din Italia, inclusiv în cele mai mari insule, Sicilia și Sardinia. Prevalența acestor infecții variază între 1.5% și 12%. Prevalența infecțiilor canine cu *D. repens* a fost documentată și pe teritoriul Spaniei unde au fost raportate prevalențe scăzute în nord-vest și în centrul țării, dar o prevalență foarte crescută, de 84.6%, în sud-estul țării. În Portugalia nu au fost raportate cazuri autohtone de infecții canine cu *D. repens* până în anul 2016, iar în Grecia este raportată o prevalență mult mai mare în nordul țării, în comparație cu sudul țării (Capelli et al. 2018).

Mai multe studii epidemiologice recente au prezentat prevalențe crescute ale infecțiilor canine cu *Dirofilaria* spp. în mai multe țări din Europa centrală și de est, unde nu au fost raportate multe infecții în trecut (Genchi și Kramer 2020; Otranto et al. 2009; Simón et al. 2012).

În Austria, au fost identificate infecții autohtone cu *D. repens* la câini, la țânțari, în estul țării și, începând cu anul 2008, și la oameni. În Polonia, primul focar de infecții canine cu *D. repens* a fost raportat în 2008, iar prevalența variază între 11.7% și 38%. În Republica Cehă, au fost raportate cazuri umane, iar infecțiile canine sunt raportate în sud-estul țării. Au fost raportate infecții umane

cu *D. repens* și în Ungaria, iar în această țară, prevalența infecțiilor canine variază între 14% și 30% (Capelli et al. 2018).

Raportările infecțiilor cu *Dirofilaria* spp., în estul Europei, și mai ales în țări precum Bulgaria și Serbia, au o importanță sporită pentru situația epidemiologică din România. Aceste țări învecinează România la sud și la vest, iar în regiunile din sudul și vestul României au fost raportate majoritatea infecțiilor *Dirofilaria* spp. la câine și la om.

În regiunea Voivodina, din nordul Serbiei, au fost raportate infecții, la câini, cu prevalența de 49.2%, pentru *D. repens*, 7.2% pentru *D. immitis* și doar 2.1% pentru *A. reconditum* (Tasić et al. 2008). Și în sudul Voievodinei, au fost raportate prevalențe crescute a infecțiilor la câini (42.6% pentru *D. repens* și 22.9% pentru *D. immitis*) (Tasić et al. 2012).

În Serbia, au fost raportate 21 de cazuri de dirofilarioză umană. Toți pacienții locuiau într-o localitate situată lângă un râu și majoritatea proveneau din nordul țării (76.2%). În cele mai multe cazuri, paraziții au fost localizați în partea superioară a corpului (81%), la nivel subcutanat (47.6%) și subconjunctival (42.8%) (Dami et al. 2009; Tasić et al. 2011; Vucaj Cirilovic et al. 2014). Tot în Serbia a fost testată și expunerea populației umane la aceste infecții, prin teste serologice. Nu a existat o diferență mare între prevalența persoanele seropozitive pentru *D. repens* (9.7%) și cele pentru *D. immitis* (8.1%). Cele mai mari prevalențe obținute prin testarea serologică au fost în orașele nordice Pancevo (27.1%) și Novi Sad (16.3%) dar și în est; Zajecar (15.8%) și un oraș din sud; Vranje (15.1%) (Tasić-Otašević et al. 2014).

În Bulgaria, prevalența infecțiilor canine cu *D. immitis* a fost raportată în 2001 ca 12.5% (Georgieva, Kirkova, și Ivanov 2001). În anul 2008, un alt studiu raportează o prevalență totală a infecțiilor de 10.17%, de 9.19% pentru *D. immitis* și de doar 1.36% pentru infecțiile cu *D. repens* (Kirkova et al. 2008). Un studiu mai recent, din 2015, raportează o prevalență de 16.2% pentru *D. immitis*, în centrul țării iar un alt studiu recent, din 2016 raportează o prevalență de 15% pentru *D. immitis* și 18% pentru *D. repens*, în vestul Bulgariei (regiunea Sofia) (Pantchev et al. 2015; Radev et al. 2016).

Începând cu anul 1973, au fost raportate în Bulgaria 47 de cazuri de dirofilarioză umană. Majoritatea cazurilor au fost raportate în vestul țării (Sofia, 23.4%), dar și în estul țării (Burgas, 14.9%). Ca și în alte țări, majoritatea paraziților au fost localizați în partea superioară a corpului (80.9%), la nivel subcutanat (74.5%) și subconjunctival (21.3%) (Harizanov, Jordanova, și Bikov 2014).

În România, infecții cu *D. repens* la câini au fost raportate între anii 2010 și 2014 în vestul României, în județele Timiș și Hunedoara, în sudul României, în județele Argeș, Dolj, Teleorman și Dâmbovița, dar și în sud-estul țării, în Tulcea și Constanța (Ionică et al. 2014; Poliana, Romanita, și Niculae 2013; Roberta CIOCAN, Gh. DĂRĂBUȘ, Olga JACSÓ 2010). Prevalența infecțiilor cu *D. repens* variază foarte mult de la o zonă la alta, dar rezultatele acestor studii nu pot fi comparate deoarece au fost folosite tehnici diferite, respectiv metoda Knott modificată și metoda ELISA (Ionică et al. 2014; Poliana et al. 2013; Roberta CIOCAN, Gh. DĂRĂBUȘ, Olga JACSÓ 2010).

Infecțiile la câini cu *D. immitis* au fost raportate în România între anii 2007 și 2016, iar distribuția acestor infecții se suprapune parțial cu distribuția infecțiilor cu *D. repens*. Aceste infecții cu *D. immitis* au fost raportate în vestul României, în județele Arad și Timiș, în sudul țării, în județele Mehedinți, Teleorman și Dâmbovița, în sud-estul țării, în județele Ialomița, Tulcea și Constanța, în centrul țării, în Brașov și în estul țării în Iași, Vaslui și Galați (Ciucă et al. 2016; COMAN et al. 2007; Ionică et al. 2014; Mircean et al. 2012; Poliana et al. 2013).

În România au fost raportate infecții umane cu *D. repens* în aproape toate regiunile țării. În nord-vestul țării au fost raportate două infecții, la nivel subcutanat și subconjunctival, în județele Bihor și Sălaj (Lupșe et al. 2014; Macarie et al. 2017). În sudul țării un caz cu localizare subcutanată a fost raportat în București și unul cu localizare intramusculară în județul Dolj (Gheorghiu et al. 2017; Popescu et al. 2012). În estul țării a fost raportat un caz de infecție la nivel subconjunctival în județul Galați (Arbune și Dobre 2015).

PARTEA A-II-A
-CERCETĂRI PROPRII-

PART II
-PERSONAL CONTRIBUTIONS-

CAPITOLUL V EPIDEMIOLOGIA LEISHMANIOZEI CANINE ÎN SUDUL ROMÂNIEI

CHAPTER V THE EPIDEMIOLOGY OF CANINE LEISHMANIOSIS IN THE SOUTH OF ROMANIA

5.1 Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor

Leishmania infantum este un protozoar unicelular ce este transmis în Europa de flebotomi din genul *Phlebotomus* și este principalul agent etiologic al leishmaniozei canine (CanL) în Europa. *L. infantum* este endemic în țările din regiunea mediteraneană iar CanL este considerată a fi una dintre cele mai importante boli vectoriale ale câinelui cu potențial zoonotic (Dantas-Torres et al. 2012; Solano-Gallego et al. 2009).

Ca și în cazul altor boli vectoriale, distribuția și prevalența CanL în Europa este în schimbare (Maroli et al. 2008; Otranto et al. 2009). Aceste schimbări sunt influențate de modificări de habitat ce influențează distribuția flebotomilor (Maroli et al. 2008). Un alt factor important este reprezentat de intensificarea transporturilor de câini între zone endemice din sudul Europei și zone non-endemice, fenomen ce a luat amploare după intrarea României în Uniunea Europeană (Maia și Cardoso 2015; Maroli et al. 2008).

Schimbări ale prevalenței și distribuției au fost raportate în țări ce sunt deja endemice dar și în țări considerate non-endemice (Mirá et al. 2012; Mircean et al. 2014; Otranto et al. 2009; Tánčzos et al. 2012; Tsatchev et al. 2010). Aceste schimbări au fost raportate în țări din vestul Europei ca Spania sau Italia dar și în țări din estul Europei ca Bulgaria, Ungaria sau România (Dumitrache et al. 2016; Mirá et al. 2012; Otranto et al. 2009; Tánčzos et al. 2012; Tsatchev et al. 2010).

România este o țară considerată non-endemică dar există studii istorice despre cazuri de leishmanioză umană și canină. În regiunea de sud a României au fost raportate cazuri de leishmanioză umană și canină între 1912 și 1969 (DANCESCO 2008; Mircean et al. 2014). Primul caz de leishmanioză umană a fost raportat în 1912, iar primul caz de CanL a fost raportat în 1935 de către Mircean et al. (Mircean et al. 2014). Mai multe cazuri de leishmanioză umană au fost raportate în sudul României între 1944 și 1955 (DANCESCO 2008; Mircean

et al. 2014). Tot în această perioadă de timp a fost raportată și o epidemie de leishmanioză umană, la copii din județul Dolj (DANCESCO 2008; Mircean et al. 2014). Între anii 1967 și 1968, au fost publicate studii epidemiologice care priveau infecțiile cu *L. infantum* la câini și au raportat prevalențe de 1.2% și 2.2% în sud-vestul României (Mircean et al. 2014).

În perioada 1969-1998 nu au mai fost raportate cazuri noi (DANCESCO 2008; Mircean et al. 2014). Această perioadă în care nu au mai fost raportate cazuri noi de leishmanioză urmează implementarea programului național de eradicare a malariei ce a implicat folosirea în masă de insecticide precum dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) și hexachlorocyclohexane (HCH) (Mircean et al. 2014; Neghina et al. 2010). Este foarte probabil că această lipsă de cazuri de leishmanioză, observată între anii 1969-1998 a fost o consecință neintenționată, dar binevenită a folosirii în masă de insecticide.

După anul 1989 numărul oamenilor și a animalelor ce au călătorit între România și țările endemice din sudul Europei a crescut datorită schimbărilor politice. O consecință a acestui fenomen a fost apariția unui număr de infecții cu *L. infantum* la oameni sau animale ce au călătorit în zone endemice (Găman, Dobrea, și Găman 2010; Gogoășe et al. 2013; Pavel et al. 2017). Acest mecanism de extindere a acestei infecției este foarte plauzibil pentru țara noastră pentru că în România încă sunt raportați flebotomi capabili să transmită *L. infantum* (Cazan, Păstrav, Györke, et al. 2019; Cazan, Păstrav, Ionică, et al. 2019; Maia și Cardoso 2015).

Deși infecțiile autohtone, umane sau canine cu *L. infantum* încă nu sunt comune în România, între 2013 și 2017 au fost raportate mai multe infecții autohtone la câini dar și o infecție umană și una la șacal (*Canis aureus*) (Dumitrache et al. 2016; Gogoășe et al. 2013; Mircean et al. 2014; Mitková et al. 2017). Primul caz recent de leishmanioză umană autohtonă a fost raportat în 2013, la un pacient ce provenea din Iași, dar a lucrat în județul Dolj (Gogoășe et al. 2013). În 2014 a fost raportat primul caz recent de leishmanioză canină autohtonă în Râmnicu Vâlcea, în județul Vâlcea, învecinat cu județul Dolj (Mircean et al. 2014). În 2016, a fost publicat rezultatul primului studiu epidemiologic recent despre infecțiile canine autohtone cu *L. infantum* în sudul României (Dumitrache et al. 2016). Acest studiu a avut loc tot în județul Vâlcea și a raportat la câini ce nu prezentau semne clinice specifice leishmaniozei canine, o seroprevalență de 3.7%, o prevalență de 8.7%, folosind tehnica qPCR din probe de secreții oculare, și o prevalență de 1.2%, folosind tehnica qPCR din probe sânge (Dumitrache et al. 2016). Pe lângă infecții cu *L. infantum* la oameni și la câini, în 2017 a fost

raportat și un caz de infecție cu *L. infantum* la un șacal (*Canis aureus*) din județul Dolj (Mitková et al. 2017).

Aceste studii recente ce prezintă infecții autohtone cu *L. infantum* la om și animale indică faptul că există riscul probabil ca leishmanioza umană și canină să devină endemică în sudul României. Din acest motiv, am încercat să investigăm infecțiile posibile cu *L. infantum* la câinii fără stăpân din sudul României printr-un studiu epidemiologic proiectat în așa fel încât să fie reprezentate toate regiunile din sudul României iar locațiile de unde au fost colectate probele au fost alese luând în considerare locurile unde au fost raportate infecții cu *L. infantum* în trecut.

5.2 Material și metodă

5.2.1 Colectarea probelor

Au fost recoltate probe de sânge venos și secreții oculare de la 300 de câini din 5 adăposturi municipale, din sudul României, între 10 și 20 Iulie 2017.

Tabel 5.1: Numărul de probe colectate pe județ și oraș

Table 5.1: The number of samples collected per each county and town

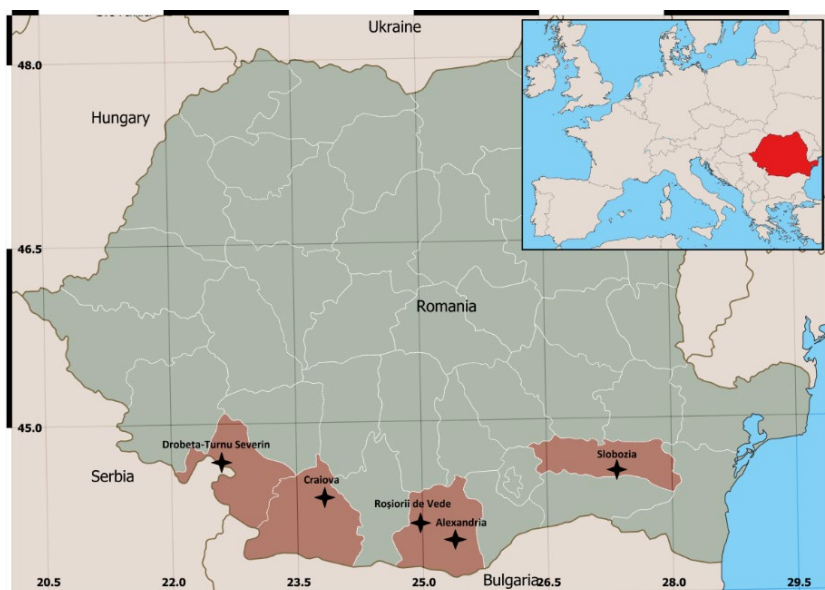
Județ	Oraș	Număr de probe
Mehedinți	Drobeta-Turnu Severin	64
Dolj	Craiova	100
Teleorman	Roșiorii de Vede	50
	Alexandria	41
Ialomița	Slobozia	45
Total		300

Probele de sânge au fost recoltate din vena cefalică, în vacutainere cu și fără anticoagulant EDTA. Secrețiile oculare au fost colectate, folosind un tampon steril, la nivelul corneei și pleoapei inferioare cum a fost descris în trecut (Strauss-Ayali et al. 2004). Probele au fost recoltate din adăposturi de la marginea orașelor Drobeta-Turnu Severin, Craiova, Roșiorii de Vede, Alexandria și Slobozia. Câinii au fost capturați pe teritoriul municipiului sau în localități din apropierea municipiului, într-o perioadă de două săptămâni înaintea recoltării probelor și nu au primit medicație antiparazitară.

Probele de sânge în vacutainere cu EDTA și tamponanele cu secreții oculare au fost stocate la -20°C până la extragerea ADN-ului. Probele de sânge

în vacutainere fără anticoagulant au fost centrifugate, iar serul a fost separat și stocat la -20°C până la prelucrarea lor.

Locația și coordonatele punctelor de recoltare sunt descrise în figura 5.1 iar numărul de probe colectate pe județe și orașe sunt descrise în tabelul 5.1.



Figură 5.1: Puncte de recoltare a probelor: Drobeta-Turnu Severin ($44^{\circ}37'53.9''\text{N } 22^{\circ}37'55.2''\text{E}$), Craiova ($44^{\circ}20'32.4''\text{N } 23^{\circ}43'02.6''\text{E}$), Roșiorii de Vede ($44^{\circ}07'04.8''\text{N } 24^{\circ}59'58.5''\text{E}$), Alexandria ($43^{\circ}57'14.5''\text{N } 25^{\circ}20'43.6''\text{E}$) și Slobozia ($44^{\circ}34'18.1''\text{N } 27^{\circ}20'51.4''\text{E}$)

Figure 5.1: The locations of the samplings sites: Drobeta-Turnu Severin ($44^{\circ}37'53.9''\text{N } 22^{\circ}37'55.2''\text{E}$), Craiova ($44^{\circ}20'32.4''\text{N } 23^{\circ}43'02.6''\text{E}$), Roșiorii de Vede ($44^{\circ}07'04.8''\text{N } 24^{\circ}59'58.5''\text{E}$), Alexandria ($43^{\circ}57'14.5''\text{N } 25^{\circ}20'43.6''\text{E}$) și Slobozia ($44^{\circ}34'18.1''\text{N } 27^{\circ}20'51.4''\text{E}$)

5.2.2 Amplasarea capcanelor pentru flebotomi

În incinta fiecărui adăpost, de unde au fost colectate probe de la câini, au fost amplasate 4 capcane pentru insecte cu fototropism pozitiv. Capcanele au fost construite din materiale autohtone, după modelul “CDC light trap”. În figura 5.2.(a) se poate observa sursa de lumină, un bec cu filament incandescent de 5 wați, ce are rolul de a atrage insectele cu fototropism pozitiv. Sub sursa de lumină este poziționat un cilindru ce conține ventilatorul, care direcționează insectele spre plasa, ce are rolul de a colecta insectele. Sursa de lumină și ventilatorul au fost conectate la o baterie de 12 volți.

Capcanele au fost amplasate cu două ore înainte de apus, în diverse locuri din adăposturi, și colectate la răsărit. Capcanele au fost amplasate la înălțimile de aproximativ 1 m, 1,5 m și 2 m.

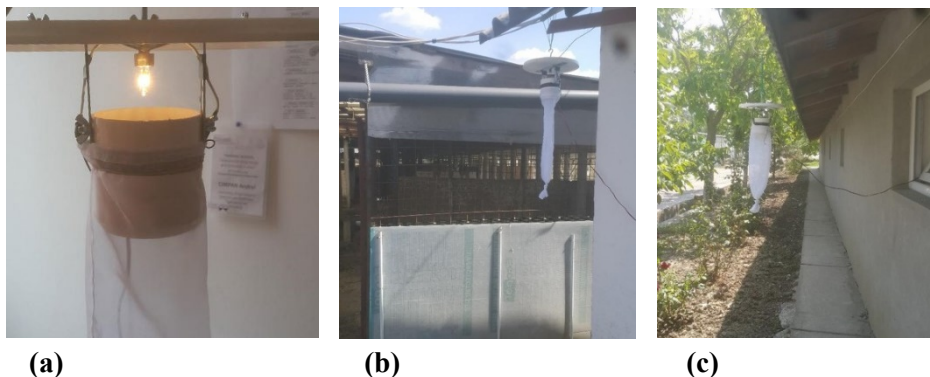


Figura 5.2: (a) capcana tip “CDC light trap”, se poate observa sursa de lumină, cilindrul ce conține ventilatorul și plasa (b), (c) capcanele amplasate la adăposturile din Roșiorii de Vede și Slobozia

Figure 5.2: (a) CDC light trap that contains an incandescent light bulb that lures the insects and the cylinder below contains the fan that directs the insects in the net (b), (c) the light traps placed at the sampling locations of Roșiorii de Vede and Slobozia

5.2.3 Extracția de ADN și analiză qPCR

Probele de sânge în vacutainere cu EDTA au fost transportate în Israel, la Școala de Medicină Veterinară "Koret", din Rehovot. Extracția de ADN a fost făcută cu kitul Ilustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, din Buckinghamshire UK, urmând instrucțiunile producătorului. ADN-ul din probele de secreții oculare au fost extrase folosind tehnica care utilizează fenol, cloroform și alcool izoamilic. Această tehnică a fost descrisă de către Strauss-Ayali et al., 2004 (Strauss-Ayali et al. 2004).

ADN-ul extras din sânge și secreții oculare au fost analizate folosind tehnica real-time qPCR cantitativă descrisă în tabelul 5.2. Prin această tehnică se amplifică ADN-ul circular din kinetoplastul speciei *L. infantum* folosind amorsele LEISH-1 și LEISH-2 și probele TaqMan-MGB cum a fost descris de Francino et al. (Francino et al. 2006).

Tabel 5.2: Program Real-time qPCR descris de (Francino et al. 2006) pentru amorsele LEISH-1 și LEISH-2

Table 5.2: The qPCR cycle described by (Francino et al. 2006), for the primers LEISH-1 and LEISH-2

Temperatură	Durață	Nr. de cicluri
50°C	2 m	
95°C,	10 m	
95°C	15 s	40
60°C	1 m	

5.2.4 Analiză serologică

A fost folosită tehnica ELISA pentru a determina anticorpilor anti-*L. infantum*. Pentru analiza serologică a fost folosit antigen de leishmania extras din cultură de *L. infantum* cum a fost descris anterior (Baneth et al. 1998). Toate probele de ser au fost diluate 1:100 și au fost introduse în godeurile unei plăci pentru ELISA cu antigenul extras anterior din culturile de *L. infantum*. Plăcile au fost menținute timp o oră la o temperatură de 37 °C. După perioada de incubare plăcile au fost spălate de trei ori cu o soluție ce conține 0.1% polisorbitat (Tween 20, de la Sigma®) și 50 nM tampon fosfat salin. După spălare în godeuri a fost introdusă o soluție ce conține proteine de tip A, conjugate cu peroxidaze extrase din hrean (HRP) și plăcile au fost incubate o oră la o temperatură de 37 °C. După un alt ciclu de trei spălări, a fost adăugat substratul în fiecare godeu (C₁₈H₁₈N₄O₆S₄, de la Boehringer Mannheim, Germania), iar plăcile au fost citite la o lungime de undă de 405 nm când densitatea optică controalelor pozitive au ajuns la o valoare între 0.95 și 1.0. Toate probele au fost lucrate în duplicat iar în fiecare placă a fost inclus un control pozitiv și un control negativ în triplicat pentru a monitoriza dacă există variații de citire între plăci. Probele cu densitate optică între 0.2 și 0.6 au fost considerate la limită iar probele cu densitate optică peste 0.6 au fost considerate pozitive.

5.3 Rezultate și discuții

Toate probele din acest studiu au fost negative din punct de vedere serologic. Probele de sânge și secreții oculare au fost negative la examenul qPCR (Cîmpan, Nachum-Biala, et al. 2019). Nu au fost identificați flebotomi în capcanele amplasate în adăposturi.

România este considerată o țară non-endemică dar studii istorice arată că au existat infecții cu *L. infantum* la câini dar și la oameni din sudul României. Acest

fapt indică că pot exista cazuri de leishmanioză canină autohtonă în această regiune și că există riscul ca sudul României să redevină endemic.

Studiile istorice, între 1912 și 1955, au raportat cazuri de leishmanioză umană în județe sudice, ca Dolj, Prahova și Giurgiu (Mircean et al. 2014). Alte două studii epidemiologice despre infecțiile canine cu *L. infantum* au raportat prevalențe de 1.2% și 2.2%, în Dolj și Mehedinți, la câini ce nu prezentau simptomatologie specifică leishmaniozei (Mircean et al. 2014). Studiile istorice despre ecologia și răspândirea flebotomilor au raportat flebotomi capabili să transmită *L. infantum*, *Phlebotomus neglectus* și *Phlebotomus perfiliewi* în județe sudice ca Mehedinți, Tulcea, Constanța și Teleorman (DANCESCO 2008). Studiile mai recente raportează un caz de leishmanioză umană autohtonă în 2013, în județul Dolj (Gogoșe et al. 2013) și un caz de infecție cu *L. infantum* la un șacal în 2017 (Mitková et al. 2017).

Primul caz de leishmanioză canină autohtonă a fost raportat în 2014 în Râmnicu Vâlcea (județul Vâlcea) (Mircean et al. 2014). Acest studiu a fost urmat de un studiu epidemiologic la câini din același oraș, ce nu prezentau simptomatologie specifică leishmaniozei canine. Acest studiu a raportat o seroprevalență de 3.7%. Folosind tehnica qPCR a fost raportată o prevalență 8.7% din probe de secreții oculare și 1.2% din probe din sânge (Dumitrache et al. 2016).

În 2019 a fost confirmată prezența flebotomului *P. perfiliewi* încă o dată, în județele Mehedinți, Giurgiu, dar și Vaslui (Cazan, Păstrav, Ionică, et al. 2019). Tot în 2019 *P. neglectus* a fost raportat în Mehedinți (Cazan, Păstrav, Ionică, et al. 2019).

Aceste studii recente, între 2013 și 2017, ce raportează infecții autohtone cu *L. infantum*, la om și animale, dar și prezența unor specii de flebotomi capabili să transmită *L. infantum*, sugerează că există un factor de risc legat de posibilitatea ca leishmanioza să redevină endemică în sudul României.

Câinele este considerat principalul rezervor al *L. infantum* pentru că este foarte susceptibil la infecție, iar o mare parte a câinilor infectați nu prezintă simptome clinice, dar reprezintă o sursă de infecție (Dantas-Torres 2007). Din aceste motive, în teritoriile unde leishmanioza este endemică, prevalența infecțiilor cu *L. infantum* în câini este foarte crescută (Dantas-Torres 2007). Tocmai pentru că specia canină reprezintă rezervorul principal pentru *L. infantum* studiind prevalența infecțiilor cu *L. infantum* la câinii fără stăpân, se poate înțelege dacă raportările recente de infecții cu *L. infantum* în sudul României sunt o consecință a faptului că leishmanioza redevine endemică.

Pentru a înțelege dacă aceste infecții recente indică că există o posibilitate ca leishmanioza să redevină endemică în sudul României, a fost organizat acest

studiu epidemiologic amănunțit despre infecțiile cu *L. infantum* la câini fără stăpâni din diverse județe din sudul României.

Colectarea probelor folosite în acest studiu a fost făcută ținând cont de locațiile infecțiilor cu *L. infantum* la oameni dar și la animale, ce au fost menționate în studiile anterioare. Pentru colectarea probelor au fost luate în considerare și locațiile unde au fost identificați flebotomi capabili să transmită *L. infantum*.

Locațiile de unde au fost colectate probele sunt din județe de unde anterior au fost raportate infecții cu *L. infantum* sau au fost găsiți flebotomi capabili să transmită *L. infantum*. Unele probe au fost colectate din județe ce se aflau lângă cele menționate mai sus.

În ciuda rezultatelor negative ale acestui studiu, factorii de risc ce ar putea determina ca sudul României să redevină o zonă endemică există în continuare: există noi raportări de infecții cu *L. infantum* în zone considerate non-endemice din estul Europei (Mircean et al. 2014; Tánczos et al. 2012; Tsatchev et al. 2010). Există un număr mare de oameni și animale ce călătoresc din România în zone endemice din Europa. Nu există un program la nivel național menit să monitorizeze sau să prevină acest tip de infecții. Mulți medici veterinari nu cunosc existența acestui risc.

5.4 Concluzii parțiale

Recent au fost raportate în România infecții autohtone cu *L. infantum* la câini, dar și un caz raportat la un om și la un șacal (Gogoășe et al. 2013; Mircean et al. 2014; Mitková et al. 2017). În ciuda acestor studii, nu raportăm infecții la câini chiar și după efectuarea acestui studiu epidemiologic exhaustiv.

Acest studiu indică că sudul României rămâne un teritoriu non-endemic pentru infecțiile cu *L. infantum*, chiar dacă factorii de risc asociați cu această infecție încă sunt prezenți.

Datorită factorilor de risc menționați mai sus este oportun să se continue monitorizarea cazurilor de leishmanioză canină, dar și efectuarea altor studii epidemiologice în viitor.

CAPITOLUL VI

STUDIU SEROEPIDEMIOLOGIC A LEISHMANIOZEI CANINE ÎN SUD-ESTUL ROMÂNIEI

CHAPTER VI

SEROEPIDEMIOLOGICAL STUDY OF CANINE LEISHMANIOSIS IN THE SOUTH-EAST OF ROMANIA

6.1 Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor

Leishmanioza canină este o zoonoză provocată de un parazit din genul *Leishmania* ce este endemic în peste 70 de țări din toate continentele, cu excepția Oceaniei (Dantas-Torres et al. 2012; Dumitrache et al. 2016). Deși mai multe specii de *Leishmania* pot să infecteze câinii, *Leishmania infantum* este cel mai important agent etiologic al leishmaniozei canine și cea mai răspândită specie de *Leishmania* de pe continentul European. *L. infantum*, în Europa este transmisă de către mușcătura flebotomilor din genul *Phlebotomus* (Solano-Gallego et al. 2009).

În Europa, *L. infantum* este endemică în țările mediteraneene dar ca și pentru celelalte boli vectoriale, a fost observată o schimbare în distribuția și prevalența acestui parazit. Aceste schimbări sunt, în mare parte, atribuite schimbărilor climatice și altor schimbări ale mediului induse de oameni (Medlock și Leach 2015; Otranto et al. 2009).

Oamenii și animalele ce călătoresc între zone endemice și non-endemice joacă un rol important în răspândirea bolii (Day 2011; Maia și Cardoso 2015). Acest mecanism de răspândire a infecției este în mod special eficient, deoarece câinele reprezintă rezervorul principal al acestei infecții, iar în contextul libertății de circulație din Uniunea Europeană, există un număr mare de animale și oameni ce călătoresc între țările din sudul Europei și țările din nord sau est (Maia și Cardoso 2015; Solano-Gallego et al. 2009).

Aceste schimbări ale distribuției și prevalenței leishmaniozei canine în Europa sunt bine documentate. Există exemple de leishmanioză canină în zone non-endemice din Italia (Otranto et al. 2009) și Spania (Mirá et al. 2012). În estul Europei există o situație similară: au fost raportate cazuri de leishmanioză canină în țări considerate non endemice, cum sunt Bulgaria (Tsatchev et al. 2010),

Ungaria (Tánczos et al. 2012) sau România (Mircean et al. 2014). De asemenea, în Serbia au fost raportați flebotomi infectați cu *L. infantum* (Vaselek et al. 2017).

În regiunea de sud a României au fost raportate cazuri de leishmanioză umană și canină între 1912 și 1969, dar în perioada 1969-1998 nu au mai fost raportate cazuri noi (DANCESCO 2008; Mircean et al. 2014). Această perioadă în care nu au mai fost raportate cazuri noi de leishmanioză, urmează implementarea programului național de eradicare a malariei, ce a implicat folosirea în masă de insecticide, precum dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) și hexachlorocyclohexane (HCH), între anii 1969 și 1998 (Mircean et al. 2014; Neghina et al. 2010). Este foarte probabil că această lipsă de cazuri de leishmanioză, observată între anii 1969-1998, a fost o consecință neintenționată, dar binevenită, a folosirii în masă de insecticide.

După anul 1989, numărul oamenilor și a animalelor ce au călătorit între România și țările endemice din sudul Europei a crescut datorită schimbărilor politice. Această tendință a crescut după aderarea României la Uniunea Europeană. O consecință a acestui fenomen a fost apariția unui număr crescut de infecții cu *L. infantum* la oameni sau animale ce au călătorit în zone endemice (Gogoșe et al. 2013; Pavel et al. 2017). Acest mecanism de extindere a acestei infecții este foarte plauzibil pentru țara noastră, pentru că în România încă sunt raportați flebotomi capabili să transmită *L. infantum* (Cazan, Păstrav, Györke, et al. 2019; Cazan, Păstrav, Ionică, et al. 2019; Maia și Cardoso 2015).

Deși infecțiile autohtone, umane sau canine, cu *L. infantum* încă nu sunt comune în România, între 2013 și 2017 au fost raportate mai multe infecții autohtone la câini dar și o infecție umană și una la șacal (*Canis aureus*) (Dumitrache et al. 2016; Gogoșe et al. 2013; Mircean et al. 2014; Mitková et al. 2017).

6.2 Material și metode

6.2.1 Colectarea probelor

Probele de ser au fost colectate între 9 și 11 August 2017, de la 110 câini, din două adăposturi municipale, din sud-estul României. Un adăpost se afla lângă orașul Galați (45°27'14.1"N 28°04'34.0"E) și unul lângă Călărași (44°12'28.7"N 27°19'52.3"E), după cum se vede în figura 6.1.

Câinii din adăpost au fost capturați din oraș și din împrejurimile orașului cu două săptămâni înaintea recoltării probelor. Toate probele au fost colectate prin puncție din vena cefalică în vacutainere cu factor de coagulare. Serul a fost

obținut prin centrifugare și a fost stocat la -20°C până a fost folosit pentru analiza serologică.



Figura 6.1: Harta scoate în evidență locația celor două adăposturi. Județele sunt scoase în evidență iar stelele marchează poziția orașelor

Figure 6.1: The map marks the locations of the sampling sites and highlights the corresponding counties

Căinii incluși în studiu nu au primit tratamente sau profilactice antiparazitare. Recoltarea probelor a fost făcută cu acordul proprietarilor adăpostului.

6.2.2 Analiză serologică

A fost folosită tehnica ELISA pentru a determina anticorpilor anti-*L. infantum*. Pentru analiza serologică a fost folosit antigen de leishmania extras din cultură de *L. infantum* cum a fost descris anterior (Baneth et al. 1998). A fost folosită titrarea “tablă de șah” pentru a obține concentrația optimă de antigen, de 2.5 mg/ml. Au fost folosite plăci pentru ELISA din polistiren. În godeurile plăcii a fost introdusă 100 ml de soluție de antigen dizolvat în 0.1 M tampon carbonat, cu un pH de 9.6. Tamponul carbonat este o soluție ce conține apă distilată, carbonat de sodiu și bicarbonat de sodiu. Plăcile au fost ținute 12 ore la 4°C . Godeurile au fost spălate de trei ori cu o soluție ce conține apă distilată și un polisorbit (0,05 Tween 20, de la Sigma®). După spălare în godeuri au fost

introduse probele de ser diluat 1/300 în tampon fosfat salin cu un pH de 7.2. Fiecare probă a fost testată în duplicat, iar fiecare placă a avut control pozitiv și control negativ în triplicat. Plăcile cu ser au fost puse la incubat pentru 3 ore la temperatura camerei după care au fost spălate de trei ori cu aceeași soluție cu care a fost făcută prima spălare. După spălare, în fiecare godeu a fost introdusă o cantitate de 100 ml de soluție ce conține anticorpi secundari (Anti-Dog IgG (whole molecule)-FITC antibody, F7884, SIGMA®), diluați 1:30.000 în tampon fosfat salin. Placa a fost incubată încă odată pentru 3 ore la temperatura camerei după care a fost spălată încă odată cu tampon carbonat cu o concentrație de 1mg/ml și pH 9.8. După această ultimă spălare a fost introdus, în fiecare godeu, substratul ($C_6H_6NO_6P$ de la SIGMA®) iar placa a fost ținută la temperatura camerei timp de 20 minute.

După această ultimă perioadă de așteptare, reacția a fost oprită prin adăugarea de 50 μ l hidroxid de sodiu și a fost citită densitatea optică din godeuri folosind aparatul HUMANREADER (HUMAN Diagnostic Systems, Germany), la o lungime de undă de 405 nm și cu un filtru de referință de 630 nm. Valoarea prag a fost determinată făcând media controalelor negative și adăugând la această valoare de trei ori deviația standard (Diakou, Papadopoulos, și Lazarides 2009; Kouam et al. 2010; Tsakmakidis et al. 2017).

6.2.3 Analiză statistică

Prevalența și intervalul de încredere 95% a fost calculat folosind programul Epi Info™ 7.2 de la “Center for Disease Control” (CDC, Atlanta, USA).

Diferența de prevalență dintre cele două puncte de recoltare a probelor a fost analizată folosind testul Pearson Chi-square și programul IBM SPSS Statistics 20.0 software.

6.3 Rezultate și discuții

Cinci din cei 110 câini testați, 5 au prezentat anticorpi anti-Leishmania. Chiar dacă toți câinii pozitivi provin din județul Galați, datorită numărului mic de câini pozitivi, nu este o diferență importantă din punct de vedere statistic între seroprevalența dintre cele două județe. După cum se vede din tabelul 6.1, prevalența totală este de 4.54% iar în județul Galați este de 8.33% (Cîmpan, Diakou, et al. 2019).

Nu există informații suficiente și recente despre seroepidemiologia leishmaniozei în România. Studii istorice despre epidemiologia leishmaniozei au

fost publicate între anii 1912 și 1955. În aceste studii sunt decrie cazuri de leishmanioză umană, canină, chiar și o epidemie de leishmanioză la copii din județul Dolj (DANCESCO 2008; Mircean et al. 2014).

Tabel 6.1: Seroprevalența infecțiilor cu *L. infantum* in cele două județe
Table 6.1: The seroprevalence of *L. infantum* infections in the two counties

Județ	Oraș	poz/tot	Prevalență	95% CI
Călărași	Călărași	0/50	0%	-
Galați	Galați	5/60	8.33%	0.027-0.183
Total		5/110	4.54%	0.014-0.102

Cazuri individuale de leishmanioză umană au fost descrise și în județele Giurgiu și Prahova (DANCESCO 2008; Mircean et al. 2014).

Studii epidemiologice publicate între 1967 și 1968 raportează o prevalență a infecțiilor cu *L. infantum* de 1.2% și 2.2%, la câini din județele Dolj și Caraș-Severin (Mircean et al. 2014).

Vectori ai *L. infantum* ca *Phlebotomus neglectus* și *P. perfiliewi*, au fost raportați între 1910 și 1971, în regiuni din sudul României, ca Dobrogea, Muntenia, Oltenia, Banat, dar și în vestul țării, în Crișana (DANCESCO 2008).

Chiar dacă nu au mai fost raportate cazuri de leishmanioză umană și canină autohtonă, după folosirea în masă a insecticidelor în cadrul campaniei de eliminare a malariei în 1958, studiile menționate mai sus demonstrează că în sudul României leishmanioza provocată de *L. infantum* poate deveni endemică (Neghina et al. 2010).

Acum există și studii mai recente ce raportează cazuri autohtone de leishmanioză canină, un caz de leishmanioză autohtonă umană și o infecție autohtonă cu *L. infantum* la un șacal (Dumitrache et al. 2016; Gogoșe et al. 2013; Mircean et al. 2014; Mitková et al. 2017).

Există informații recente și despre prezența flebotomilor *P. neglectus* și *P. perfiliewi*, capabili să transmită *L. infantum*. Flebotomii *P. neglectus* și *P. perfiliewi* au fost speciile cele mai întâlnite în aceste studii, 83.27% respectiv 15.53% (Cazan, Păstrav, Ionică, et al. 2019). *P. neglectus* a fost găsit în sudul țării, în județul Mehedinți iar *P. perfiliewi* a fost găsit în sudul țării, în județele Mehedinți și Giurgiu dar și în estul țării, în județul Vaslui (Cazan, Păstrav, Györke, et al. 2019; Cazan, Păstrav, Ionică, et al. 2019).

Prezența infecțiilor autohtone cu *L. infantum* la câini, animale sălbatice și oameni, dar și a flebotomilor în sudul țării reprezintă factori de risc și pot duce

la răspândirea acestei infecții în România. Mai multe studii sunt necesare pentru a determina dacă aceste raportări se datorează transmiterii în urma importării unor animale deja infectate.

Deoarece câinele este considerat rezervorul principal pentru această infecție, este indispensabil pentru răspândirea acestui parazit într-un teritoriu. Din acest motiv, monitorizarea infecțiilor cu *L. infantum* la câini poate să ne ofere informații și despre riscul de infecție a altor animale sau a oamenilor.

Există prea puține informații despre prevalența infecțiilor cu *L. infantum* în județe ca Dolj și Vâlcea și sunt necesare mai multe studii pe această temă în această regiune, dar și în alte zone din sudul României. Nu există studii despre prevalența infecțiilor cu *L. infantum* în sud-estul României, dar și această zonă trebuie investigată.

În acest studiu este investigată seroprevalența infecțiilor cu *L. infantum* în sud-estul României și analizăm alte studii relevante, deja publicate, pentru a încerca să înțelegem dacă există posibilitatea ca leishmanioza să redevină endemică în sudul României.

Semnalăm că, în sud-estul României, câinii sunt expuși infecțiilor cu *L. infantum*. Viitoare studii epidemiologice vor trebui să folosească și metode mai specifice, cum este tehnica ‘Real Time PCR’. Este foarte important ca în viitor să se continue monitorizarea infecțiilor cu *L. infantum* la om, câine, dar și la alte carnivore sălbatice. De asemenea sunt importante și studiile ce tratează răspândirea flebotomilor ce pot transmite *L. infantum* dar și testarea acestora prin metode moleculare, pentru a înțelege dacă sunt infectați cu acest parazit. Aceste studii sunt utile pentru a înțelege care sunt zonele cu risc pentru infecții cu *L. infantum*.

6.4 Concluzii parțiale

Leishmanioza canină este una dintre cele mai importante parazitoze ce afectează câinii din regiunea mediteraneană, dar are și impact asupra sănătății umane. Mai multe studii recente arată că distribuția acestei infecții este în schimbare datorită încălzirii globale. Din cauza acestor schimbări, există posibilitatea ca leishmanioza să redevină endemică în România. În acest studiu raportăm seroprevalența și epidemiologia infecțiilor cu *L. infantum* la câini comunitari din două județe din sud-estul României.

CAPITOLUL VII DISTRIBUȚIA ȘI PREVALENȚA BABESIOZEI ȘI HEPATOZOONOZEI CANINE ÎN SUDUL ROMÂNIEI

CHAPTER VII THE DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF BABESIOSIS AND HEPATOZONOSIS IN DOGS FROM THE SOUTH OF ROMANIA

7.1 Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor

Paraziții din genul *Babesia* și *Hepatozoon* sunt protozoare ce fac parte din încrengătura *Apicomplexa*. Acești paraziți sunt transmiși de căpușe, pot să infecteze un număr mare de specii de vertebrate și reprezintă un interes pentru medicii veterinari datorită bolilor provocate animalelor domestice, mai ales câinilor.

Reproducerea sexuată a paraziților din genul *Babesia* spp și *Hepatozoon canis* are loc în căpușă, iar reproducerea asexuată are loc în gazda vertebrată. Babesioza este transmisă prin mușcătura căpușelor din familia *Ixodidae* și se localizează la nivelul eritrocitelor. Manifestările clinice pot fi importante și pot să difere în funcție de specia de *Babesia*, însă anemia hemolitică, febra și icterul sunt simptomele cele mai întâlnite (Greene 2012b).

Hepatozoon canis este transmis prin ingestia căpușei *Rhipicephalus sanguineus* de către gazda vertebrată, iar infecția este localizată la nivelul leucocitelor. De cele mai multe ori, infecțiile cu *Hepatozoon canis* sunt asociate cu o simptomatologie ușoară și o parazitemie scăzută, dar în cazurile în care se prezintă o parazitemie crescută, simptomele cele mai întâlnite sunt: anemie, febră, letargie și pierderea inexplicabilă a greutateii (Greene 2012a; Margalit Levi et al. 2018).

La fel ca celelalte boli transmise de vectori, babesioza și hepatozoonoza sunt boli atent studiate de cercetătorii din domeniul medical-veterinar datorită schimbărilor în distribuție și prevalență atribuite schimbărilor demografice, climatice dar și datorită intensificării transportului de bunuri, persoane și animale (Alho et al. 2017; Khasnis și Nettleman 2005; Otranto et al. 2009).

În Europa, a fost demonstrat că multe boli transmise de vectori se extind din zone în care sunt endemice de mult timp, în sudul Europei, spre nord și nord-

estul Europei (Morchón et al. 2012; Øines, Storli, și Brun-Hansen 2010; Stensvold et al. 2015; Tiškina și Jokelainen 2017).

Hepatozoon canis a fost identificat în probe colectate de la câini, vulpi și șacali din România. Nu există multe studii pe epidemiologia speciei *Hepatozoon canis* și, din această cauză, prevalența și distribuția acestui parazit în România nu sunt cunoscute (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Waldenström, et al. 2017; Hamel et al. 2012).

În România, a fost observată o creștere în frecvență a cazurilor de Babesioză, iar specii ca *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* și *Babesia gibsoni* au fost identificate în probe colectate de la câini, prin metode moleculare (Hamel et al. 2012; Imre, Farkas, M. S. Ilie, et al. 2013; Ionita et al. 2012). Deși există studii epidemiologice în unele zone din sudul României, încă nu avem suficiente date pentru a avea o imagine clară a zonelor de risc din România (Hamel et al. 2012; Imre, Farkas, M. Ilie, et al. 2013; Imre, Farkas, M. S. Ilie, et al. 2013).

Chiar dacă babesioza canină este raportată frecvent de către clinicienii din România, există puține studii epidemiologice bazate pe biologie moleculară, ce tratează situația infecțiilor canine cu *Babesia* spp..

În 2012 Hamel et al. a publicat un studiu bazat pe biologie moleculară și serologie unde este confirmată prezența infecțiilor canine cu *B. canis*, *B. vogeli* și *B. gibsoni*. Dezavantajul acestui studiu constă în faptul că nu se cunoaște originea exactă a câinilor, fiind câini importați din România în Germania, și nu a fost calculată prevalența infecțiilor cu *Babesia* în diversele regiuni ale țării (Hamel et al. 2012).

În anul 2013 Imre et al. a publicat rezultatele unui studiu seroepidemiologic a infecțiilor canine cu *B. canis* în vestul României. Acest studiu raportează o seroprevalență de 19.8% a infecțiilor cu *B. canis*. Seroprevalența ne indică expunerea câinilor din regiunea studiată și poate să nu corespundă cu prevalența obținută în urma unui studiu epidemiologic ce folosește metode de biologie moleculară (Imre, Farkas, M. Ilie, et al. 2013).

Un alt studiu publicat tot de Imre et al. în 2013, în vestul țării prezintă prevalența infecțiilor cu *Babesia* la câini ce prezentau deja simptome specifice acestei infecții. Acest ultim studiu a raportat o prevalență de 71.4% pentru *B. canis* și 28.6% pentru *B. gibsoni* și a fost făcut folosind metoda PCR clasică. Având în vedere că au fost testați doar câini ce prezentau simptomatologie specifică infecțiilor cu *Babesia* spp, aceste prevalențe nu pot fi extrapolate la populația totală de câini din regiunea studiată (Imre, Farkas, M. S. Ilie, et al. 2013).

Un studiu publicat în 2017, în sudul României (județul Ilfov) de către Andersson et al. a studiat prevalența infecțiilor cu *Babesia* la câini ce manifestau simptome specifice acestor infecții. Acest studiu raportează o prevalență de 29.16% a infecțiilor cu *B. canis* și 1.04% a infecțiilor cu *B. gibsoni*. Pentru că au fost selectați câini cu simptomatologie specifică și în acest caz prevalențele raportate în acest studiu nu pot fi considerate reprezentative pentru toți câinii din regiunea studiată (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Waldenström, et al. 2017).

Studiile menționate mai sus au o valoare științifică ce nu poate fi negată dar nu sunt suficiente pentru a oferi o imagine de ansamblu a răspândirii și prevalenței infecțiilor cu *Babesia* spp. la câini în diversele regiuni ale țării.

Având în vedere importanța acestor boli pentru medicina veterinară în România și lipsa datelor epidemiologice despre aceste boli, scopul acestui studiu este să completeze cunoștințele despre distribuția și prevalența babesiozei și hepatozoonozei în sudul țării.

7.2 Material și metodă

7.2.1 Colectarea probelor

Probe de sânge venos au fost recoltate de la 300 de câini din 5 adăposturi municipale, din sudul României. Probele au fost recoltate în vacutainere cu anticoagulant EDTA, între 10 și 20 iulie 2017. Probele au fost recoltate din adăposturi de la marginea orașelor Drobeta-Turnu Severin (44°37'53.9"N 22°37'55.2"E), Craiova (44°20'32.4"N 23°43'02.6"E), Roșiorii de Vede (44°07'04.8"N 24°59'58.5"E), Alexandria (43°57'14.5"N 25°20'43.6"E) și Slobozia (44°34'18.1"N 27°20'51.4"E). Câinii au fost capturați pe teritoriul municipiului sau în localități din apropierea municipiului, într-o perioadă de două săptămâni înaintea recoltării probelor.

Problele au fost stocate la -20°C până la prelucrarea lor.

Locația și coordonatele punctelor de recoltare sunt descrise în figura 5.1, din capitolul V.

7.2.2 Extracția de ADN

Probele de sânge au fost transportate în Israel, la Școala de Medicină Veterinară "Koret", din Rehovot. Extracția de ADN a fost făcută cu kitul Ilustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, din Buckinghamshire UK, urmând instrucțiunile producătorului.

7.2.3 Screening molecular

Probele infectate cu *Babesia* spp sau *Hepatozon* spp au fost identificate folosind trei metode moleculare diferite.

Un screening inițial a fost făcut prin metoda polymerase chain reaction (PCR) clasică, folosind amorsele Piroplasmid-F (CCAGCAGCCGCGGTAATTC) și Piroplasmid-R (CTTTCGCAGTAGTTYGTCTTTAACAAATCT), pentru amplificarea unei porțiuni de 350-400 bp a genei 18s rARN a piroplasmidelor. Pentru a identifica probele cu coinfectie, toate probele pozitive au fost testate folosind amorsele specifice pentru *Babesia* și *Hepatozon*. Amorsele PIROA (AATACCCAATCCTGACACAGGG) și PIROB (TTAAATACGAATGCCCCCAAC) (Olmeda et al. 1997) au fost folosite pentru identificarea probelor infectate cu *Babesia*, iar amorsele Hepatozon 18S-F (GGTAATTCTAGAGCTAATACATGAGC) și Hepatozon 18S-R (ACAATAAAGTAAAAACAYTTCAAAG) (Almeida et al. 2012) au fost folosite pentru identificarea probelor infectate cu *Hepatozon*.

Volumul reacțiilor PCR a fost de 25ul, folosind kitul “PCR-ready High Specificity mix (Syntezza Bioscience, Jerusalem, Israel)” și 400 nM amorse și apă DNase/RNase-free (Sigma, St. Louis, MO, USA). Amplificarea a fost făcută folosind un termociclator programabil, produs de Biometra, Göttingen, Germania.

Pasul inițial de denaturare a fost la o temperatură de 95 °C, a durat 5 min și a fost urmat de 35 de cicluri de denaturare la 95 °C, timp de 30 de secunde. Pașii de adiție a amorselor și de extensie au loc la 64°C și durează 30 secunde pentru perechea de amorse Piroplasmid-F/Piroplasmid-R, 58°C, timp de 30 secunde pentru perechea de amorse PIROA/PIROB și 50°C timp de 30 secunde pentru perechea de amorse Hepatozon18S-F/ Hepatozon18S-R. Pasul de extensie final a avut loc la o temperatură de 72 °C, timp de 30 de secunde. După ultimul ciclu, pasul de extensie a fost continuat timp de 5 minute.

AND-ul extras de la un câine infectat cu *B. vogeli* și de la un câine infectat cu *H. canis* a fost folosit ca și control pozitiv. Au fost folosite două tipuri de controale negative: primul a fost apa ultrapură folosită în reacția PCR și a doua a fost AND-ul extras din sângele unui câine crescut în laborator (piroplasmid-free). Electroforeza ampliconilor a fost făcută pe un gel de agaroză de 1.5%, cu bromură de etil. Gelul a fost inspectat la un cititor cu lampă UV, iar ampliconii au fost comparați cu un marker molecular cu o lungime de 100 baze azotate.

7.2.4 Secvențierea și analiza filogenetică

Ampliconii au fost purificați folosind kitul EXO-Sap, produs de New England Biolabs Inc, USA, și secvențierea a fost făcută de către HyLaboratories Ltd., folosind kitul Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing și secvențiatorul ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, produs de Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Secvențele ADN au fost analizate cu programul MEGA X și comparate cu secvențe prezente în baza de date GenBank®, folosind motorul de căutare BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Specia a fost stabilită când secvența ampliconului are o identitate de 97 % sau mai mare cu cea mai asemănătoare secvență din baza de date GenBank® (Allen et al. 2008; Baneth et al. 2013; Karagenc et al. 2006).

Analiza filogenetică a fost făcută folosind metoda maximum likelihood, modelul Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa, Kishino, și Yano 1985) și folosind programul MEGA X (Kumar et al. 2018).

7.2.5 Analiză statistică

Analizele statistice au fost făcute folosind programul Epi Info™ 7.2 software, al organizației Center for Disease Control (CDC), din Atlanta, SUA.

Diferențele dintre prevalența babesiozei și hepatozoonozei în diferitele regiuni, a fost stabilită folosind metoda Pearson Chi-square și programul SPSS Statistics 20.0 al companiei IBM, SUA.

7.3 Rezultate

7.3.1 Diagnostic molecular și analiză statistică

Din 300 de probe, 48.84% (n=163) au fost pozitive pentru analiza PCR folosind amorsele pentru piroplasmide. După cum se poate vedea din figura 7.1, această tehnică a permis identificarea câinilor infectați cu *Babesia* spp, *H. canis* dar și a celor coinfectați cu acești paraziți. Prevalența piroplasmidelor în fiecare punct de colectare a probelor poate fi văzută în tabelul 7.1.

După cum se poate observa din tabelele 7.2 și 7.3, prevalența totală a infecțiilor cu *H. canis* este de 47.67% (n=142, 95%CI 41.57-53.15%) iar pentru *Babesia* spp este 9.67% (n=29, 95%CI 6.57%-13.59%). Prevalența totală a infecțiilor cu *H. canis* este semnificativ mai mare decât prevalența infecțiilor cu *Babesia* spp. (p<0.000).

Prevalența infecțiilor cu *H. canis* în Drobeta-Turnu Severin a fost semnificativ mai mare ca cea din restul orașelor (p<0.05; Tabelul 7.2), cu excepția prevalenței raportate în Slobozia.

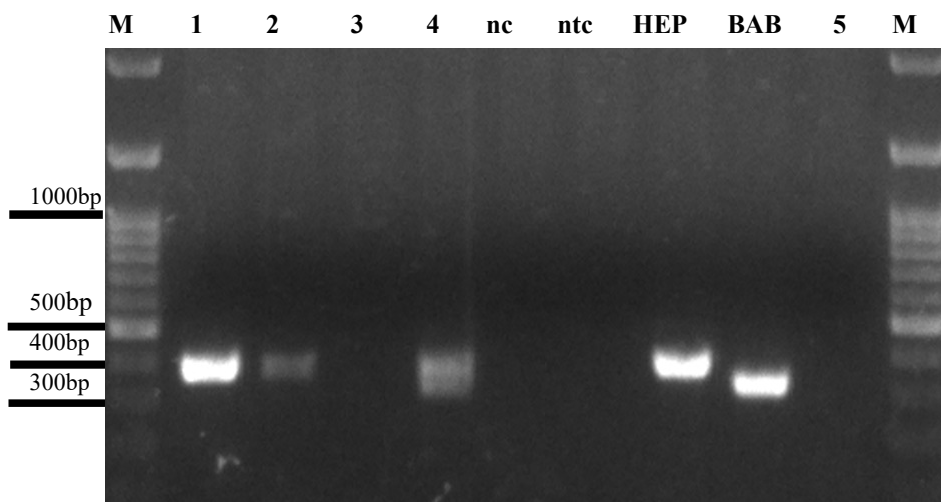


Figura 7.1: Ampliconii PCR a 5 din cele 300 de probe analizate folosind amorsele PIROA și PIROB. La pozițiile “M” marcatori moleculari, “nc” și “ntc” sunt controalele negative, “HEP” (~400bp) și “BAB” (~350bp) sunt controalele pozitive pentru *Hepatozoon* spp. și *Babesia* spp.. Probele 1 și 2 sunt pozitive pentru *Hepatozoon* spp., probele 3 și 5 sunt negative iar proba 4 este coinfectată cu *Hepatozoon* spp. și *Babesia* spp.

Figure 7.1: PCR products of 5 out of 300 de samples analysed using the PIROA and PIROB primers. “M” are the molecular markers, “nc” and “ntc” are the negative control and the negative template control, “HEP” (~400bp) și “BAB” (~350bp) are the positive controls for *Hepatozoon* spp. and *Babesia* spp.. Samples 1 and 2 are positive for *Hepatozoon* spp., samples 3 and 5 are negative and sample 4 is coinfectated with *Hepatozoon* spp. and *Babesia* spp.

Prevalența infecțiilor cu *Babesia* spp. în orașele cele mai estice, Alexandria și Slobozia, a fost semnificativ mai mare ca prevalența raportată în orașul cel mai vestic, Drobeta-Turnu Severin ($p < 0.05$), (Tabel 7.3).

În orașele cele mai estice, Alexandria și Slobozia, au fost raportate 90.5% din infecțiile cu *B. canis*, iar 87.5% din infecțiile cu *B. vogeli* provin din orașele cele mai vestice, Drobeta-Turnu Severin și Craiova (Tabel 7.3)

Tabel 7.1: Rezultatul reacției PCR pentru piroplasmide pe orașe și județe
Table 7.1: Positive samples for the piroplasmid PCR, per county and town

Județ	Oraș	Piroplasmid [PCR+]		
		poz/tot	%	95% CI
Mehedinți	Drobeta-Turnu Severin	47/64	73.44%	60.91-83.70
Dolj	Craiova	54/100	54%	43.74-64.02
Teleorman	Roșiorii de Vede	16/50	32%	19.52-46.70
	Alexandria	20/41	48.78%	32.88-64.87
Ialomița	Slobozia	26/45	57.78%	42.15-72.34
Total		163/300	54.33%	48.51-60.07

Prescurtări: poz: pozitiv, tot: total

Tabel 7.2: Prevalența infecțiilor cu *H. canis* pe oraș și pe județ. Diferența statistică între prevalențele din orașele de unde au fost recoltate probe

Table 7.2: The prevalence of *H. canis* per county and city. The statistical difference between the prevalence in the sampling locations

County	City	<i>Hepatozoon canis</i>							
		pos/tot	%	95% CI	Statistical significance*				poz/tot
					CR	RV	AL	SL	
Mehedinți	Drobeta-Turnu Severin	46/64	71.88%	59.24-82.40	p<0.05	p<0.001	p<0.001	p=0.078	2/64
	Dolj	Craiova	49/100	49%	38.86-59.20		p=0.457	p=0.139	p=1.000
Teleorman		Roșiorii de Vede	16/50	32%	19.52-46.70			p=1.000	p=1.000
		Alexandria	11/41	26.83%	14.22-42.94			p=0.557	11/41
Ialomița	Slobozia	21/45	46.67%	31.66-62.13					9/45
Total		143/300	47.67%	41.90-53.48					29/300

Prescurtări: poz pozitiv, tot total, CR Craiova, RV Roșiorii de Vede, AL Alexandria, SL Slobozia

Tabel 7.3: Prevalența infecțiilor cu *Babesia* spp. pe oraș și pe județ și coinfecțiile cu *H. canis* și *Babesia* spp. Diferența statistică între prevalențele din orașele de unde au fost recoltate probe

Table 7.3: The prevalence of *Babesia* spp. per county and city and the coinfections with *H. canis* and *Babesia* spp. The statistical difference between the prevalence in the sampling locations

Județ	Oraș	<i>Babesia</i> spp.				coinfections						
		pos/tot	%	95% CI	Statical significance*	<i>B. canis</i>	<i>B. vogeli</i>	<i>H. canis</i>	<i>B. vogeli</i>			
					CR	RV	AL	SL				
Mehedinți	TS	2/64	3.13%	0.38-10.84	p=1.000	p=1.000	p<0.005	p<0.05	0	2	0	1
Dolj	CR	7/100	7%	2.86-13.89	p=0.156	p<0.05	p=0.263		2	5	0	2
	RV	0/50	0%	-	p<0.001	p<0.001			0	0	0	0
Teleorman	AL	11/41	26.83%	14.22-42.94			p=1.000		10	1	2	0
Ialomița	SL	9/45	20%	9.58-34.60					9	0	4	0
Total		29/300	9.66%	6.57-13.59					21	8	6	3

Prescurtări: poz pozitiv, tot total, TS Drobeta Turnu-Severin, CR Craiova, RV Roșiorii de Vede, AL Alexandria, SL Slobozi

7.3.2 Studiu filogenetic

Secvențele nucleotidice obținute în urma reacției PCR specifice pentru identificarea infecțiilor cu *Hepatozoon canis* sunt 98% - 100% identice între ele și sunt 97% - 100% identice cu secvențe găsite în baza de date GeneBank.

Arborele filogenetic prin metoda maximum likelihood a fost construit folosind ampliconii de o lungime de 502 baze azotate, a genei 18S rDNA. Nu au fost observate diferențe semnificative între majoritatea secvențelor de *H. canis*, cu excepția a patru segmente din Craiova și Slobozia. După cum se poate observa și din figura 7.3, secvențele de *H. canis* sunt identice cu secvențe raportate în Ungaria, Serbia, Slovacia, Republica Cehă și Croația, dar și în alte studii din România.

Secvențele nucleotidice obținute în urma reacției PCR specifice pentru identificarea infecțiilor cu *B. canis* sunt 98% - 100% identice între ele și sunt 99% - 100% identice cu secvențe găsite în baza de date GeneBank. Din figura 7.2, se poate observa că secvențele au fost similare cu secvențe raportate în Ungaria, Serbia și Republica Cehă.

Secvențele nucleotidice obținute în urma reacției PCR specifice pentru identificarea infecțiilor cu *B. vogeli* sunt 100% identice între ele și sunt 97% - 100% identice cu secvențe găsite în baza de date GeneBank.

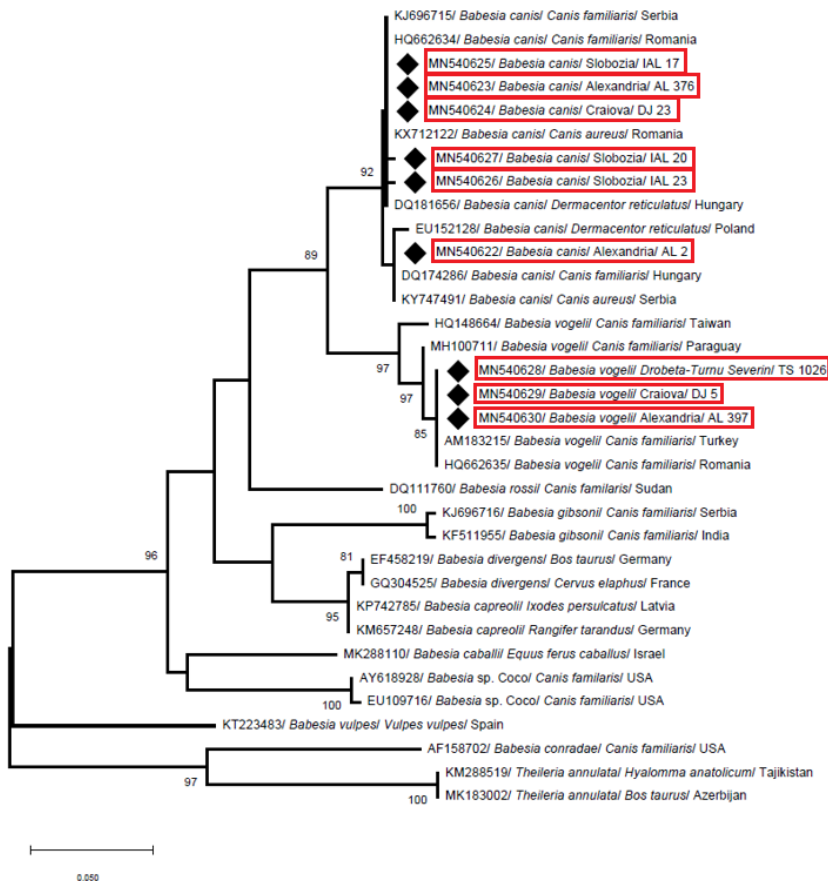


Figura 7.2: Studiul filogenetic se bazează pe ampliconul reacției PCR specifică pentru *Babesia spp.*, de o dimensiune de 378 baze azotate și a fost făcut prin metoda „Maximum Likelihood” și bazat pe modelul Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al. 1985). Pentru studiul filogenetic a fost folosit programul MEGA X (Kumar et al. 2018). Secvențele înconjurate cu roșu aparțin studiului nostru

Figure 7.2: Phylogenetic tree of *Babesia* spp. based on a 378bp-long sequence of the 18S rRNA gene. The animal species from which sequences are derived and geographic locations are marked for each entry. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Hasegawa-Kishino-Yano model (Hasegawa et al. 1985). Sequences obtained in this study are marked with a diamond. Only bootstrap values above 80% are shown

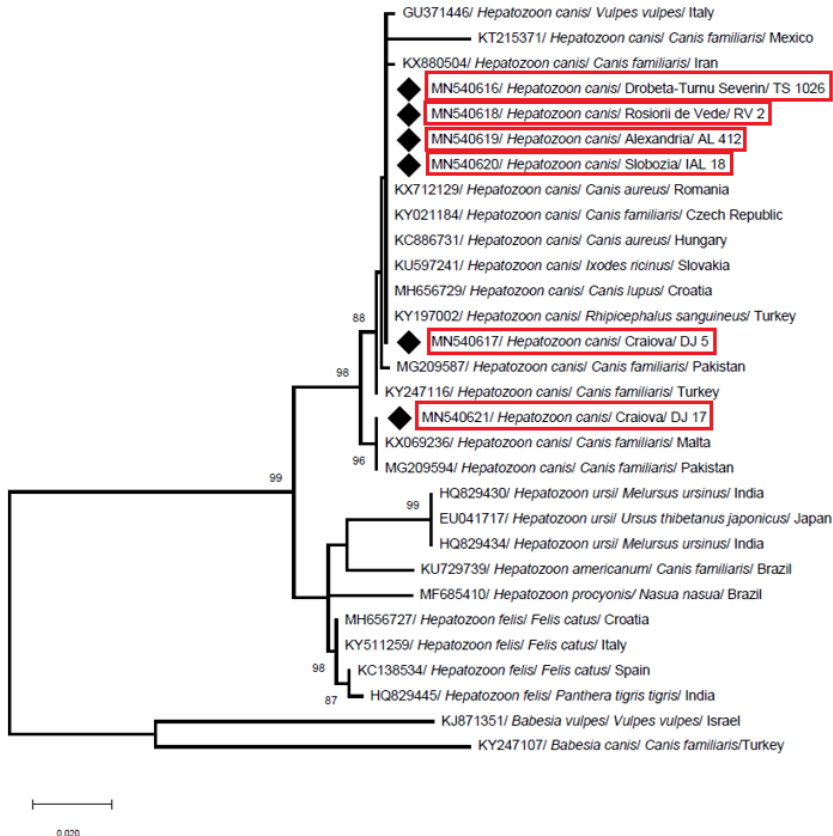


Figura 7.3: Studiul filogenetic se bazează pe ampliconul reacției PCR specifică pentru *Hepatozoon canis*, de o dimensiune de 505 baze azotate și a fost făcut prin metoda „Maximum Likelihood” și bazat pe modelul Tamura 3-parameter (Tamura 1992). Pentru studiul filogenetic a fost folosit programul MEGA X (Kumar et al. 2018). Secvențele înconjurate cu roșu aparțin studiului nostru

Figure 7.3: Phylogenetic tree of *Hepatozoon canis* based on a 505bp-long sequence of the 18S rRNA gene. The animal species from which sequences are derived and geographic locations are marked for each entry. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Tamura 3-parameter model (Tamura 1992). Sequences obtained in this study are marked with diamond. Only bootstrap values above 80% are shown

7.4 Discuții

Raportăm, pentru prima oară, un studiu epidemiologic al hepatozoonozei și al habesiozei canine, în sudul României, ce folosește metode moleculare și are scopul de a stabili prevalența acestor boli în mai multe județe (Cimpan et al. 2020).

Raportăm o prevalență de 48.84% a câinilor infectați cu *H. canis* sau *Babesia* spp., dar doar 3% prezintă coinfecție.

Prevalența totală a infecțiilor cu *Babesia* spp. (9.6%) este considerabil mai mică decât cea de 30%, prezentată în 2017, în Ilfov (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Waldenström, et al. 2017). Prevalențele în punctele de recoltare mai apropiate de județul Ilfov, Alexandria și Slobozia, sunt de 20% respectiv 27%, valori asemănătoare cu cele ce au fost raportate în Ilfov (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Waldenström, et al. 2017).

Prevalența raportată a babesiozei canine în țările limitrofe variază considerabil de la 2.1% în Turcia (Guo et al. 2017), la 21.5% în Serbia (Gabrielli et al. 2015) și 50% *B. canis* în Ungaria (Hamel et al. 2012).

Distribuția celor două specii de *Babesia* identificate depinde de locația punctelor de colectare. 90.47% din infecțiile cu *B. canis* provin din punctele de colectare cele mai estice, Alexandria și Slobozia, dar 87.5% din infecțiile cu *B. vogeli* provin din punctele de colectare cele mai vestice, Drobeta-Turnu Severin și Craiova.

Raportăm o prevalență mai mare a infecțiilor cu *H. canis* (47%) față de cea de 15% raportată în trecut în județul Ilfov (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Waldenström, et al. 2017) și față de cea raportată în țări învecinate ca Turcia (22.3%) (Aktas et al. 2015), Ungaria (26%) (Hornok et al. 2013) și Croația (11.8%) (Vojta et al. 2009), dar asemănătoare cu prevalența de 50.6%, raportată în Italia (Otranto et al. 2011).

Prevalența infecțiilor cu *H. canis*, *Babesia canis* și *B. vogeli* în sudul României depinde de locație. Raportăm o prevalență mai mare a infecțiilor cu *H. canis* în punctul de colectare cel mai vestic, Drobeta-Turnu Severin (Tabel. 2), și o prevalență mai mare a infecțiilor cu *Babesia* spp. în punctele de colectare cele mai estice, Slobozia și Alexandria (Tabel 3). Trebuie studiați factorii responsabili pentru această diferență de prevalență între infecțiile cu *H. canis* și *Babesia* spp.

Deși infecțiile cu *H. canis* au o prevalență mare, acest parazit nu este studiat sau monitorizat îndeajuns în România, cel mai probabil pentru că de cele mai multe ori se manifestă subclinic sau prezintă o simptomatologie ușoară.

Nu raportăm cazuri de infecții cu *B. gibsoni* în acest studiu, dar în studii mai vechi a fost raportată o prevalență de 3%, fără a se specifica o anumită zonă a țării (Hamel et al. 2012), și o prevalență de 28.6% la câini ce prezentau o simptomatologie specifică și proveneau din vestul țării (Imre, Farkas, M. S. Ilie, et al. 2013).

Studiul filogenetic a arătat că nu există diferențe semnificative între secvențele noastre și secvențe din baza de date GenBank, ce provin din țări apropiate geografic cum ar fi Ungaria, Serbia, Turcia, Republica Cehă sau Slovacia.

Un studiu epidemiologic al căpușelor din sudul României raportează o prevalență de 35.3% a căpușelor *Hyalomma marginatum*, 13% *Ripicephalus sanguineus* și 12.5% *Dermacentor marginatus* (Ionita et al. 2013). Cel mai mare număr de căpușe a fost găsit în județele Ialomița și Vrancea (Ionita et al. 2013).

Un alt studiu epidemiologic al căpușelor din toate regiunile țării a raportat o prevalență de 36.9% a lui *R. sanguineus* în județe din sudul țării și într-un județ din vestul țării (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Radbea, et al. 2017). Prevalențele căpușelor *D. reticulatus* și *D. marginatus* au fost 13.9% și, respectiv, de 10.8% și au fost raportate în sudul, nordul și vestul țării (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Radbea, et al. 2017). În acest studiu, prevalența căpușei *H. marginatum* a fost doar 3%, iar căpușele au fost recoltate doar din județele Mehedinți și Dolj (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Radbea, et al. 2017). Prevalența căpușei *I. ricinus* a fost 27.7%. Acestea au fost găsite în nordul, vestul, sudul și centrul țării, iar foarte multe căpușe au fost găsite în județul Dolj. Ca și în studiul nostru, parazitul cel mai frecvent întâlnit a fost *H. canis*, prezent în căpușele recoltate din sudul, centrul și vestul țării (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Radbea, et al. 2017).

Majoritatea căpușelor infectate cu *H. canis* au fost *I. ricinus* și au fost recoltate în județul Mehedinți (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Radbea, et al. 2017). Aceste rezultate coincid cu rezultatele din studiul nostru, Mehedinți a fost județul cu cea mai mare prevalență de infecții cu *H. canis* la câini (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Radbea, et al. 2017). Căpușe infectate cu *B. canis* au fost găsite în nordul, vestul și sudul țării (Andersson, Tolf, Tamba, Stefanache, Radbea, et al. 2017).

Prevalența infecțiilor cu *H. canis* și *Babesia* spp. în sudul României reprezintă informații de interes pentru veterinari, pentru a stabili un diagnostic corect. În ultimii ani, au fost deschise primele bănci de sânge pentru câini din România, iar personalul acestor bănci ar trebui să țină cont de prevalența infecțiilor cu *Babesia* spp., înainte alegerii unui donator.

Canidele, cum sunt șacalii, vulpile și lupii, pot fi infectate cu boli vectoriale specifice câinilor și pot să reprezinte o sursă de infecție pentru animalele de companie, dar și pentru oameni, în cazul bolilor zoonotice, precum encefalita de căpușă (TBEV), leishmanioza, sau dirofilarioza. Prevalența infecțiilor cu *H. canis* la vulpi din vestul țării a fost raportată ca fiind 12.6% (Imre et al. 2015), iar un studiu al bolilor vectoriale ale șacalilor a raportat o prevalență de 70% pentru *H. canis*, 8.9 % *B. canis* și 3.57% *Babesia vulpes* (Mitsková et al. 2017).

7.5 Concluzii parțiale

Babesioza canină reprezintă una dintre cele mai importante boli parazitare cu care se confruntă veterinarii în România. Chiar dacă *B. canis*, *B. vogeli* și *B. gibsoni* au fost raportate în trecut, în România, încă nu există suficiente informații despre prevalența infecțiilor cu *Babesia* spp., în diferitele regiuni ale țării.

Semnălăm o prevalență mult mai mare a infecțiilor cu *H. canis*, în comparație cu *Babesia* spp., dar încă nu există date suficiente despre prevalența acestei infecții în România. Hepatozoonoza rămâne o boală neglijată de mulți medici veterinari și de multe ori diagnosticată și tratată ca babesioză. Sperăm ca acest studiu să completeze o parte din lipsa de informații, legate de epidemiologia acestor două boli vectoriale ale câinelui.

Considerăm că sunt necesare mai multe studii pentru a înțelege distribuția și prevalența bolilor vectoriale ce afectează animalele de companie, animalele sălbatice, dar și omul. Sunt foarte importante și studiile ce ne ajută să înțelegem care sunt factorii ce influențează distribuția acestor boli.

Studiile raportate în acest capitol îndeplinesc două obiective importante legate de epidemiologia babesiozei și hepatozoonozei în sudul României.

Infecțiile canine cu *Babesia* spp. au fost raportate în trecut în România dar a fost nevoie reală de un studiu exhaustiv bazat pe biologie moleculară care să prezinte prevalența și distribuția babesiozei canine într-o regiune extinsă din sudul României.

Infecțiile canine cu *H. canis* au fost puțin studiate în România. La momentul scrierii acestei lucrări exista doar un alt studiu epidemiologic pe această temă, într-un singur județ din România. Acest studiu a răspuns acestei nevoi și prezintă situația epidemiologică a hepatozoonozei canine în sudul României.

Adițional, în acest studiu analizăm diferențele de prevalență dintre infecții dar și dintre diferitele regiuni ale zonei studiate. Secvențele bazelor azotate din acest studiu au fost folosite pentru efectuarea unui studiu filogenetic investighează eventuale diversități genetice între *H. canis* și *Babesia* spp. din sudul României și din alte regiuni ale lumii.

CAPITOLUL VIII

EPIDEMIOLOGIA DIROFILARIOZEI LA CÂINI DIN ADĂPOSTURI DIN SUDUL ROMÂNIEI

CHAPTER VIII

EPIDEMIOLOGY OF CANINE DIROFILARIASIS IN SHELTER DOGS FROM THE SOUTH OF ROMANIA

8.1 Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor

Există mai multe specii de filarioze ce pot infecta păsări, reptile și mamifere. Specii ce infectează carnivore sălbatice și domestice, ca *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Onchocerca lupi*, *Cercopithifilaria grassii* și *Thelazia callipaeda*, sunt printre cele mai studiate pentru prevalența lor crescută, potențialul zoonotic și patogenicitatea la câini.

Aceste filarioze sunt transmise de artropode, precum sunt țânțarii sau căpușele ce joacă rolul de gazdă intermediară.

Deși toate filariozele menționate mai sus au fost raportate în România, infecțiile cu *D. repens* și *D. immitis* sunt printre cele mai întâlnite. Deoarece paraziții din genul *Dirofilaria* sunt dioxenici, distribuția și prevalența acestora sunt influențate de factori ambientali. Acești factori au efect asupra populațiilor de câini, ce joacă rol de rezervor, și asupra țânțarilor, ce joacă rol de vector.

Schimbările climatice reprezintă unul dintre cei mai studiați și importanți factori ce afectează distribuția și prevalența dirofilariozelor, deoarece dezvoltarea artropodelor ce joacă rol de vector, dar și a larvelor de dirofilaria ce infectează vectorii, depinde de temperatura externă (Genchi et al. 2009).

Canidele sălbatice și domestice sunt principalul rezervor de infecție cu filariozele din genul *Dirofilaria*, iar țânțarii din familia *Culicidae* sunt vectorii responsabili pentru transmiterea acestor infecții.

Studii recente raportează că distribuția infecțiilor cu *Dirofilaria* spp., în Europa este în schimbare și infecțiile cu aceste filarioze sunt întâlnite din ce în ce mai des la nord și la est de zonele tradițional endemice (Genchi et al. 2005, 2009; Otranto et al. 2009). Această schimbare poate duce la expunerea mai multor oameni și animale la această infecție și, din această cauză, există un interes crescut pentru a înțelege distribuția acestor infecții și factorii ce stau la baza acestei schimbări (Genchi et al. 2009).

A fost demonstrat că în Europa, pe lângă încălzirea globală, există și alte schimbări de habitat ce pot influența prevalența bolilor vectoriale (Medlock și Leach 2015). În foarte multe țări din Europa, declinul demografic, alături de creșterea în amploare a urbanizării au dus la depopularea zonei rurale. Acest fenomen, alături de sporirea eforturilor de conservare a faunei sălbatice au dus la creșterea numărului de animale ce pot să joace rol de rezervor pentru boli vectoriale (Prins și Gordon 2007).

Datorită globalizării, transportul de oameni și animale dintr-o țară în alta a devenit mai ușor și accesibil pentru o mare parte a omenirii. Acest fenomen ia amploare în Europa datorită garantării mișcării oamenilor și mărfurilor în interiorul Uniunii Europene și poate duce la introducerea unor animale infectate, dar și a unor vectori, în țări ce nu sunt endemice (Maia și Cardoso 2015; Reiter 1998). România este o țară în mod deosebit expusă deoarece există comunități importante de români în țări ca Italia sau Spania, unde au fost raportate prevalențe importante la mai multe boli vectoriale. Aceste boli pot fi introduse în România odată cu animalele de companie ale comunității românești din aceste țări.

Introducerea țânțarului *Aedes albopictus* în Europa, odată cu comerțul cu anvelope reprezintă unul dintre cele mai studiate exemple ale introducerii unui nou vector, prin comerțul internațional cu anvelope (Reiter 1998). Țânțarii *Aedes albopictus* sunt vectori ai *D. immitis*, sunt antropofili, foarte agresivi și au avut o răspândire impresionantă în ultimii ani (Otranto et al. 2009).

Infecțiile cu *Dirofilaria spp.* afectează în mod special canidele, dar există și infecții umane. În Europa majoritatea infecțiilor umane cu *Dirofilaria spp.* sunt datorate *D. repens*, iar de cele mai multe ori leziunile parazitare sunt localizate în partea superioară a corpului, cu preponderență la membrele superioare sau la cap, la nivel subcutanat sau subconjunctival (figura 8.1) (Pampiglione et al. 2001; Pampiglione, Rivasi, și Gustinelli 2009). Mai rar, paraziții pot fi localizați la nivelul țesutului muscular, organelor genitale sau mezenterului (Pampiglione et al. 2001).

Infecțiile umane cu *D. immitis* au loc mai rar în Europa, în comparație cu continentul american, dar paraziții se localizează de foarte multe ori la nivelul plămânilor, iar leziunile provocate de aceștia nu pot fi distinse de tumori maligne pulmonare folosind radiografia (Bailey, Sohrabi, și Roberts 1990; Pampiglione et al. 2009).

În România există o populație mare de câini fără stăpân ce nu au beneficiat de tratamente profilactice sau antiparazitare și nu sunt nici catagrafiți corespunzător.

Dirofilarioza canină cauzată de *D. immitis* este frecvent întâlnită în România de către clinicieni din toate regiunile țării, iar din acest motiv există un interes real pentru a cunoaște prevalența infecțiilor cu *Dirofilaria* spp. la câini. Începând cu anul 2007, au fost publicate mai multe studii despre prevalența infecțiilor cu *Dirofilaria* spp. la câine. Majoritatea raportărilor de infecții cu *Dirofilaria* spp. la câine au fost făcute în județe din sudul țării, iar prevalențele cele mai mari pentru infecțiile cu *D. immitis* și *D. repens* au fost raportate în sud-estul țării, în județul Tulcea (Ionică et al. 2014; Mircean et al. 2012).

Răspândirea infecțiilor cu *D. immitis* și *D. repens* pe teritoriul României reprezintă o problemă pentru sănătatea câinilor, ce sunt crescuți ca animale de companie, dar reprezintă o problemă și pentru sănătatea oamenilor deoarece acești paraziți au un potențial zoonotic.

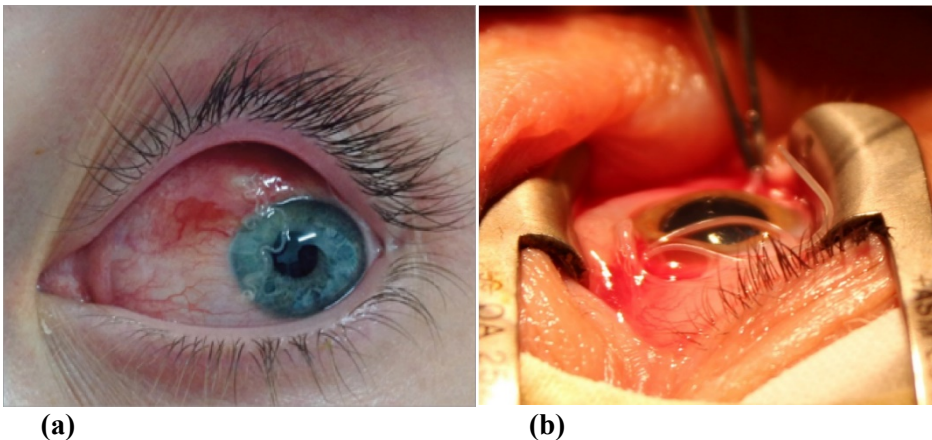


Figura 8.1: (a) Caz de dirofilarioză umană, cauzată de *Dirofilaria repens*, cu localizare subconjunctivală din anul 2013. Pacientul provenea din Galați (sud-estul României), de sex feminin, avea 16 ani și locuia în mediu rural (Arbune și Dobre 2015). (b) Extracția chirurgicală a unei larve de *Dirofilaria repens* de la un pacient de 54 de ani, sex feminin, ce provine dintr-o zonă rurală, din județul Sălaj (nord-vestul României) (Macarie et al. 2017)

Figure 8.1: (a) One case of human dirofilariasis, with subconjunctival localization, from 2013 caused by *Dirofilaria repens*. The patient is female, lived in an rural are, has 16 years, and is from Galați (south-east of Romania) (Arbune și Dobre 2015). (b) The surgical extraction of a *Dirofilaria repens* larvae, from a 54 year, female patient, from a rural area, from Sălaj county (north-west of Romania) (Macarie et al. 2017)

Studiile menționate mai sus indică că infecțiile cu *D. repens* și *D. immitis* în România reprezintă un pericol real pentru sănătatea animalelor dar și că aceste infecții pot avea un impact important și asupra sănătății oamenilor. Din aceste motive este deosebit de important să cunoaștem răspândirea și prevalența acestei infecții.

Având în vedere situația epidemiologică complexă din România și schimbările de prevalență raportate pentru mai multe boli vectoriale din Europa și din lume, obiectivul acestui studiu este de a folosi tehnica RT-PCR pentru a determina eventuale schimbări de prevalență, și distribuție în una dintre cele mai afectate regiuni ale României.

8.2 Material și metodă

8.2.1 Colectarea probelor

Probele de sânge au fost colectate de la 300 de câini din 5 adăposturi municipale din județe din sudul României. Probele au fost recoltate prin puncția venei cefalice în tuburi cu anticoagulant EDTA. Probele au fost recoltate din adăposturi de la marginea orașelor Drobeta-Turnu Severin (44°37'53.9"N 22°37'55.2"E), Craiova (44°20'32.4"N 23°43'02.6"E), Roșiorii de Vede (44°07'04.8"N 24°59'58.5"E), Alexandria (43°57'14.5"N 25°20'43.6"E) și Slobozia (44°34'18.1"N 27°20'51.4"E). Locația și coordonatele punctelor de recoltare sunt descrise în figura 5.1, din capitolul V.

Acești câini au fost capturați de pe teritoriul municipiului dar și din localitățile din apropierea municipiului. Probele de sânge cu EDTA au fost stocate la -20°C până la extracția de acizi nucleici. Recoltarea probelor a avut loc cu consimțământul conducerii adăpostului.

Locația și coordonatele punctelor de recoltare sunt descrise în figura 8.1.

8.2.2 Extracție de ADN

Probele de sânge au fost extrase folosind kit-ul comercial Ilustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, produs de GE Healthcare, din Regatul Unit. Pentru fiecare extracție a fost folosit 300 μl de sânge cu EDTA și au fost urmate instrucțiunile producătorului.

8.2.3 Screening molecular pentru filarii prin Real Time PCR și PCR clasic

Pentru a identifica toți câinii infectați cu filarii a fost folosită metoda Real Time PCR pentru a amplifica o secvență de ADN cu o lungime de 115 baze

azotate ce fac parte din gena 12 S a filariilor. Perechea de amorse F5'-TTTAAACCGAAAAAATATTGACTGAC-3' și R5' -AAAAACTAAACAATCATACATGTGCC-3', folosite pentru această reacție a fost concepută de către Wongkamchai et al. pentru a detecta paraziții *Brugia malayi*, *Brugia pahangi* și *D. immitis* dar au folosiți și pentru a amplifica ADN și de la alte specii de filarii, după cum a demonstrat Rojas et al. (Rojas et al. 2015; Wongkamchai et al. 2013). Toate probele au fost analizate prin Real Time PCR, prin metoda descrisă de Wongkamchai et al., dar și cu modificată de Rojas et al. după cum este descris în tabelul 8.1 (Rojas et al. 2015; Wongkamchai et al. 2013). Reacțiile PCR au fost efectuate pe un termociclator Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Toate probele pozitive la această primă reacție de Real Time PCR au fost analizate printr-o reacție PCR clasică ce este descrisă în tabelul 8.2. Această tehnică de PCR clasic a fost descrisă de Rishniw et al (Rishniw et al. 2006) și folosește amorsele non specifice DIDR-F1 (5'-AGT GCG AAT TGC AGA CGC ATT GAG-3') și DIDR-R1 (5'-AGC GGG TAA TCA CGA CTG AGT TGA-3'). În trecut această tehnică a fost folosită pentru identificarea următoarelor specii de filarii: *Dirofilaria immitis*, *Acanthocheilonema reconditum*, *Dirofilaria repens*, *Amphicharys dracunculoides*, *Brugia phangi*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Mansonella ozzardi* și *Onchocerca volvulus*. După cum poate fi observat din tabelul 8.3, fiecărei specii de filarie îi corespunde un amplicon de o anumită lungime.

Tabel 8.1: Program RT-PCR descris de (Wongkamchai et al. 2013) și modificat de (Rojas et al. 2015)

Table 8.1: RT-PCR cycles as described by (Wongkamchai et al. 2013) and modified by (Rojas et al. 2015)

Temperatură	Durăță	Nr. de cicluri
95°C	4 min	
95°C,	5 s	
58°C	15 s	50
72°C	10 s	

Tabel 8.2: Program PCR clasic descris de (Rishniw et al. 2006) pentru amorsele non specifice DIDR-F1 și DIDR-R1

Table 8.2: PCR cycles as described by (Rishniw et al. 2006), using the non-specific primers DIDR-F1 and DIDR-R1

Temperatură	Durață	Nr. de cicluri
94°C	2 min	
94°C,	30 s	
60°C	30 s	32
72°C	30 s	
72°C	7 m	
4°C	∞	

Tabel 8.3: Lungimea secvenței amplificate pentru fiecare parazit în baze azotate obținute cu tehnica descrisă de (Rishniw et al. 2006) pentru amorsele non specifice DIDR-F1 și DIDR-R1

Table 8.3: The length of each PCR product using the technique described by (Rishniw et al. 2006) and the non-specific primers DIDR-F1 and DIDR-R1

<i>D. immitis</i>	542
<i>A. reconditum</i>	578
<i>D. repens</i>	484
<i>A. dracunculoides</i>	584
<i>B. pahangi</i>	664
<i>B. malayi</i>	615
<i>B. timori</i>	625
<i>M. ozzardi</i>	430
<i>O. volvulus</i>	470

Tabel 8.4: Program PCR clasic descris de (Rishniw et al. 2006) pentru amorsele specifice pentru *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* și *Acanthocheilonema reconditum*

Table 8.4: PCR cycle as described by (Rishniw et al. 2006), using the species specific primers for *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* și *Acanthocheilonema reconditum*

Temperatură	Durață	Nr. de cicluri
94°C	2 min	
94°C,	30 s	
58°C	30 s	32
72°C	30 s	
72°C	7 m	
4°C	∞	

Probele ce prezentau coinfecții au fost evaluate folosind tehnica PCR specifică pentru *D. immitis*, *D. repens* și *A. reconditum*, descrisă în tabelul 8.4 și dezvoltată de către de către Rishniw et al. (Rishniw et al. 2006). Pentru aceste tehnici PCR specifice au fost folosite amorsele DICOI-F1 (5'-AGT GTA GAG GGT CAG CCT GAG TTA-3' și DICOI-R1 (5'-ACA GGC ACT GAC AAT ACC AAT-3') pentru a detecta *D. immitis*, amorsele DRCOI-F1 (5'-AGT GTT GAT GGT CAA CCT GAA TTA-3') și DRCOI-R1 (5'-GCC AAA ACA GGA ACA GAT AAA ACT-3') pentru a detecta *D. repens* și amorsele ARCOI-F1 (5'-AGT GTT GAG GGA CAG CCA GAA TTG-3') și ARCOI-R1 (5'-CCA AAA CTG GAA CAG ACA AAA CAA GC-3') pentru a detecta *A. reconditum* (Rishniw et al. 2006).

8.3.4 Secvențiere

Ampliconii rezultați în urma reacțiilor PCR clasice au fost purificați folosind un kit de purificare EXO-Sap (New England Biolabs Inc, USA) și urmând instrucțiunile producătorului.

Secvențierea a fost făcută de către compania HyLaboratories Ltd. (Rehovot, Israel) folosind kitul Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing și secvențiatorul, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, produs de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Secvențele ADN au fost analizate cu programul MEGA X și comparate cu secvențe prezente în baza de date GenBank®, folosind motorul de căutare BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). După cum se poate observa din figura 8.2, o secvență nucleotidică parțială a *D. repens* a fost analizată și apoi comparată cu alte secvențe din baza de date.

Specia a fost stabilită când secvența ampliconului are o identitate de 97 % sau mai mare cu cea mai asemănătoare secvență din baza de date GenBank® (Allen et al. 2008; Baneth et al. 2013; Karagenc et al. 2006).

8.2.5 Analiză statistică

Prevalențele și intervalul de încredere 95% au fost calculate folosind programul Epi Info™ 7.2 software, al organizației Center for Disease Control (CDC), din Atlanta, SUA.

Diferențele de prevalență dintre speciilor de filarii și diferențele de prevalență între diferite regiuni au fost analizate folosind metoda Pearson Chi-square și programul SPSS Statistics 20.0 al companiei IBM, SUA.

8.3 Rezultate

8.3.1 Diagnostic molecular și analiză statistică

Din cele 300 de probe analizate folosind tehnicile Real Time qPCR, PCR clasic și secvențiere, 17.33% (n=52) au fost pozitive pentru *Dirofilaria* spp. și *A. reconditum*.

Prevalența infecțiilor cu *D. repens* este de 11.66% (n=36, 95% CI 8.55% - 16.22%), pentru *D. immitis* este de 4.66% (n=14, 95% CI 2.57% - 7.71%) iar pentru *A. reconditum* este 1.33% (n=4 95% CI 0.36%-3.38%). Prevalența totală a infecțiilor cu *D. repens* este semnificativ mai mare ca prevalența infecțiilor cu *D. immitis* și *A. reconditum* ($p \leq 0.003$), iar prevalența infecțiilor cu *D. immitis* este semnificativ mai mare ca cea cu *A. reconditum* ($p=0.042$).

Prevalența infecțiilor cu *Dirofilaria* spp. și *A. reconditum* în fiecare punct de colectare a probelor, dar și intervalul de încredere cu nivelul de încredere de 95% pot fi văzute în tabelul 8.5. În tabelul 8.5 pot fi observate și rezultatele testului Chi-square, ce au rolul de a determina dacă diferențele de prevalență a infecțiilor între orașele din studiu sunt semnificative din punct de vedere statistic. Nu au fost observate diferențe de prevalență între orașe sau regiuni pentru infecțiile cu *D. repens* și *A. reconditum*. Pentru infecțiile cu *D. immitis*, singura diferență de prevalență a fost observată între orașele Craiova și Roșiorii de Vede ($p=0.042$).

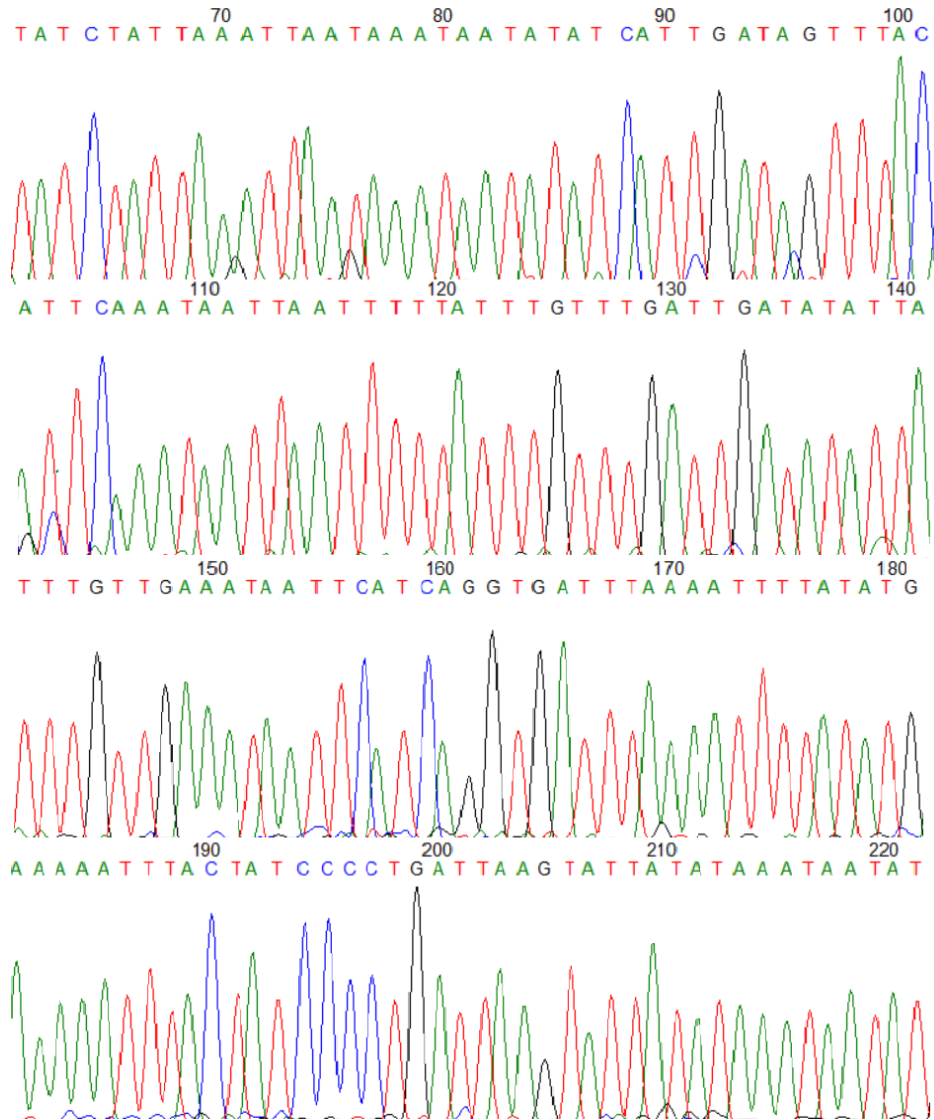


Figura 8.2: Parte a secvenței *Dirofilaria repens* obținute în urma analizei PCR folosind amorsele non specifice DIDR-F1 și DIDR-R1 și programul PCR clasic descris de (Rishniw et al. 2006). Proba provine de la un câine din comunitar din Drobeta Turnu-Severin

Table 8.2: Part of a nucleotide sequence of *Dirofilaria repens* obtained using the PCR technique as described by (Rishniw et al. 2006), and using the non-specific primers DIDR-F1 and DIDR-R1. This sample was obtained from a stray dog from the town Drobeta Turnu-Severin

Prevalența infecțiilor cu *D. repens* 12% (36/300) a fost semnificativ mai mare ca prevalența infecțiilor cu *D. immitis* 4.67% (14/300) și *A. reconditum* 1.33% (4/300) ($p \leq 0.003$), iar prevalența infecțiilor cu *D. immitis* a fost semnificativ mai mică ca prevalența infecțiilor cu *A. reconditum* ($p \leq 0.042$) (Tabelul 8.5).

Au fost observate doar 3 coinfecții cu *D. repens* și *D. immitis*.

8.3.2 Studiu filogenetic

În figura 8.3 este prezentat arborele filogenetic prin metoda “Maximum likelihood” a fost construit folosind ampliconii obținuți în urma reacției PCR clasică, descrisă de către Rishniw et al. (Rishniw et al. 2006), și folosind amorsele DIDR-F1 și DIDR-R1, descrise mai sus.

Secvențele nucleotidice specifice *D. immitis*, obținute în urma reacției PCR descrise mai sus, sunt între 99.5% și 100% identice între ele și sunt 100% identice cu a secvențe găsite în baza de date GeneBank, obținute din Slovacia, de la vulpi (*Vulpes vulpes*) (MN596213), și de la câini (*Canis familiaris*) din Turcia (KF273906).

Secvențele nucleotidice specifice *D. repens*, obținute în urma aceleiași reacții PCR descrise mai sus, sunt între 97.6% și 100% identice între ele și sunt 100% identice cu secvențe găsite în baza de date GeneBank, obținute de la câini din Lituania (MH469230) și Tunisia (KR676387).

Secvența nucleotidică specifică *A. reconditum* a fost obținută în urma aceleiași metode PCR clasic, aceasta fiind identică 100% cu secvența cu codul KX932122, raportată în Brazilia și obținută de la câine.

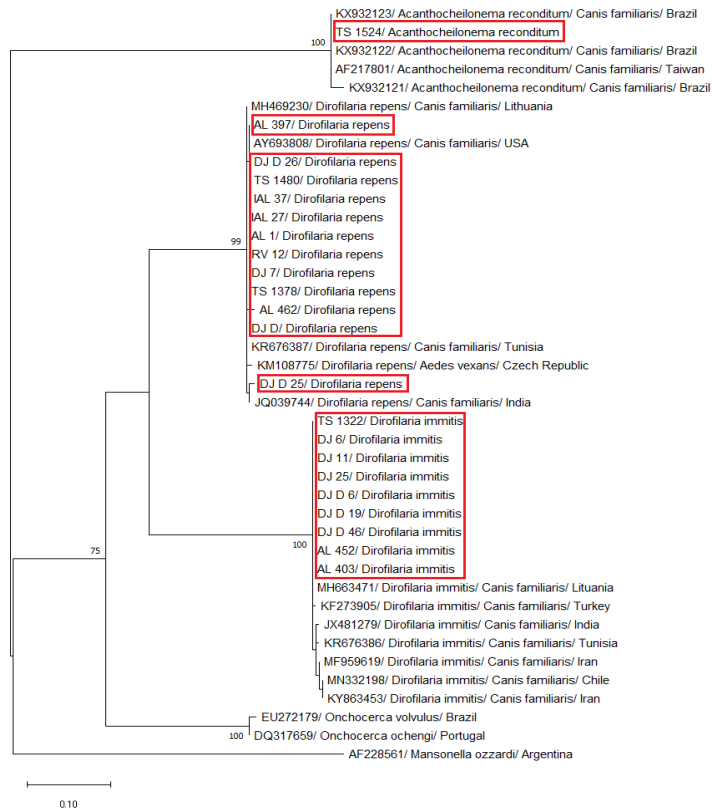


Figura 8.3: Studiul filogenetic se bazează pe secvențe nucleotidice specifice paraziților *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* și *Acanthocheilonema reconditum*, ce au fost obținute în urma reacției PCR clasic, cum a fost descrisă de Rishniw et al. (Rishniw et al. 2006), și folosind amorsele DIDR-F1 și DIDR-R1. Arborele a fost făcut folosind metoda „Maximum Likelihood” și bazat pe modelul “Tamura 3-parameter” (Tamura 1992). Pentru studiul filogenetic a fost folosit programul MEGA X (Kumar et al. 2018). Secvențele înconjurate cu roșu aparțin studiului nostru

Figure 8.3: Phylogenetic tree of *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* și *Acanthocheilonema reconditum* based on the amplicons obtained using the classic PCR reaction, described by a Rishniw et al. (Rishniw et al. 2006), and using the DIDR-F1 și DIDR-R1 primers. The evolutionary history was inferred by using the “Maximum Likelihood” method and “Tamura 3-parameter” model (Tamura 1992). Sequences obtained in this study are marked with a red rectangle. Only bootstrap values above 80% are shown

8.4 Discuții

Raportăm un studiu epidemiologic exhaustiv al infecțiilor canine cu filarii în sudul României. Raportăm o prevalență totală de 17% (51/300) a infecțiilor cu filarii la câini fără stăpân din mai multe județe din sudul României. Prevalența totală a infecțiilor cu *D. repens* a fost de 12% (36/300), mult mai mare față de 4.25%, cât a raportat Ciocan et al. în vestul României în 2010, și 6.23% cât a raportat Poliana et al. în județul Dâmbovița în 2013. Compararea acestor rezultate nu este corectă pentru că în studiile publicate de Poliana et al. și Ciocan et al. au folosit metoda Knott modificată iar Ciocan et al. a folosit metoda PCR doar pentru confirmarea probelor pozitive (Poliana et al. 2013; Roberta CIOCAN, Gh. DĂRĂBUȘ, Olga JACSÓ 2010). Diferența de prevalență ar putea să fie explicată de sensibilitatea superioară a metodei PCR, regiunile diferite de unde au fost colectate probele, dar și de o creștere reală a prevalenței între 2013 și 2017.

Prevalența infecțiilor cu *D. repens* raportată de noi este considerabil mai mare și ca cea de 6.15% raportată de către Ionică et al. în 2015 (Ionică et al. 2015). Este mai ușor de comparat rezultatele acestor două studii pentru că ambele au folosit metoda PCR. În acest caz diferența de prevalență ar putea să se datoreze faptului că probele au fost colectate în mare parte din județe diferite. Prevalența infecțiilor cu *D. repens* raportată de Ionică et al. în județele Dolj și Teleorman a fost de 13.7%, respectiv 8.9%. Aceste rezultate sunt foarte apropiate de prevalențele de 14% în Dolj și 8.79% în Teleorman raportate în acest studiu (Ionică et al. 2015).

Prevalența infecțiilor cu *D. repens* din studiul nostru a fost considerabil mai mică ca cea raportată în țări apropiate, cum sunt Serbia sau Croația. În aceste țări prevalența infecțiilor cu *D. repens* variază foarte mult, între 24.5% și 49.2%. Aceste variații depind în funcție de metoda folosită în diversele studii, zona investigată și anul când a fost efectuat studiul. Prevalența mai crescută față de cea raportată în studiul nostru poate fi explicată și de influența climei mediteraneene din aceste țări (Tasić-Otašević et al. 2015).

În Ungaria, o țară cu un climat asemănător cu cel din România, prevalența infecțiilor cu *D. repens* este de 11.1%, foarte apropiat de cel de 12% raportat de noi (Farkas et al. 2020).

Prevalența totală a infecțiilor cu *D. immitis* în studiul nostru este de 4.67% (14/300), semnificativ mai mică ca cea de 23.07% raportată de Coman et al. în 2007, în vestul țării, cea de 12.63% raportată de Poliana et al. în județul Dâmbovița, în 2015 și cea de 8.9% raportată de Ciucă et al. în estul țării, în 2017. Și în acest caz rezultatele studiilor nu pot fi comparate cu ușurință având în vedere

că în studiile publicate de către Poliana et al. și Coman et al. au folosit metode ce se bazează pe identificarea microfilariei din sânge, iar în studiul publicat de către Ciucă et al. a fost folosită metoda ELISA (Ciucă et al. 2016; COMAN et al. 2007; Poliana et al. 2013).

Prevalența totală a infecțiilor cu *D. immitis* raportată de noi este mult mai apropiată de cea de 3.3% raportată de către Mircean et al. în 2012 dar și acesta a folosit o metodă bazată pe serologie și nu biologie moleculară ca în studiul nostru (Mircean et al. 2012).

În anul 2015 Ionică et al. publică rezultatele unui studiu epidemiologic al prevalenței infecțiilor canine cu *Dirofilaria* spp. și *A. reconditum*. În acest studiu sunt folosite și metode bazate pe biologia moleculară, iar prevalența totală a infecțiilor cu *D. immitis*, de 6.15% este foarte apropiată de cea de 4.67% raportată în studiul nostru (Ionică et al. 2015).

În țări apropiate ca Bulgaria, Croația și Ungaria, prevalența infecțiilor cu *D. immitis* la câini a fost considerabil mai mare. În Bulgaria a fost raportată o prevalență între 7.4% și 16.2%, în Croația de 7.5%, iar în Ungaria un studiu bazat pe biologie moleculară raportează o prevalență de 8.1%.

În studiul nostru prevalența infecțiilor cu *A. reconditum* a fost de 1.33% (4/300). Aceasta este o prevalență similară cu cea de 2.05%, raportată de către Ionică et al. în 2015 și cea de 0.91% raportată de către Hamel et al. în 2012 (Hamel et al. 2012; Ionică et al. 2015).

Infecțiile cu *D. immitis*, *D. repens* și *A. reconditum* au fost raportate în România și la animale sălbatice. *D. immitis* a fost raportată la șacal (*Canis aureus*), vulpe (*Vulpes vulpes*) și pisica sălbatică (*Felis silvestris*). Infecțiile cu *D. repens* au fost raportate la șacal, vulpe, lup (*Canis lupus*) și la nevăstuică (*Mustela nivalis*) iar infecțiile cu *A. reconditum* au fost raportate doar la vulpi. Infecțiile carnivorelor sălbatice cu filarii pot reprezenta un factor de risc menținând o infecție în o anumită regiune dar și răspândindu-le de la o regiune la alta (Ionică et al. 2016; Ionică et al. 2017).

Prezența *D. immitis* și *D. repens* a fost confirmată în România și în țânțari recoltați din Delta Dunării într-un studiu recent ce întărește ideea că prezența acestor infecții este semnificativă și în estul Europei (Tomazatos et al. 2018).

În studiul nostru nu au fost observate diferențe de prevalență între diferitele regiuni din care au fost colectate probe cu excepția diferenței de prevalență a infecțiilor cu *D. immitis* între Craiova (10%) și Roșiorii de Vede (0%) ($p=0.036$).

Omul poate fi gazdă accidentală pentru *D. repens* și *D. immitis* iar în zonele endemice sunt raportate ocazional și infecții umane. România nu face

excepție de la această regulă iar între anii 2012 și 2017 au fost raportate două cazuri de infecții subconjunctivale, două cazuri de infecții subcutanate și un caz cu o infecție localizată la nivel intramuscular. În toate aceste studii filariile au fost identificate ca fiind *D. repens* (Arbune și Dobre 2015; Gheorghiu et al. 2017; Lupșe et al. 2014; Macarie et al. 2017; Popescu et al. 2012). Având în vedere că potențialul zoonotic al acestor infecții nu este foarte bine cunoscut în România, este foarte posibil ca numărul real al infecțiilor umane să fie mult mai mare.

Un studiu publicat în 2018 de către al Ciucă et al. raportează o seroprevalență a infecțiilor umane cu *D. immitis* în estul și sudul României de 6.9%. Chiar dacă microfiliariile se dezvoltă rar în corpul uman, acest studiu este important pentru că arată procentul populației ce a fost expusă (Ciuca et al. 2018).

8.5 Concluzii parțiale

Infecțiile canine cu *D. immitis* și *D. repens* reprezintă un pericol real pentru sănătatea animalelor de companie, dar și pentru cea a oamenilor. Acest studiu urmărește să completeze informațiile despre prevalența infecțiilor cu filarioze canine în sudul României, folosindu-se de sensibilitatea și specificitatea crescută a metodelor bazate pe biologie moleculară.

Acest studiu ne oferă o imagine în detaliu a prevalenței infecțiilor cu *D. repens*, *D. immitis* și *A. reconditum* în sudul României. A fost observat că prevalența infecțiilor cu *D. repens* a fost cea mai mare, iar prevalența infecțiilor cu *D. immitis* a fost mai mare ca cea cu *A. reconditum*. Nu au fost observate diferențe de prevalență semnificative, din punct de vedere statistic, de la o zonă la alta.

În contextul epidemiologic actual, se raportează modificări semnificative ale prevalenței și distribuției a mai multor boli vectoriale în toate regiunile lumii. Din acest motiv, chiar dacă există studii anterioare au urmărit să înțeleagă epidemiologia infecțiilor canine cu *D. repens* și *D. immitis*, monitorizarea răspândirii acestor infecții trebuie să fie un proces continuu. Având în vedere importanța acestor infecții pentru sănătatea animalelor și a oamenilor am ales să folosim tehnicile qPCR și secvențiere ce ne oferă o sensibilitate și o specificitate foarte ridicată.

Informațiile prezente în acest studiu sunt importante pentru veterinarii din sudul României pentru că le permit să estimeze cât de expuși sunt câinii din regiune la astfel de infecții. Acest lucru este deosebit de important pentru infecțiile cu *D. immitis*, ce au o patogenicitate mai mare. Câinii sunt principalul rezervor pentru aceste infecții, și din acest motiv, informațiile prezentate mai sus

Cîmpan Andrei Alexandru

sunt de interes și pentru medicii umani, pentru că infecțiile umane cu *D. repens* în România reprezintă o problemă medicală reală dar puțin cunoscută.

CAPITOLUL IX FOLOSIREA TEHNICII MALDI-TOF PENTRU IDENTIFICAREA SPECIEI DE FLEBOTOMI

CHAPTER IX THE USE OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY FOR THE IDENTIFICATION OF SANDFLIES

9.1 Descrierea cadrului organizatoric al cercetărilor

Tehnica de spectrometrie de masă MALDI-TOF, nume ce vine de la prescurtarea în engleză “Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight”, implică ionizare, asistată de o matrice, pentru a obține ioni ai unor biomolecule, ca proteine, polizaharide sau acizi nucleici. Spectrometrie de masă MALDI-TOF este o metodă revoluționară iar cu trecerea timpului au fost descoperite mai multe utilități pentru această tehnică (figura 9.1). Inițial a fost folosită, pentru a identifica, cu acuratețe și cu un cost redus, microorganisme cu importanță clinică, cum sunt bacteriile sau fungii (Mellmann et al. 2009; Santos et al. 2010; Sauer și Kliem 2010). În anul 2005, această metodă a fost adaptată pentru identificarea nematodelor (Perera, Vanstone, și Jones 2005). Tot în acest an, această tehnică a fost folosită pentru prima oară pentru a identifica artropode, Campbell et al. a reușit să identifice și să diferențieze, cu acuratețe diferite subgrupuri ale speciei *Drosophila melanogaster* (Campbell 2005).

Ulterior, această metodă a fost folosită pentru a identifica diverse artropode importante pentru medicina veterinară, dar și pentru medicina umană, pentru abilitatea lor de a transmite paraziți, bacterii sau virusuri.

Tehnica MALDI-TOF a fost folosită pentru a identifica specii de căpușe, țânțari, culicoizi, purici, dar și flebotomi (Kaufmann et al. 2012; Kumsa et al. 2016; Tandina et al. 2018; Zurita et al. 2019).

Această metodă reprezintă un avantaj considerabil mai ales în cazurile în care identificarea morfologică de specie, nu este posibilă, sau este greu de executat. În comparație cu metodele de identificare a insectelor, bazate pe biologie moleculară, metoda MALDI-TOF prezintă un cost mult mai redus al reactivilor consumabili, lucru ce permite executarea unor studii mai mari cu același cost. Această tehnică prezintă avantajul de a fi mai rapidă ca metodele bazate pe biologie moleculară iar posibilitatea de contaminarea între probe, este mult mai scăzută.

Pe lângă identificarea cu acuratețe a mai multe specii de artropode, metoda MALDI-TOF poate fi folosită și pentru a identifica bacteriile și paraziți ce sunt transmiși de aceste artropode. Identificarea acestor bacterii sau paraziți poate fi făcută atât în artropodele ce le transmit, cât și în probe biologice obținute de la animale infectate (Dzięgiel et al. 2016; El Hamzaoui, Laroche, și Parola 2019; Tahir et al. 2017).

Această tehnică poate fi utilizată și pentru a identifica sursa sângelui din interiorul unui vector hematofag (Diarra et al. 2019; Hlavackova et al. 2019). Această utilizare este esențială pentru a înțelege ciclul de transmitere a unor boli vectoriale și ce gazde aleg unele artropode hematofage.

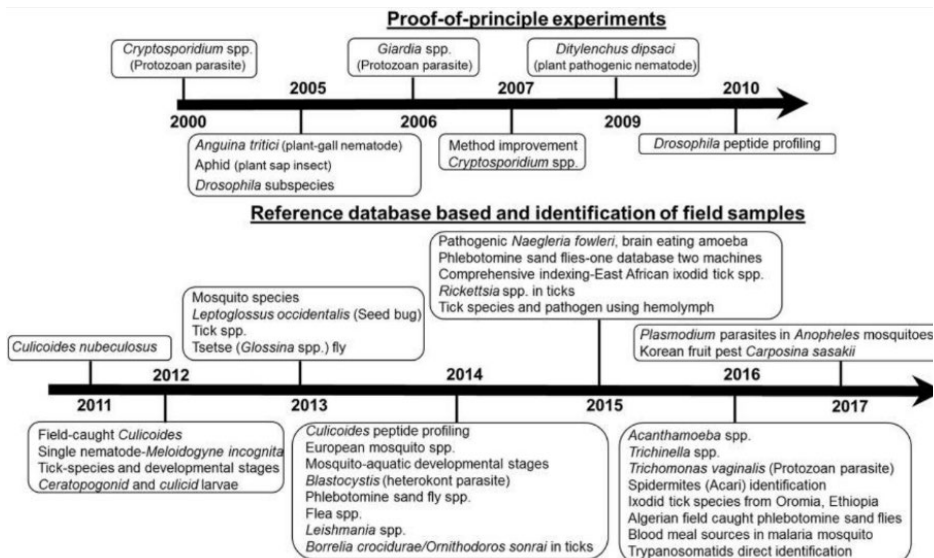


Figura 9.1: Cronologia descoperirilor de noi metode de a identifica bacterii paraziți și vectori, folosind tehnica MALDI-TOF (Murugaiyan și Roesler 2017)

Figure 9.1: Time line of the development of MALDI-TOF techniques for the identification of bacteria, parasites and their vectors (Murugaiyan și Roesler 2017)

Folosirea tehnicii MALDI-TOF prezintă și unele dezavantaje. Chiar dacă reactivi necesari au un cost redus, aparatul în sine încă are un cost considerabil. Programele necesare pentru citirea și analizarea spectrelor produse de aparat este restricționat, lucru ce nu facilitează accesul la un număr mare de persoane ce ar putea să învețe să interpreteze spectrele produse în urma analizei MALDI-TOF. Interpretarea rezultatelor este dependentă de formarea unei baze de date ce trebuie

să conțină fiecare specie de artropod analizată. Pentru a putea compara probele analizate cu baza de date, probele trebuie stocate și prelucrate în mod identic cu probele folosite pentru a crea baza de date. O bază de date sau un spectru prelucrat cu un sistem de spectrometrie de masă nu este compatibil cu un sistem produs de o companie diferită.

Scopul acestui studiu este de optimiza o metodă automată de omogenizare a probelor provenite de la flebotomi, de a folosi această tehnică pentru a identifica cu acuratețe specia flebotomilor colectați în nordul Greciei și de a începe o bază de date pentru flebotomi stocați în etanol 70% și omogenizați mecanic.

9.2 Materiale și metode

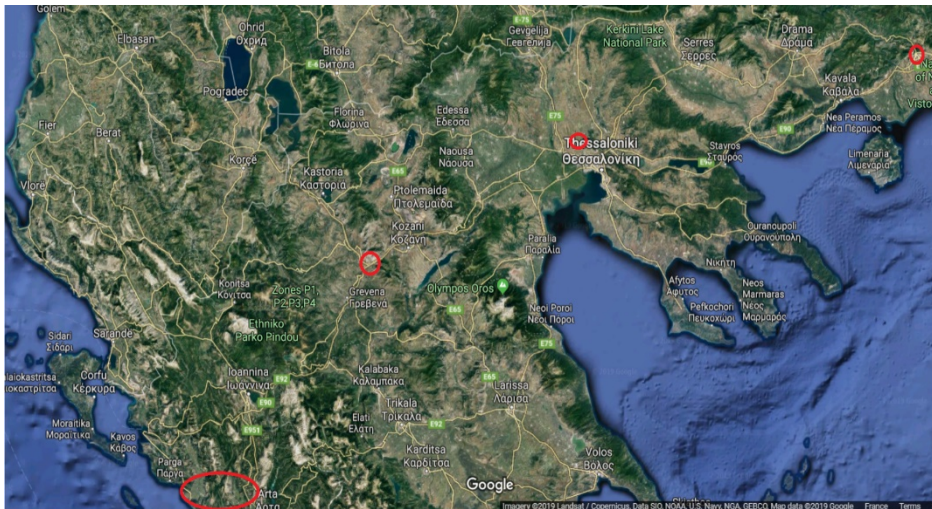
9.2.1 Colectarea flebotomilor

Colectarea flebotomilor a avut loc în lunile August și Septembrie 2019 în 21 de locații din următoarele regiuni, din nordul Greciei: Epirus, Macedonia de vest, Macedonia centrală și Macedonia de est. Locația acestor puncte de colectare poate fi observată în figura 9.2. Pentru colectarea flebotomilor au fost folosite capcane tip “CDC light trap”, fabricate din materiale autohtone. Capcanele au fost poziționate în punctele de colectare la apus și au fost colectate a doua zi, la ora 8. Distanța capcanelor față de sol a fost între 1-1.5 m. După cum poate fi observat din figura 9.3, capcanele au fost amplasate lângă ferme de vaci, oi, capre, adăposturi de câini, restaurante sau zone locuite de oameni.

Flebotomii capturați au fost stocați în etanol 70% și ținuți la -20°C.



(a)



(b)

Figura 9.2: (a) Regiunile din nordul Greciei, de unde au fost colectați flebotomi. (b) Localitățile unde au fost amplasate capcane pentru recoltarea flebotomilor

Figure 9.2: (a) The regions, from the north of Greece, where sandfly sampling was done. (b) The geographical location where light-traps were placed



Figura 9.3: Capcane amplasate lângă ferme de oi, din regiunea Epirus, în nordul Greciei

Figure 9.3: Light-traps placed near sheep farms from the Epirus region, from the north of Greece

9.2.2 Identificarea morfologică a flebotomilor

După colectare, flebotomii au fost separați de alte insecte ținând cont de caracteristicile morfologice specifice flebotomilor și apoi au fost separați pe sexe, ținând cont de dimorfismul sexual. Aceste caracteristici morfologice pot fi observate în figurile 9.4 și 9.5.



Figura 9.4: Femelă flebotom din genul *Phlebotomus*. Specimen capturat în vestul Greciei. Se poate observa poziția specifică, ridicată a aripilor, în formă de “V” și picioarele lungi și subțiri (colecție proprie)

Figure 9.4: Female sandfly, genus *Phlebotomus*. Sample collected from the west of Greece. The typical “V” shape position of the wings and the long and thin legs can be observed (original)

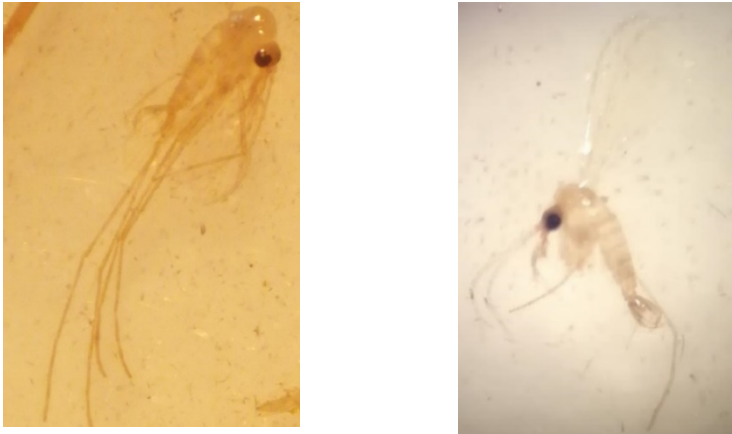


Figura 9.5: Flebotomi masculi din genul *Phlebotomus* menținuți în etanol 70%. Se pot observa organele genitale externe, poziția specifică a aripilor și picioarele lungi și subțiri. Specimene capturate în vestul Greciei (original)

Figure 9.5: Two male sandflies maintained in 70% ethanol. The external copulatory organs can be observed, as well as the typical „V” shaped position of the wings, and the fine, long legs. Samples and pictures belong to the author and have been collected from the west of Greece (original)

Capul și partea caudală a abdomenului (ultimele trei secțiuni) ale flebotomilor au fost secționare, folosind ace entomologice sterile și au fost încălzite într-o soluție Marc-André și fixate între lamă și lamelă, într-o picătură de alcool polivinilic. A fost analizată la microscop spermateca, aparatul genital mascul și armatura de la nivelul faringelui. Identificarea de specie a fost făcută folosind chei de identificare entomologice specifice pentru flebotomi (Killick-Kendrick et al. 1991; Lewis 1982).

Abdomenul a fost păstrat în continuare în etanol 70%, la -20°C , pentru analiză bazată pe biologie moleculară, iar toracele, împreună cu picioarele și aripile au fost stocate separat pentru analiza MALDI-TOF.

9.2.3 Prelucrarea probelor pentru tehnica MALDI-TOF

Fiecare probă ce conține doar toracele cu aripile și picioarele de flebotom este ținută la uscat, fără etanol, într-un tub de 1.5 ml deschis, timp de 16 ore, la o temperatură de 37°C .

A fost pregătită soluția pentru prelucrarea probei: se amestecă într-un tub de 2 ml 800 μl apă pentru cromatografie de lichide de înaltă performanță (apă

HPLC), 700 μ l acid formic, de o concentrație cel puțin 98%, și 500 μ l acetonitril, de o concentrație 100%. Această soluție va fi amestecată.

În fiecare tub ce conține câte o probă uscată se adaugă 20 μ l de soluție de prelucrare a probei ce este descrisă mai sus. În fiecare tub ce conține probă și soluție a fost adăugat praf sticlă (Glass beads, acid-washed G4649, $\leq 106 \mu$ m, produs de Sigma, Lyon, Franța) (figura 9.6). Praful de sticlă trebuie să reprezinte 50% din volumul soluției.

A fost pregătită substanța matrice, ce este o soluție saturată de acid α -cyano-4-hydroxycinnamic, ce conține 50% acetonitril, 2,5% acid trifluoroacetic (TFA) și apă HPLC.

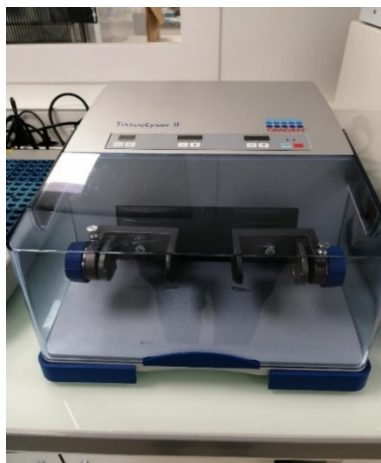
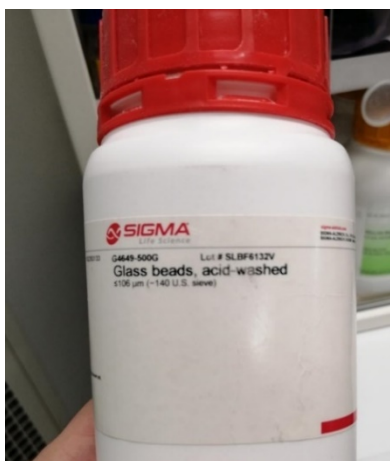


Figura 9.6: Omogenizatorul automat TissueLyser II, de la Qiagen și praful de sticlă folosit pentru omogenizarea și extracția proteinelor

Figure 9.6: Automatic homogeniser TissueLyser II, from Qiagen, and the glass powder, used to homogenise and extract proteins from the sample

Amestecul de probe, soluție și praf de sticlă au fost plasate într-un omogenizator automat, Tissue Lyser II[®], de la Qiagen pentru a obține extrasul proteic (figura 9.6). Probele au fost omogenizate la o frecvență de 30 de oscilații pe secundă, timp de 1.3 minute. Omogenizarea a fost executată de trei ori, cu o pauză de un minut între acestea. După omogenizare, probele au fost centrifugate, la o turație de 13.000 g, timp de 10 minute. Supernatantul obținut în urma centrifugării este extrasul proteic folosit în analiza MALDI-TOF.

A fost încărcată placa de oțel pentru MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Wissembourg, Franța) cu câte 1 μ l de extras proteic, în fiecare godeu. Fiecare probă a fost încărcată în cel puțin 4 godeuri. Placa a fost lăsată la uscat timp de 5

minute, la temperatura camerei, a fost încărcat 1 μ l de substanță matrice în fiecare godeu și a fost ținută încă 5 minute la uscat.

Placa a fost analizată folosind aparatul „Microflex LT MALDI-TOF Mass Spectrometer”, produs de firma Bruker Daltonics, din Germania.

9.2.4 Setările spectrometrului de masă MALDI-TOF

A fost folosit spectrometrul de masă “Microflex LT MALDI-TOF” ce se poate observa în figura 9.7 și programul “FlexControl v.3.3” produs de Bruker Daltonics, din Germania pentru a produce spectrul proteic specific probelor analizate.

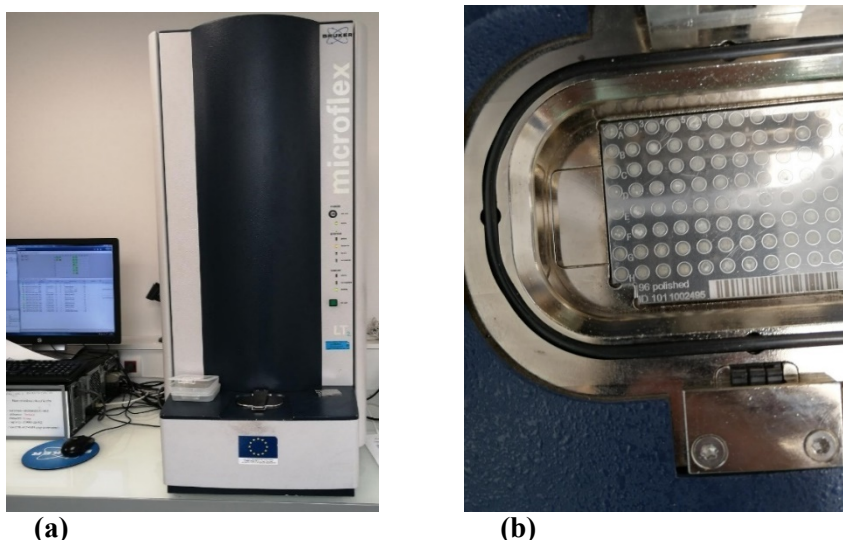


Figura 9.7: (a) Aparatul “Microflex LT MALDI-TOF” folosit pentru identificarea speciilor de artropode. (b) Placa pentru MALDI-TOF, cu probe, încărcată în lăcașul aparatului.

Figure 9.7: (a) The “Microflex LT MALDI-TOF”, used for the species identification. (b) The steel plate, with samples, loaded in the MALDI-TOF machine.

Aparatul a fost setat corespunzător pentru analiza artropodelor, setări, ce au fost descrise anterior și în alte lucrări științifice (Boucheikhchoukh et al., 2018; Kumsa et al., 2016; Yssouf et al., 2013). Spectrele au fost măsurate folosind metoda “linear positive-ion” și cu o frecvență a laserului de 50 Hz. Au fost analizate proteinele cu masă între 2 și 20 kDa. Voltajul în perioada de accelerare a ionilor a fost de 20 kV. Fiecare spectru a fost construit după 240 activări ale

laserului, în 6 regiuni diferite ale fiecărui godeu. Spectrele generate, au fost vizualizate folosind programul FlexAnalysis v.3.3 și au fost procesate folosind programul ClinProTools software v.2.2. Ambele programe au fost produse de către compania Bruker Daltonics, din Germania.

9.2.5 Crearea bazei de date, de referință și identificarea de specie a flebotomilor, prin metoda “blind test”

Având la bază identificarea morfologică, au fost selectate spectrele folosite ca spectre de referință. Spectrele de referință au fost utilizate pentru a crea o bază de date necesară pentru a identifica probe necunoscute. Pentru a crea baza de date, au fost folosite cel puțin 5 spectre pentru fiecare specie și utilizând funcția programului MALDI-Biotyper v3.0. (Bruker Daltonics). Programul a folosit poziția, frecvența și intensitatea vârfurilor din spectrele introduse, pentru a crea un spectru de referință, sau “main spectrum profile”

Spectrele au fost analizate prin metoda “blind test”. Identificarea a fost făcută folosind valoarea LSV (log score values), calculat de către programul MALDI-Biotyper software v.3.0, după ce este comparat spectrul obținut de la proba analizată cu spectrul de referință. Această valoare LSV poate să varieze între 0 și 3 și evaluează nivelul de reproductibilitate între spectrul probei analizate și spectrul de referință, comparând poziția și intensitatea vârfurilor. Mai multe studii au demonstrat că o valoare de minim 1.8 LSV este necesară pentru identifica cu încredere specia insectei analizate (Kumsa et al. 2016; Yssouf et al. 2013).

A fost obținut câte un spectru pentru fiecare godeu încărcat, așadar pentru fiecare flebotom analizat au fost obținute între 4 și 6 spectre. Pentru identificarea de specie a fost ales doar spectrul cel mai bun, din punct de vedere al calității.

9.3 Rezultate obținute

Din 21 de puncte de recoltare au fost identificați morfologic 110 flebotomi dintre care 44 femele și 66 masculi. Pentru identificare au fost observate caracteristicile morfologice specifice pe specii, prezente la nivelul aparatul genital mascul, spermatecei, și armaturei de la nivelul faringelui, după cum se poate observa în figurile 9.8 și 9.9.

Morfologic au fost identificați 48 *Phlebotomus tobbi*, 21 *Sergentomya minuta*, 25 *Phlebotomus neglectus*, 13 *Phlebotomus perfiliewi*, 1 *Phlebotomus papatasi* și 2 *Phlebotomus simici*.

Datorită numărului scăzut de exemplare, insuficiente pentru crearea bazei de date, exemplarele de *Phlebotomus papatasi* și *Phlebotomus simici* nu au putut fi folosite pentru identificarea MALDI-TOF. Au fost folosite 107 exemplare în analiza MALDI-TOF.

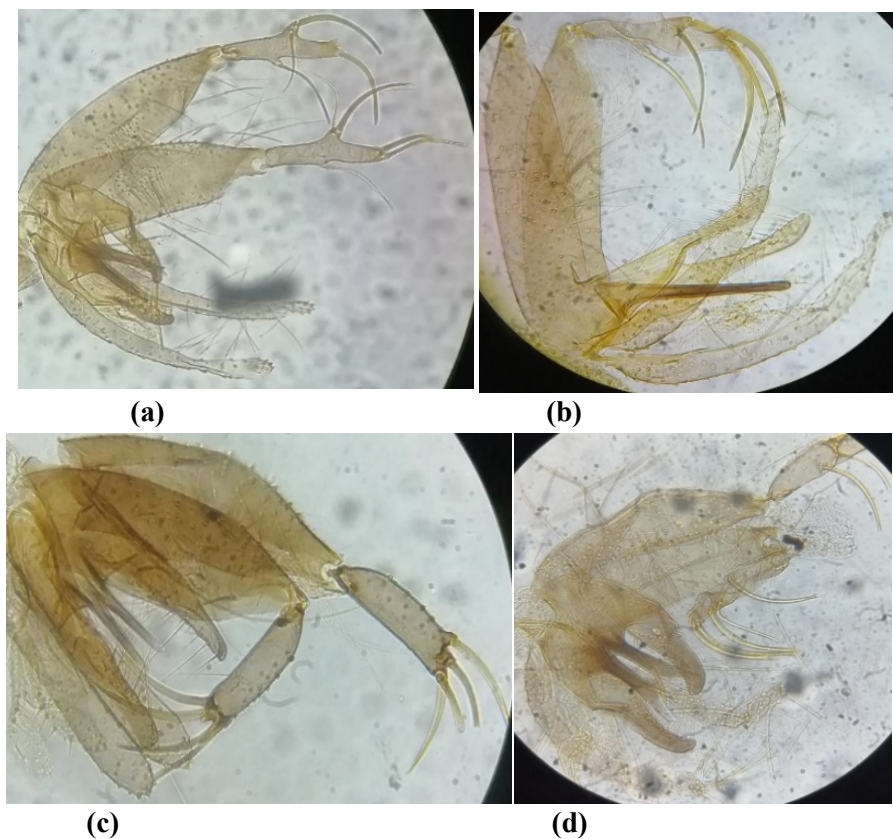


Figura 9.8: Aparate genitale ale masculilor flebotomi folosite pentru identificarea morfologică a speciei: **(a)** *Phlebotomus tobbi*, **(b)** *Phlebotomus neglectus*, **(c)** *Sergentomyia minuta*, **(d)** *Phlebotomus perfiliewi*

Figure 9.8: The male genitalia used for species identification of sandflies: **(a)** *Phlebotomus tobbi*, **(b)** *Phlebotomus neglectus*, **(c)** *Sergentomyia minuta*, **(d)** *Phlebotomus perfiliewi*

În urma identificării MALDI-TOF, prin metoda “blind test”, au fost identificate corespunzător cu identificarea morfologică, cu un scor mai mare de 1.8 LSV 96.26% (103/107) dintre probele analizate. Doar 4 probe analizate nu au prezentat un LSV mai mare de 1.8 (trei probe *S. minuta* și o probă de *P. neglectus*).

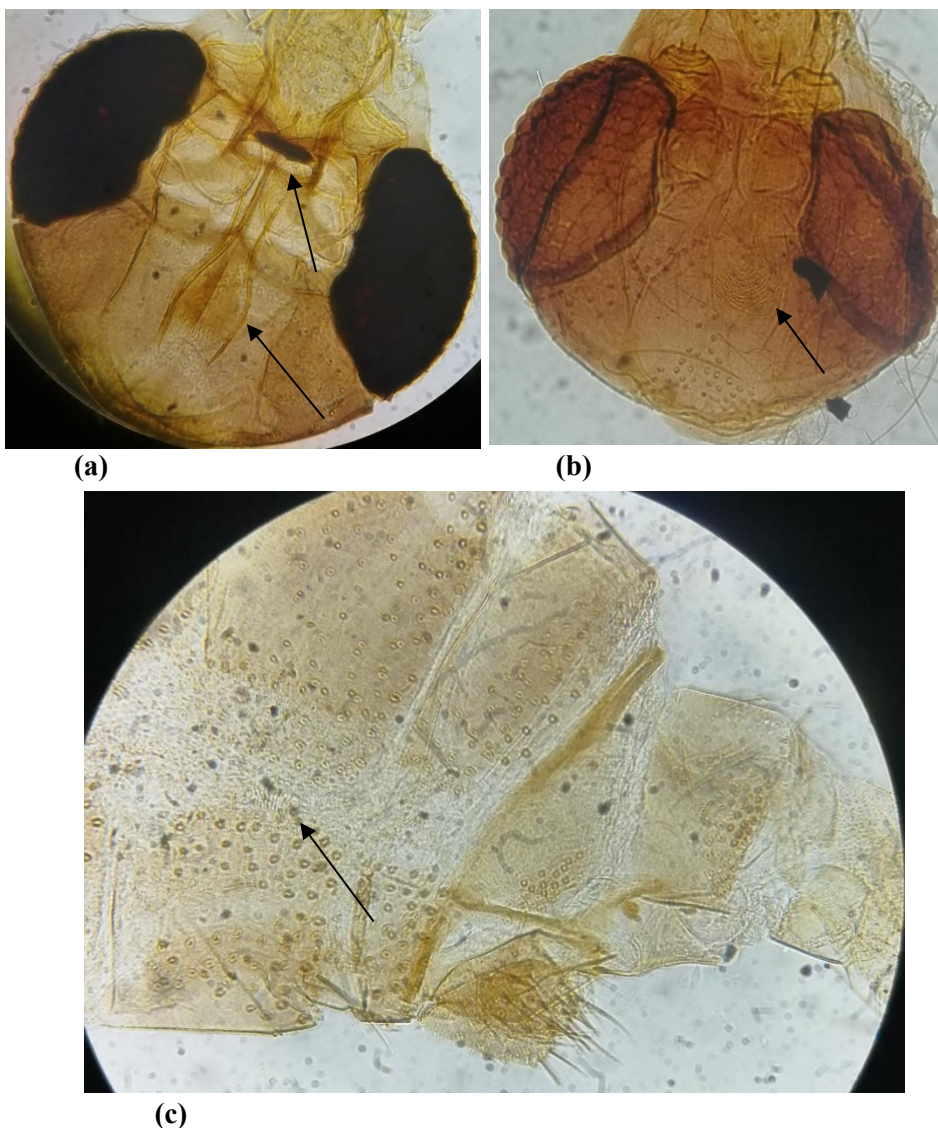


Figura 9.9: Structuri anatomice folosite pentru identificarea morfologică: armatura de la nivelul faringelui a flebotomilor (a) *Sergentomyia minuta* și (b) *Phlebotomus neglectus*, spermateca ce face parte din organul genital femel a flebotomilor (c) *Phlebotomus neglectus*

Figure 9.9: Anatomical structures used for species identification of sandflies: pharyngeal armature of (a) *Sergentomyia minuta* and (b) *Phlebotomus neglectus* sandflies. The spermathecae, part of the female reproductive organ of (c) *Phlebotomus neglectus* sandflies

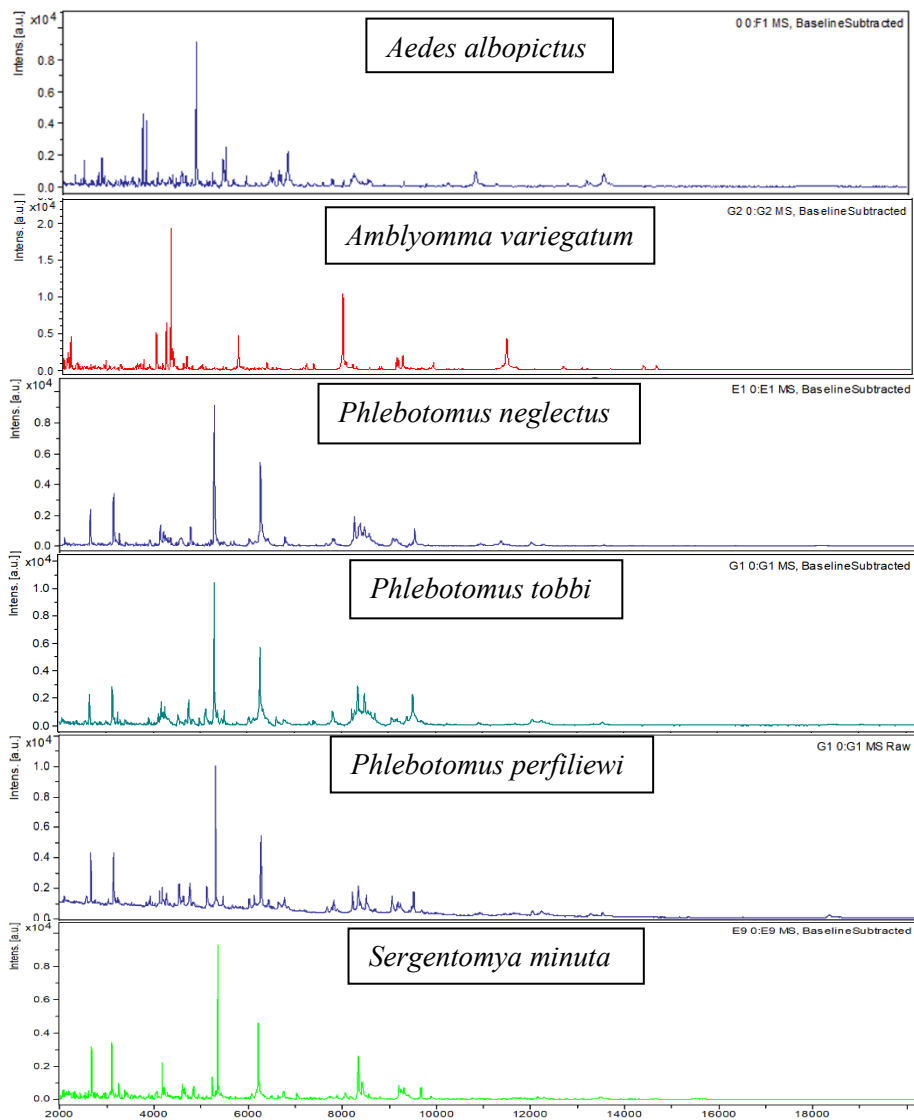


Figura 9.10: Spectre reprezentative, pentru fiecare specie de flebotom analizată cu metoda MALDI-TOF, dar și două spectre reprezentative pentru căpușa *Amblyomma variegatum* și țânțarul *Aedes albopictus*, pentru comparație. Spectrele au fost analizate folosind programul FlexAnalysis v3.3. (Intens) Intensitate; (a.u) unități arbitrare; (m/z) raportul masă/sarcină electrică

Figure 9.10: Spectra, representative for each sandfly species analysed in our study, and spectra, representative for the tick *Amblyomma variegatum* and the

mosquito *Aedes albopictus*, for comparison. (Intens) Intensity; (a.u) arbitrary units; (m/z) mass-to-charge ratio

Se pot observa diferențe minore a înălțimii și poziționării vârfurilor
După cum se observă din figura 9.10, flebotomii au spectre asemănătoare dar există diferențe minore, ce depind de specia sau genul flebotomului. Se poate observa în figura 9.10 că spectrele ce provin de la alte artropode, *Aedes albopictus* și *Amblyomma variegatum*, prezintă diferențe semnificative față de spectrele ce provin de la flebotomi.

9.4 Concluzii parțiale

Acest studiu a reușit să atingă mai multe obiective. Îndeplinirea acestor obiective ajută la ușurarea studiului prevalenței și distribuțiilor, biologiei și ecologiei flebotomilor, dar și a altor artropode ce pot juca rol de vector.

Capcanele de tip “CDC light trap” sunt indispensabile pentru studiul insectelor hemofage, cu fototropism pozitiv dar pot avea un cost semnificativ pentru unii cercetători. Folosirea de materiale autohtone pentru a construi aceste capcane reprezintă o soluție practică având în vedere simplitatea construcției.

Capcanele construite din materiale autohtone au fost folosite cu succes pentru a captura flebotomi din toate regiunile din nordul Greciei, o zonă hiperendemică pentru leishmanioza canină provocată de *L. infantum*.

Identificarea morfologică a flebotomilor până la nivel de specie a fost executată pentru a înțelege răspândirea și prevalența speciilor de flebotomi ce pot transmite *L. infantum*.

Pentru a identifica flebotomii, a fost folosită și tehnica de spectrometrie de masă MALDI-TOF, pentru profita de avantajele acestei tehnici, menționate și în introducerea acestui capitol.

A fost adaptată tehnica MALDI-TOF pentru a identifica specia de flebotomi, folosind omogenizarea automată a probelor. Omogenizarea probelor este un pas important pentru analiza MALDI-TOF, dar executarea acestui pas manual poate duce la spectre de calitate proastă și poate dureze mai mult, sau poate să ducă la compromiterea probei. Când a fost executat acest studiu nu exista un protocol pentru omogenizarea automată a flebotomilor pentru MALDI-TOF. Din acest motiv am optimizat un protocol pentru omogenizarea automată a flebotomilor, pornind.

După cum a fost prezentat și în introducere, unul dintre dezavantajele majore ale tehnicii MALDI-TOF este nevoia de o bază de date ce trebuie să

conțină mai multe spectre de la toate artropodele ce trebuie identificate. Unul dintre obiectivele îndeplinite ale acestui studiu a fost acela de crea o bază de date ce poate fi folosită pentru a identifica flebotomii *P. tobbi*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* și *S. minuta*.

După cum este descris mai sus, acest studiu îndeplinește mai multe obiective ce au rolul de a facilita studiul flebotomilor, dar și a altor artropode ce sunt potențiali vectori pentru boli parazitare.

CAPITOLUL X CONCLUZII FINALE CHAPTER X FINAL CONCLUSIONS

În urma studiilor efectuate privind epidemiologia parazitozelor transmise de vectori la câine în sudul României am formulat următoarele concluzii finale:

1. În ciuda faptului că în urma studiului prezentat în cadrul capitolului V, nu a fost dovedită prezența parazitului *Leishmania infantum* la câini din sudul României, studiile efectuate anterior indică că există o posibilitate reală ca leishmanioza canină să redevină endemică în această regiune.
2. Toate studiile ce tratează infecțiile autohtone cu *Leishmania infantum* au fost făcute în sudul României dar nu se cunoaște situația epidemiologică în alte regiuni ale țării. Studiul prezentat la capitolul VI arată că în sud-estul României câinii sunt expuși infecțiilor cu *L. infantum*. Prezența acestui parazit trebuie investigată și în alte regiuni ale țării.
3. Epidemiologia infecțiilor canine cu *Babesia* spp a fost studiată în trecut, dar având în vedere importanța acestei infecții pentru medicina veterinară sunt necesare mai multe studii epidemiologice exhaustive, folosind tehnici de biologia moleculară. Studiul prezentat în capitolul VII ne arată că există diferențe semnificative ale prevalenței infecțiilor canine cu *Babesia* spp. între unele județe.
4. De cele mai multe ori infecțiile canine cu *Hepatozoon canis* nu prezintă manifestări clinice la fel de grave ca în cazul infecțiilor cu *Babesia* spp.. Totuși hepatozoonoza canină se prezintă de multe ori la animale deja infectate cu alți agenți infecțioși îngreunând diagnosticul și agravând manifestările clinice. Epidemiologia acestei infecții este necunoscută în aproape toate regiunile țării. În studiul de la capitolul VII prezentăm o prevalență surprinzător de crescută, mai ales în vestul regiunii studiate. Acest tip de studiu ar trebui repetat în toate regiunile țării.
5. În ultimii ani au crescut numărul de infecții raportate cu *Dirofilaria* spp., dar majoritatea studiilor au folosit tehnici de identificare morfologică a microfiliariilor sau tehnici serologice. În capitolul VIII prezentăm prevalența infecțiilor cu *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* și *Acanthocheilium reconditum* în sudul României, obținută profitând de sensibilitatea și specificitatea tehnici qPCR. Identificarea frecventă a infecțiilor canine cu *Dirofilaria* spp., folosind și tehnici de biologie moleculară este absolut necesară pentru a estima riscul pentru

sănătatea animalelor, dar și a oamenilor. Pentru a estima acest risc în România este important ca acest tip de studiu să fie repetat în toate regiunile țării.

6. Studiile filogenetice au arătat că secvențele nucleotidice ale paraziților identificați sunt identice sau similare cu secvențe ce au fost anterior raportate în România și în țări apropiate.

7. Spectrometria de masă de tip MALDI-TOF este o tehnică inovativă ce poate fi folosită pentru a identifica rapid și precis specii de flebotomi. După cum prezentăm în capitolul IX, chiar dacă această tehnică a fost folosită cu succes în trecut, aceasta încă poate fi optimizată.

8. Având în vedere fenomenul ce a dus la schimbări considerabile ale prevalenței și distribuției bolilor vectoriale, sunt necesare programe de monitorizare continuă a evoluției acestor infecții, pentru a asigura sănătatea animalelor dar și a oamenilor. Mai mult de atât, trebuie analizat riscul apariției, în viitor, a unor infecții ce acum nu sunt endemice în țara noastră.

BIBLIOGRAFIE REFERENCES

- Aktas, Munir, Sezayi Özübek, Kürşat Altay, Ibrahim Balkaya, Armagan Erdem Utuk, Akin Kirbas, Sami Şimsek, și Nazir Dumanli. 2015. „A molecular and parasitological survey of Hepatozoon canis in domestic dogs in Turkey”. *Veterinary Parasitology* 209:264–267.
- Alho, Ana Margarida, Clara Lima, Maria Stefania Latrofa, Vito Colella, Silvia Ravagnan, Gioia Capelli, Luís Madeira De Carvalho, Luís Cardoso, și Domenico Otranto. 2017. „Molecular detection of vector-borne pathogens in dogs and cats from Qatar”. *Parasites and Vectors* 10:298.
- Allen, Kelly E., Yihang Li, Bernhard Kaltenboeck, Eileen M. Johnson, Mason V. Reichard, Roger J. Panciera, și Susan E. Little. 2008. „Diversity of Hepatozoon species in naturally infected dogs in the southern United States”. *Veterinary Parasitology* 154:220–225.
- Almeida, Aliny P., Arlei Marcili, Romario C. Leite, Fernanda A. Nieri-Bastos, Luísa N. Domingues, João Ricardo Martins, și Marcelo B. Labruna. 2012. „Coxiella symbiont in the tick Ornithodoros rostratus (Acari: Argasidae)”. *Ticks and Tick-borne Diseases* 3:203–206.
- Alvar, Jorge, Carmen Cañavate, Ricardo Molina, Javier Moreno, și Javier Nieto. 2004. „Canine leishmaniasis”. *Advances in Parasitology*.
- Alvar, Jorge, Sergio Yactayo, și Caryn Bern. 2006. „Leishmaniasis and poverty”. *Trends in Parasitology*.
- Andersson, Martin O., Conny Tolf, Paula Tamba, Mircea Stefanache, Gabriel Radbea, Franz Rubel, Jonas Waldenström, Gerhard Dobler, și Lidia Chițimia-Dobler. 2017. „Babesia, Theileria, and Hepatozoon species in ticks infesting animal hosts in Romania”. *Parasitology Research* 116:2291–2297.
- Andersson, Martin O., Conny Tolf, Paula Tamba, Mircea Stefanache, Jonas Waldenström, Gerhard Dobler, și Lidia Chitimia-Dobler. 2017. „Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania”. *Parasites and Vectors* 10:155.
- Arbune, Manuela și Michaela Dobre. 2015. „Dirofilariasis - An emergent human parasitosis in Romania”. *Acta Parasitologica*.
- Babeș, V. 1888. „Sur hemoglobiniere bacterienne du boeuf”. *Journal of the Röntgen Society*.
- Babeș, V. 1892. „L’etiologie d’une enzootie des moutons, denommee Carceag en Roumanie.” *C. R. Hebd. Acad. Sci* 115:359–361.
- Bailey, Timothy S., Abdolkarim Sohrabi, și Andstuart S. Roberts. 1990. „Pulmonary coin lesions caused by Dirofilaria immitis”. *Journal of Surgical Oncology*.
- Baneth, Gad. 2011. „Perspectives on canine and feline hepatozoonosis”. *Veterinary Parasitology* 181:3–11.

- Baneth, Gad. 2018. „Antiprotozoal treatment of canine babesiosis”. *Veterinary Parasitology*.
- Baneth, Gad, Gillian Dank, Ephraim Keren-Kornblatt, Eliezer Sekeles, Irit Adini, Carol L. Eisenberger, Lionel F. Schnur, Roni King, și Charles L. Jaffe. 1998. „Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59:722-25.
- Baneth, Gad, Michael Samish, și Varda Shkap. 2007. „LIFE CYCLE OF HEPATOOZON CANIS (APICOMPLEXA: ADELEORINA: HEPATOOZOIDAE) IN THE TICK RHIPICEPHALUS SANGUINEUS AND DOMESTIC DOG (CANIS FAMILIARIS)”. *Journal of Parasitology*.
- Baneth, Gad, Alina Sheiner, Osnat Eyal, Shelley Hahn, Jean Pierre Beaufile, Yigal Anug, și Dalit Talmi-Frank. 2013. „Redescription of Hepatozoon felis (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission”. *Parasites and Vectors* 6:102.
- Baptista-Fernandes, Teresa, Manuel Rodrigues, Dulce Domingues, Lucília Monteiro, Paulo Paixão, Patrícia Pereira, Raquel Tavares, Paulo Rodrigues, Isabel Maurício, Silvana Belo, și Cristina Toscano. 2015. „Dirofilariasis by dirofilaria repens: An imported case and a brief review”. *Parasitology International*.
- Bhang, Dong Ha, Ul Soo Choi, Hyun Jeong Kim, Kyoung Oh Cho, Sung Shik Shin, Hee Jeong Youn, Cheol Yong Hwang, și Hwa Young Youn. 2013. „An autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Korea”. *Korean Journal of Parasitology*.
- Borja-Cabrera, G. P., F. N. Santos, F. B. Santos, Fernando Antonio de A. Trivellato, Jarbas Kiyoshi A. Kawasaki, Andreia Cerqueira Costa, Tatiana Castro, F. S. Nogueira, M. A. B. Moreira, M. C. R. Luvizotto, M. Palatnik, și C. B. Palatnik-de-Sousa. 2010. „Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune® vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis”. *Vaccine*.
- Bottero, E., M. Poggi, și M. Viglione. 2006. „Papular lesions secondary to Leishmania spp. in eight young dogs Lesioni papulari indotte da Leishmania spp. in 8 cani giovani”. *Veterinaria (Cremona)*.
- Boucheikhchoukh, Mehdi, Maureen Laroche, Atef Aouadi, Loubna Dib, Ahmed Benakhla, Didier Raoult, și Philippe Parola. 2018. „MALDI-TOF MS identification of ticks of domestic and wild animals in Algeria and molecular detection of associated microorganisms”. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
- Bowman, Dwight. 2013a. „Georgis' Parasitology for Veterinarians”. Pp. 110-11.
- Bowman, Dwight. 2013b. „Georgis' Parasitology for Veterinarians”. Pp. 212-19.
- Burton, Bogitsh, Clint Carter, și Thomas Oeltmann. 2018. *Human Parasitology*.
- Camacho, A. Tomas, F. Javier Guitian, Estrella Pallas, Juan Jesus Gestal, A. Sonia Olmeda, Heidi K. Goethert, Sam R. Telford, și Andrew Spielman.

2004. „Azotemia and mortality among Babesia microti-like infected dogs”. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
- Campbell, Peter M. 2005. „Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling”. *Systematic Entomology*.
- Cancrini, G. și S. Gabrielli. 2007. „Vectors of Dirofilaria immitis: biology, behaviour and host/parasite relationships”. *Mappe Parasitologiche*.
- Capelli, Gioia, Claudio Genchi, Gad Baneth, Patrick Bourdeau, Emanuele Brianti, Luís Cardoso, Patrizia Danesi, Hans Peter Fuehrer, Alessio Giannelli, Angela Monica Ionică, Carla Maia, David Modrý, Fabrizio Montarsi, Jürgen Krücken, Elias Papadopoulos, Dušan Petrić, Martin Pfeffer, Sara Savić, Domenico Otranto, Sven Poppert, și Cornelia Silaghi. 2018. „Recent advances on Dirofilaria immitis in dogs and humans in Europe”. *Parasites and Vectors*.
- Cazan, Cristina Daniela, Ioana Raluca Păstrav, Adriana Györke, Gizem Oguz, Bulent Alten, și Andrei Daniel Mihalca. 2019. „Seasonal dynamics of a population of Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi Parrot, 1930 (Diptera: Psychodidae) in North-Eastern Romania”. *Parasitology Research*.
- Cazan, Cristina Daniela, Ioana Raluca Păstrav, Angela Monica Ionică, Gizem Oguz, Ozge Erisoz Kasap, Vit Dvorak, Petr Halada, Mirabela Oana Dumitrache, Petr Volf, Bulent Alten, și Andrei Daniel Mihalca. 2019. „Updates on the distribution and diversity of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Romania”. *Parasites & Vectors* 12:247.
- Cîmpan, Andrei Alexandru, Anastasia Diakou, Elias Papadopoulos, și Liviu Miron. 2019. „SEROLOGICAL STUDY OF EXPOSURE TO LEISHMANIA IN DOGS LIVING IN SHELTERS, IN SOUTH-EAST ROMANIA”. *Rev Rom Med Vet* 29(3).
- Cimpan, Andrei Alexandru, Yaarit Nachum-Biala, Bar Ben-Shitrit, Liviu Miron, și Gad Baneth. 2020. „Epidemiological Study of Canine Babesiosis and Hepatozoonosis in the South of Romania”. *Acta Parasitologica*.
- Cîmpan, Andrei Alexandru, Yaarit Nachum-Biala, Liviu Miron, și Gad Baneth. 2019. „Epidemiological Study of Canine Leishmaniosis in the South of Romania”. *Proceedings of the Int.Sci.Congress „Life sciences, a challenge for the future”* 476-81.
- Ciucă, Lavinia, Vincenzo Musella, Liviu D. Miron, Maria Paola Maurelli, Giuseppe Cringoli, Antonio Bosco, și Laura Rinaldi. 2016. „Geographic distribution of canine heartworm (Dirofilaria immitis) infection in stray dogs of eastern Romania”. *Geospatial Health* 11(3):318-23.
- Ciuca, Lavinia, Fernando Simón, Laura Rinaldi, Laura Kramer, Marco Genchi, Giuseppe Cringoli, Dumitru Acatrinei, Liviu Miron, și Rodrigo Morchon. 2018. „Seroepidemiological survey of human exposure to Dirofilaria spp. in Romania and Moldova”. *Acta Tropica*.
- COMAN, SOFIA, B. BACESCU, T. COMAN, GHE. PARVU, CRISTINA DINU, T. PETRUT, N. BERCARU, și ADRIANA AMFIM. 2007.

- „EPIDEMIOLOGICAL AND PARACLINICAL ASPECTS IN CANINE DIROFILOARIOSIS”. *LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ, TIMISOARA* VOL. XL.
- Costa, Carlos Henrique Nery. 2011. „How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy”. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.
- Cruz, Israel, Lucrecia Acosta, Mariana N. Gutiérrez, Javier Nieto, Carmen Cañavate, Jorge Deschutter, și Fernando J. Bornay-Llinares. 2010. „A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina)”. *BMC Infectious Diseases*.
- Dami, A. M., I. V. Olovi, V. S. Arsi-Arsenijevi, S. Stepanovi, I. Borii, Z. Dami, S. M. Mitrovi, D. M. Rai, I. Stefanovi, Z. Latkovi, și I. F. Kranji-Zec. 2009. „Human *Dirofilaria repens* infection in Serbia”. *Journal of Helminthology* 83(2):129-37.
- DANCESCO, PAUL. 2008. „LES ESPÈCES DE PHLÉBOTOMES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) DE ROUMANIE, CERTAINS ASPECTS DE LEUR ÉCOLOGIE ET NOUVELLES STATIONS DE CAPTURE”. *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle «Grigore Antipa»* LI:185–199.
- Dantas-Torres, Filipe. 2007. „The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*”. *Veterinary Parasitology* 149:139–146.
- Dantas-Torres, Filipe, Laia Solano-Gallego, Gad Baneth, Vitor Marcio Ribeiro, Milena de Paiva-Cavalcanti, și Domenico Otranto. 2012. „Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences”. *Trends in Parasitology* 28:12.
- Daskalaki, Aikaterini Alexandra, Angela Monica Ionică, Georgiana Deak, Călin Mircea Gherman, Gianluca D’Amico, Ioana Raluca Păstrav, Ioana Adriana Matei, Cristian Domșa, și Andrei Daniel Mihalca. 2018. „Environmental factors influencing the distribution of “*Theileria annae*” in red foxes, *Vulpes vulpes* in Romania”. *Ticks and Tick-borne Diseases*.
- David, John R., Luisa M. Stamm, Haroldo Sergio Bezerra, Raimundo Nonato Souza, Robert Killick-Kendrick, și José Wellington Oliveira Lima. 2001. „Deltamethrin-impregnated Dog Collars Have a Potent Anti-feeding and Insecticidal Effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*”. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Day, Michael J. 2011. „One health: The importance of companion animal vector-borne diseases”. *Parasites and Vectors*.
- Desjeux, P. 2004. „Leishmaniasis: Current situation and new perspectives”. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
- Diakou, Anastasia, Elias Papadopoulos, și Kostantinos Lazarides. 2009. „Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece”. *Journal of Feline Medicine and Surgery*.
- Diarra, Adama Zan, Maureen Laroche, Franck Berger, și Philippe Parola. 2019.

- „Use of MALDI-TOF MS for the identification of Chad mosquitoes and the origin of their blood meal”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Díaz, Ricardo G., Karina A. Salvatierra, Gustavo A. Silva, Enrique J. Deschutter, Fernando J. Bornay-Llinares, și Lucrecia Acosta. 2019. „First molecular characterization of *Leishmania infantum* species in patients infected with visceral leishmaniasis in Misiones province, Argentina”. *Biomedica*.
- Dumitrache, Mirabela Oana, Yaarit Nachum-Biala, Matan Gilad, Viorica Mircean, Cristina Daniela Cazan, Andrei Daniel Mihalca, și Gad Baneth. 2016. „The quest for canine leishmaniasis in Romania: The presence of an autochthonous focus with subclinical infections in an area where disease occurred”. *Parasites and Vectors* 9:297.
- Duprey, Zandra H., Francis J. Steurer, Jane A. Rooney, Louis V. Kirchhoff, Joan E. Jackson, Edgar D. Rowton, și Peter M. Schantz. 2006. „Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003”. *Emerging Infectious Diseases*.
- Dzięgiel, Beata, Łukasz Adaszek, Tomasz Banach, și Stanisław Winiarczyk. 2016. „Specificity of mass spectrometry (MALDI-TOF) in the diagnosis of *Babesia canis* regarding to other canine vector-borne diseases”. *Annals of parasitology*.
- Farkas, Róbert, Viktória Mag, Mónika Gyurkovszky, Nóra Takács, Károly Vörös, și Norbert Solymosi. 2020. „The current situation of canine dirofilariosis in Hungary”. *Parasitology Research* 119(1):129–135.
- Farkas, Róbert, Norbert Solymosi, Nóra Takács, Ákos Hornyák, Sándor Hornok, Yaarit Nachum-Biala, și Gad Baneth. 2014. „First molecular evidence of *Hepatozoon canis* infection in red foxes and golden jackals from Hungary”. *Parasites and Vectors*.
- Fernandes, Ana Paula, Míriam Maria Silva Costa, Eduardo Antônio Ferraz Coelho, Marilene Suzan Marques Michalick, Eloísa de Freitas, Maria Norma Melo, Wagner Luiz Tafuri, Daniela de Melo Resende, Vinícius Hermont, Christiane de Freitas Abrantes, și Ricardo Tostes Gazzinelli. 2008. „Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein”. *Vaccine*.
- Francino, O., L. Altet, E. Sánchez-Robert, A. Rodriguez, L. Solano-Gallego, J. Alberola, L. Ferrer, A. Sánchez, și X. Roura. 2006. „Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis”. *Veterinary Parasitology* 137:214–221.
- Freitas, Marcus Valérius de Matos, Cristiane Ferreira da Luz Brun, Marcelo Campos Rodrigues, Georgia Brenda Barros Alves, Ariane Farias Leal, Esther Machado de Carvalho e Silva, Lucas Grolli, și Ana Maria Quessada. 2017. „Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil”. *Ciência Rural*.
- Gabrielli, Simona, Suzana Otašević, Aleksandra Ignjatović, Sara Savić, Maurizio

- Fraulo, Valentina Arsić-Arsenijević, Stefan Momčilović, și Gabriella Cancrini. 2015. „Canine Babesioses in Noninvestigated Areas of Serbia”. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 15:535–538.
- Găman, Amelia, Camelia Dobrea, și G. Găman. 2010. „A case of visceral leishmaniasis in oltenia region (Romania)”. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 51:391–394.
- Genchi, Claudio și Laura Helen Kramer. 2020. „The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World”. *Veterinary Parasitology*.
- Genchi, Claudio, L. Rinaldi, C. Cascone, M. Mortarino, și G. Cringoli. 2005. „Is heartworm disease really spreading in Europe?” în *Veterinary Parasitology*.
- Genchi, Claudio, Laura Rinaldi, Michele Mortarino, Marco Genchi, și Giuseppe Cringoli. 2009. „Climate and *Dirofilaria* infection in Europe”. *Veterinary Parasitology*.
- Georgieva, D., Z. Kirkova, și A. Ivanov. 2001. „A study on the incidence and diagnosis of dirofilariosis (heartworm disease) in carnivores”. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 4(4):231-36.
- Geurden, Thomas, Csilla Becskei, Robert H. Six, Steven Maeder, Maria Stefania Latrofa, Domenico Otranto, și Robert Farkas. 2018. „Detection of tick-borne pathogens in ticks from dogs and cats in different European countries”. *Ticks and Tick-borne Diseases*.
- Gheorghiuță, Mircea Ionuț, Mircea Cătălin Forțofoiu, Cristiana Iulia Dumitrescu, Daniela Dumitrescu, Adrian Camen, și Claudiu Mărgăritescu. 2017. „Intramuscular human dirofilaria repens infection of the temporal region – Case report and review of the literature”. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*.
- Gogoșe, M. G., I. Teodorescu, C. Preda, și S. C. Ionescu. 2013. „Two case reports on visceral leishmaniasis diagnosed in Romania.” *Roumanian archives of microbiology and immunology* 72:49.
- Gradoni, Luigi. 2015. „Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go”. *Veterinary Parasitology*.
- Greene, CE. 2012a. „Infectious Disease of the Dog and Cat.” Pp. 750–757 în Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Greene, CE. 2012b. „Infectious Diseases of the Dog and Cat.” Pp. 771-84 în Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Guo, Huanping, Ferda Sevinc, Onur Ceylan, Mutlu Sevinc, Ege Ince, Yang Gao, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Artemis Efstratiou, Guanbo Wang, Shinuo Cao, Mo Zhou, Charoonluk Jirapattharasate, Aaron Edmond Ringo, Weiqing Zheng, și Xuenan Xuan. 2017. „A PCR survey of vector-borne pathogens in different dog populations from Turkey”. *Acta Parasitologica* 62:533–540.
- Hamel, Dietmar, Cornelia Silaghi, Daniel Lescai, și Kurt Pfister. 2012. „Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp.” *Parasitology Research* 110:1537–1545.

- El Hamzaoui, Basma, Maureen Laroche, și Philippe Parola. 2019. „Detection of Bartonella spp. in Cimex lectularius by MALDI-TOF MS”. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
- Harizanov, Rumen N., Diana P. Jordanova, și Ivailo S. Bikov. 2014. „Some aspects of the epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of human dirofilariasis caused by Dirofilaria repens”. *Parasitology Research* 113(4):1571-79.
- Hasegawa, Masami, Hirohisa Kishino, și Taka aki Yano. 1985. „Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA”. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-74.
- Hlavackova, Kristyna, Vit Dvorak, Alexandra Chaskopoulou, Petr Volf, și Petr Halada. 2019. „A novel MALDI-TOF MS-based method for blood meal identification in insect vectors: A proof of concept study on phlebotomine sand flies”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Hodžic, Adnan, Naike Mrowietz, Rita Cézanne, Pia Bruckschwaiger, Sylvia Punz, Verena Elisabeth Habler, Valentina Tomsik, Judit Lazar, Georg G. Duscher, Walter Glawischnig, și Hans Peter Fuehrer. 2018. „Occurrence and diversity of arthropod-transmitted pathogens in red foxes (Vulpes vulpes) in western Austria, and possible vertical (transplacental) transmission of Hepatozoon canis”. *Parasitology*.
- Hornok, Sándor, Balázs Táncoz, Isabel G. Fernández de Mera, José de la Fuente, Regina Hofmann-Lehmann, și Róbert Farkas. 2013. „High prevalence of Hepatozoon-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of Rhipicephalus sanguineus”. *Veterinary Parasitology* 196:189–193.
- Imre, Mirela, Andreea Dudu, Marius S. Ilie, Sorin Morariu, Kálmán Imre, și Gheorghe Dărăbuș. 2015. „Molecular Survey of Hepatozoon canis in Red Foxes (Vulpes vulpes) from Romania”. *Journal of Parasitology* 101:490–491.
- Imre, Mirela, Róbert Farkas, Marius Ilie, Kálmán Imre, Ionela Hotea, Sorin Morariu, Doru Morar, și Gheorghe Dărăbuș. 2013. „Seroprevalence of Babesia canis infection in clinically healthy dogs from western Romania.” *The Journal of parasitology* 99:161–163.
- Imre, Mirela, Róbert Farkas, Marius Stelian Ilie, Kálmán Imre, și Gheorghe Dărăbuș. 2013. „Survey of babesiosis in symptomatic dogs from Romania: Occurrence of Babesia gibsoni associated with breed”. *Ticks and Tick-borne Diseases* 4:500–502.
- Infanger, Li Chun, Thomas A. Rocheleau, Lyric C. Bartholomay, Jody K. Johnson, Jeremy Fuchs, Stephen Higgs, Cheng Chen Chen, și Bruce M. Christensen. 2004. „The role of phenylalanine hydroxylase in melanotic encapsulation of filarial worms in two species of mosquitoes”. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.
- Ionică, Angela Monica, Ioana Adriana Matei, Gianluca D’Amico, Jana Ababii, Aikaterini Alexandra Daskalaki, Attila D. Sándor, Dorin Valter Enache, Călin Mircea Gherman, și Andrei Daniel Mihalca. 2017. „Filarioid

infections in wild carnivores: A multispecies survey in Romania”. *Parasites and Vectors*.

- Ionică, Angela Monica, Ioana Adriana Matei, Gianluca D’Amico, Aikaterini Alexandra Daskalaki, Jana Juránková, Dan Traian Ionescu, Andrei Daniel Mihalca, David Modrý, și CĂlin Mircea Gherman. 2016. „Role of golden jackals (*Canis aureus*) as natural reservoirs of *Dirofilaria* spp. in Romania”. *Parasites and Vectors*.
- Ionică, Angela Monica, Ioana Adriana Matei, Viorica Mircean, Mirabela Oana Dumitrache, Gianluca D’Amico, Adriana Györke, Nikola Pantchev, Giada Annoscia, Kateřina Albrechtová, Domenico Otranto, David Modrý, și Andrei Daniel Mihalca. 2014. „Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema reconditum* infections in dogs in Romania”. *Parasitology Research* 114(3):975-82.
- Ionică, Angela Monica, Ioana Adriana Matei, Viorica Mircean, Mirabela Oana Dumitrache, Gianluca D’Amico, Adriana Györke, Nikola Pantchev, Giada Annoscia, Kateřina Albrechtová, Domenico Otranto, David Modrý, și Andrei Daniel Mihalca. 2015. „Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema reconditum* infections in dogs in Romania”. *Parasitology Research*.
- Ionita, Mariana, Ioan Liviu Mitrea, Kurt Pfister, Dietmar Hamel, Catalin Marius Buzatu, și Cornelia Silaghi. 2012. „Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: A molecular approach”. *Parasitology Research* 110:1659–1664.
- Ionita, Mariana, Ioan Liviu Mitrea, Kurt Pfister, Dietmar Hamel, și Cornelia Silaghi. 2013. „Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania”. *Veterinary Parasitology* 196:71–76.
- Johnson, Nicholas. 2018. „Hepatozoon canis: Another unwelcome parasitic visitor to the UK”. *Veterinary Record*.
- Karagenc, Tulin Ilhan, Serdar Pasa, Gulcan Kirli, Murat Hosgor, Huseyin Bilgin Bilgic, Yavuz Hakan Ozon, Abidin Atasoy, și Hasan Eren. 2006. „A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey”. *Veterinary Parasitology* 135:113–119.
- Kaufmann, Christian, Francis Schaffner, Dominik Ziegler, Valentin Pflüger, și Alexander Mathis. 2012. „Identification of field-caught *Culicoides* biting midges using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry”. *Parasitology*.
- Khasnis, Atul A. și Mary D. Nettleman. 2005. „Global warming and infectious disease”. *Archives of Medical Research* 36:689–696.
- Killick-Kendrick, R. 1999. „The biology and control of Phlebotomine sand flies”. *Clinics in Dermatology*.
- Killick-Kendrick, R., M. Killick-Kendrick, C. Focheux, J. Dereure, M. P. Puech, și M. C. Cadiergues. 1997. „Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis”.

Medical and Veterinary Entomology.

- Killick-Kendrick, R., Y. Tang, M. Killick-Kendrick, D. K. Sang, M. K. Sirdar, L. Ke, R. W. Ashford, J. Schorscher, și R. H. Johnson. 1991. „The identification of female sandflies of the subgenus *Larrousius* by the morphology of the spermathecal ducts.” *Parassitologia*.
- Kirkova, Z., A. Ivanov, D. Georgieva, și P. Prelesov. 2008. „An update on dirofilariosis in dogs and wild canines in Bulgaria.” *Sbornik dokladi ot nauchnata konferentsiya: Traditsii i s'vremenhost v'v veterinarnata meditsina*.
- Knight, D. H. și J. B. Lok. 1998. „Seasonality of heartworm infection and implications for chemoprophylaxis.” *Clinical techniques in small animal practice*.
- Köster, L. S., R. G. Lobetti, și P. Kelly. 2015. „Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment.” *Veterinary Medicine: Research and Reports*.
- Kouam, Marc K., Anastasia Diakou, Vaia Kanzoura, Elias Papadopoulos, Alvin A. Gajadhar, și Georgios Theodoropoulos. 2010. „A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors”. *Veterinary Parasitology*.
- Koutinas, Alexander F., Zoe S. Polizopoulou, Manolis N. Saridomichelakis, Dimitrios Argyriadis, Anna Fytianou, și Katerina G. Plevraki. 1999. „Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996)”. *Journal of the American Animal Hospital Association*.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, și Koichiro Tamura. 2018. „MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms”. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-49.
- Kumsa, Bersissa, Maureen Laroche, Lionel Almeras, Oleg Mediannikov, Didier Raoult, și Philippe Parola. 2016. „Morphological, molecular and MALDI-TOF mass spectrometry identification of ixodid tick species collected in Oromia, Ethiopia”. *Parasitology Research*.
- Lawyer, Phillip, Mireille Killick-Kendrick, Tobin Rowland, Edgar Rowton, și Petr Volf. 2017. „Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae)”. *Parasite*.
- Lewis, D. J. 1982. „A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae)”. *Entomology series*.
- Licari, Elaine, Nóra Takács, Norbert Solymosi, și Róbert Farkas. 2017. „First detection of tick-borne pathogens of dogs from Malta”. *Ticks and Tick-borne Diseases*.
- Lupșe, M., V. Mircean, A. Cavasi, și AD Mihalca. 2014. „Recurrent subcutaneous human *Dirofilariosis* due to *Dirofilaria repens* after surgical removal of the worm and anthelmintic treatment”. *Parasites & Vectors*.
- Macarie, Sorin Simion, Cristina Dobre, Marilena-Cristina Suci, Angela-Monica

- Ionica, Mihai-Sorin Cernea, Paul Tarcău, și Flaviu Bodea. 2017. „Subconjunctival ocular filariasis -Case report-”. *Romanian Journal of Ophthalmology*.
- Maia, Carla și Luís Cardoso. 2015. „Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling”. *Veterinary Parasitology* 213:2-11.
- Manfredi, M. T., A. di Cerbo, și M. Genchi. 2007. „Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats”. *Mappe Parassitologiche*.
- Margalit Levi, Maayan, Yaarit Nachum-Biala, Roni King, și Gad Baneth. 2018. „A survey of *Babesia* spp. and Hepatozoon spp. in wild canids in Israel”. *Parasites and Vectors* 11:150.
- Maroli, M., M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel, și L. Gradoni. 2013. „Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern”. *Medical and Veterinary Entomology*.
- Maroli, M., V. Mizzoni, C. Siragusa, A. D’Orazi, și L. Gradoni. 2001. „Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy”. *Medical and Veterinary Entomology*.
- Maroli, Michele, Luca Rossi, Raffaella Baldelli, Gioia Capelli, Ezio Ferroglio, Claudio Genchi, Marina Gramiccia, Michele Mortarino, Mario Pietrobelli, și Luigi Gradoni. 2008. „The northward spread of leishmaniasis in Italy: Evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors”. *Tropical Medicine and International Health* 13:256-64.
- Martin, Virginie, Ioannis Vouldoukis, Javier Moreno, David McGahie, Sylvie Gueguen, și Anne Marie Cuisinier. 2014. „The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later”. *Veterinary Research*.
- Mazloumi Gavgani, A. S., M. H. Hodjati, H. Mohite, și C. R. Davies. 2002. „Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: A matched-cluster randomised trial”. *Lancet*.
- McCall, John W., Claudio Genchi, Laura H. Kramer, Jorge Guerrero, și Luigi Venco. 2008. „Chapter 4 Heartworm Disease in Animals and Humans”. *Advances in Parasitology*.
- Medlock, Jolyon M. și Steve A. Leach. 2015. „Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK”. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Mellmann, A., F. Bimet, C. Bizet, A. D. Borovskaya, R. R. Drake, U. Eigner, A. M. Fahr, Y. He, E. N. Ilina, M. Kostrzewa, T. Maier, L. Mancinelli, W. Moussaoui, G. Prévost, L. Putignani, C. L. Seachord, Y. W. Tang, și D. Harmsen. 2009. „High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria”. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Mirá, Guadalupe, Rocío Checa, Ana Montoya, Leticia Hernández, Diana Dado,

- și Rosa Gálvez. 2012. „Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain”. *Parasites and Vectors* 5:60.
- Mircean, Viorica, Mirabela Oana Dumitrache, Adriana Györke, Nikola Pantchev, Robert Jodies, Andrei Daniel Mihalca, și Vasile Cozma. 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*.
- Mircean, Viorica, Mirabela Oana Dumitrache, Mircea Mircean, Pompei Bolfa, Adriana Györke, și Andrei Daniel Mihalca. 2014. „Autochthonous canine leishmaniasis in Romania: Neglected or (re)emerging?” *Parasites and Vectors* 7:135.
- Miró, Guadalupe, Luis Cardoso, Maria Grazia Pennisi, Gaetano Oliva, și Gad Baneth. 2008. „Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two”. *Trends in Parasitology*.
- Miró, Guadalupe, Rosa Gálvez, Marta Mateo, Ana Montoya, Miguel Angel Descalzo, și Ricardo Molina. 2007. „Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog”. *Veterinary Parasitology*.
- Mitková, Barbora, Kristýna Hrazdilová, Gianluca D’Amico, Georg Gerhard Duscher, Franz Suchentrunk, Pavel Forejtek, Călin Mircea Gherman, Ioana Adriana Matei, Angela Monica Ionică, Aikaterini Alexandra Daskalaki, Andrei Daniel Mihalca, Jan Votýpka, Pavel Hulva, și David Modrý. 2017. „Eurasian golden jackal as host of canine vector-borne protists”. *Parasites and Vectors* 10:183.
- Mitková, Barbora, Kristýna Hrazdilová, Vladimír Steinbauer, Gianluca D’Amico, Andrei Daniel Mihalca, și David Modrý. 2016. „Autochthonous Hepatozoon infection in hunting dogs and foxes from the Czech Republic”. *Parasitology Research*.
- Modrý, David, Relja Beck, Kristýna Hrazdilová, și Gad Baneth. 2017. „A Review of Methods for Detection of Hepatozoon Infection in Carnivores and Arthropod Vectors”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
- Molina, R., C. Espinosa-Góngora, R. Gálvez, A. Montoya, M. A. Descalzo, M. I. Jiménez, D. Dado, și G. Miró. 2012. „Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*”. *Veterinary Parasitology*.
- Molina, R., G. Miró, R. Gálvez, J. Nieto, și M. A. Descalzo. 2006. „Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*”. *Veterinary Record*.
- Morchón, Rodrigo, E. Carretón, J. González-Miguel, și I. Mellado-Hernández. 2012. „Heartworm disease (*dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe - new distribution trends”. *Frontiers in Physiology* 3:196.
- Murata, Tomoaki, Yasuho Taura, Sanenori Nakama, Makoto Inoue, și Susumu Tateyama. 1993. „Vertical Transmission of *Hepatozoon canis* in Dogs”.

- Journal of Veterinary Medical Science* 55:867–868.
- Murugaiyan, Jayaseelan și Uwe Roesler. 2017. „MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, Parasites, and Vectors”. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
- Neghina, Raul, Adriana M. Neghina, Iosif Marincu, și Ioan Iacobiciu. 2010. „Malaria and the Campaigns Toward its Eradication in Romania, 1923–1963”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11:103-10.
- Øines, Øivind, Katarina Storli, și Hege Brun-Hansen. 2010. „First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway”. *Veterinary Parasitology* 171:350–353.
- Oliva, Gaetano, Javier Nieto, Valentina Foglia Manzillo, Silvia Cappiello, Eleonora Fiorentino, Trentina Di Muccio, Aldo Scalone, Javier Moreno, Carmen Chicharro, Eugenia Carrillo, Therese Butaud, Laurie Guegand, Virginie Martin, Anne Marie Cuisinier, David McGahie, Sylvie Gueguen, Carmen Cañavate, și Luigi Gradoni. 2014. „A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Olmeda, A. S., P. M. Armstrong, B. M. Rosenthal, B. Valladares, A. Del Castillo, F. De Armas, M. Miguelez, A. González, J. A. Rodríguez Rodríguez, A. Spielman, și S. R. Telford. 1997. „Short report: A subtropical case of human babesiosis”. *Acta Tropica* 67:229-34.
- Orihel, Thomas C. și Mark L. Eberhard. 1998. „Zoonotic filariasis”. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Otranto, Domenico, Gioia Capelli, și Claudio Genchi. 2009. „Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: Leishmaniosis vs. dirofilariosis”. *Parasites and Vectors* 2(Suppl 1):S2.
- Otranto, Domenico și Filipe Dantas-Torres. 2013. „The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health”. *Trends in Parasitology*.
- Otranto, Domenico, Filipe Dantas-Torres, Stefania Weigl, Maria Stefania Latrofa, Dorothee Stanneck, Donato Decapariis, Gioia Capelli, și Gad Baneth. 2011. „Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR”. *Parasites and Vectors* 4:55.
- Otranto, Domenico, Paola Paradies, Riccardo Paolo Lia, Maria Stefania Latrofa, Gabriella Testini, Cinzia Cantacessi, Norbert Mencke, Gianluca Galli, Gioia Capelli, și Dorothee Stanneck. 2007. „Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area”. *Veterinary Parasitology*.
- Pampiglione, S., F. Rivasi, G. Angeli, R. Boldorini, R. M. Incensati, M. Pastormerlo, M. Pavesi, și A. Ramponi. 2001. „Dirofilariosis due to *Dirofilaria repens* in Italy, an emergent zoonosis: Report of 60 new cases”. *Histopathology* 38(4):344-54.
- Pampiglione, Silvio și F. Rivasi. 2000. „Human dirofilariosis due to *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens*: An update of world literature from 1995 to 2000”.

Parassitologia.

- Pampiglione, Silvio, Francesco Rivasi, și Andrea Gustinelli. 2009. „Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: A critical analysis”. *Histopathology* 54(2):192-204.
- Pantchev, Nikola, Manuela Schnyder, Majda Globokar Vrhovec, Roland Schaper, și Ilia Tsachev. 2015. „Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria”. *Parasitology Research* 114:117-30.
- Pavel, Geta, Dorina Timofte, Diana Mocanu, Razvan Malancus, și Carmen Solcan. 2017. „Imported leishmaniasis in a dog in a sandfly-populated area in northeastern Romania”. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29:683-85.
- Perera, Modika R., Vivien A. Vanstone, și Michael G. K. Jones. 2005. „A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”. în *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.
- Poliana, Tudor, Mateescu Romanita, și Tudor Niculae. 2013. „Dirofilaria infection in dogs from Târgoviște area, Romania”. *Current Opinion in Biotechnology*.
- Popescu, Ioana, Irina Tudose, Paul Racz, Birgit Muntau, Calin Giurcaneanu, și Sven Poppert. 2012. „Human *Dirofilaria repens* Infection in Romania: A Case Report”. *Case Reports in Infectious Diseases*.
- Prins, Herbert H. T. și Iain J. Gordon. 2007. „Changes in global scale land use and its implications for nature conservation and emerging vector-borne diseases”. *Emerging Pests And Vector-borne Diseases In Europe*.
- Quinnell, R. J. și O. Courtenay. 2009. „Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis”. *Parasitology*.
- Radev, Valentin, N. Lalkovski, P. Zhelyazkov, T. Kostova, P. Sabev, N. Nedelchev, și R. Vassileva. 2016. „Prevalence of gastrointestinal parasites and dirofilaria spp. In stray dogs from some regions in bulgaria”. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 19(1):57-62.
- Reiter, P. 1998. „Aedes albopictus and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come?” *Journal of the American Mosquito Control Association*.
- Rishniw, Mark, Stephen C. Barr, Kenny W. Simpson, Marguerite F. Frongillo, Marc Franz, și Jose Luis Dominguez Alpizar. 2006. „Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction”. *Veterinary Parasitology* 135(3-4):303-14.
- Roberta CIOCAN, Gh. DĂRĂBUȘ, Olga JACSÓ, Éva FOK. 2010. „Detection of *Dirofilaria* spp. in Dogs by PCR”. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 67(2).
- Rojas, Alicia, Diana Rojas, Víctor M. Montenegro, și Gad Baneth. 2015.

- „Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica”. *Parasites and Vectors* 8(1).
- Romero, Gustavo A. S. și Marleen Boelaert. 2010. „Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Rosypal, Alexa C., Gregory C. Troy, Anne M. Zajac, Glenn Frank, și David S. Lindsay. 2005. „Transplacental Transmission of a North American Isolate of *Leishmania infantum* in an Experimentally Infected Beagle”. *Journal of Parasitology*.
- Santos, C., R. R. M. Paterson, A. Venâncio, și N. Lima. 2010. „Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”. *Journal of Applied Microbiology*.
- Sauer, Sascha și Magdalena Kliem. 2010. „Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria”. *Nature Reviews Microbiology*.
- Schnittger, Leonhard, Anabel E. Rodriguez, Monica Florin-Christensen, și David A. Morrison. 2012. „Babesia: A world emerging”. *Infection, Genetics and Evolution*.
- Sharma, Umakant și Sarman Singh. 2008. „Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control”. *Journal of Vector Borne Diseases*.
- Silva, Fabiana L., Raquel G. Oliveira, Teane M. A. Silva, Mariana N. Xavier, Ernane F. Nascimento, și Renato L. Santos. 2009. „Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis”. *Veterinary Parasitology*.
- Simón, Fernando, Mar Siles-Lucas, Rodrigo Morchón, Javier González-Miguel, Isabel Mellado, Elena Carretón, și Jose Alberto Montoya-Alonso. 2012. „Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic”. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Slocombe, J.O.D., Surgeoner, G. A. și B. Srivastava. 1989. „Determination of the heartworm transmission period and its use in diagnosis and control.” Pp. 19–26 în *Proceedings of the Heartworm Symposium '89*. American Heartworm Society, Washington, DC.
- Solano-Gallego, L., A. Koutinas, G. Miró, L. Cardoso, M. G. Pennisi, L. Ferrer, P. Bourdeau, G. Oliva, și G. Baneth. 2009. „Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis”. *Veterinary Parasitology* 165:1–18.
- Solano-Gallego, Laia, Ángel Sainz, Xavier Roura, Agustín Estrada-Peña, și Guadalupe Miró. 2016. „A review of canine babesiosis: The European perspective”. *Parasites and Vectors*.
- Stensvold, Christen Rune, Dua Al Marai, Lee O. Brie. Andersen, Karen Angeliki Krogfelt, Jørgen Skov Jensen, Kim Søholt Larsen, și Henrik Vedel Nielsen. 2015. „*Babesia* spp. and other pathogens in ticks recovered from domestic dogs in Denmark”. *Parasites and Vectors* 8:262.
- Strauss-Ayali, Dalit, Charles L. Jaffe, Ofer Burshtain, Liat Gonen, și Gad Baneth.

2004. „Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs”. *The Journal of Infectious Diseases* 189:1729–1733.
- Tabar, M. D., X. Roura, O. Francinoy, L. Altety, și R. Ruiz De Gopegui. 2008. „Detection of *leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank”. *Journal of Small Animal Practice*.
- Tahir, Djamel, Lionel Almeras, Marie Varloud, Didier Raoult, Bernard Davoust, și Philippe Parola. 2017. „Assessment of MALDI-TOF mass spectrometry for filariae detection in *Aedes aegypti* mosquitoes”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Tamura, Koichiro. 1992. „Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases.” *I. Molecular Biology and Evolution* 9:678-87.
- Tánczos, Balázs, Nándor Balogh, László Király, Imre Biksi, Levente Szeredi, Monika Gyurkovsky, Aldo Scalone, Eleonora Fiorentino, Marina Gramiccia, și Róbert Farkas. 2012. „First Record of Autochthonous Canine Leishmaniasis in Hungary”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12:588-94.
- Tandina, Fatalmoudou, Sirama Niaré, Maureen Laroche, Abdoulaye K. Koné, Adama Z. Diarra, Abdoulaye Ongoiba, Jean Michel Berenger, Ogobara K. Doumbo, Didier Raoult, și Philippe Parola. 2018. „Using MALDI-TOF MS to identify mosquitoes collected in Mali and their blood meals”. *Parasitology*.
- Tasić-Otašević, Suzana;, Marija; Trenkić Božinović, Simona; Gabrielli, și Claudio Genchi. 2015. „Canine and human *Dirofilaria* infections in the Balkan Peninsula”. *Veterinary Parasitology*.
- Tasić-Otašević, Suzana A., Simona V. Gabrielli, Aleksandar V. Tasić, Nataša L. Miladinović-Tasić, Jovana T. Kostić, Aleksandra M. Ignjatović, Lidija D. Popović Dragonjić, Zoran G. Milošević, Valentina S. Arsić-Arsenijević, și Gabriella A. Cancrini. 2014. „Seroreactivity to *Dirofilaria* antigens in people from different areas of Serbia”. *BMC Infectious Diseases* 14(1).
- Tasić, Aleksandar, Luca Rossi, Suzana Tasić, Natasa Miladinović-Tasić, Tamara Ilić, și Sanda Dimitrijević. 2008. „Survey of canine dirofilariasis in Vojvodina, Serbia”. *Parasitology Research* 103(6):1297-1302.
- Tasić, Aleksandar, Suzana Tasić-Otašević, Simona Gabrielli, Nataša Miladinović-Tasić, Aleksandra Ignjatović, Jovana Đorđević, Sanda Dimitrijević, și Gabriella Cancrini. 2012. „Canine *Dirofilaria* Infections in Two Uninvestigated Areas of Serbia: Epidemiological and Genetic Aspects”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12(12):1031-35.
- Tasić, S., N. Stoiljković, N. Miladinović-Tasić, A. Tasić, D. Mihailović, L. Rossi, S. Gabrielli, și G. Cancrini. 2011. „Subcutaneous *Dirofilariosis* in South-East Serbia-Case Report”. *Zoonoses and Public Health* 58(5):318-22.
- Tiškina, Valentina și Pikka Jokelainen. 2017. „Vector-borne parasitic infections in dogs in the Baltic and Nordic countries: A questionnaire study to

- veterinarians on canine babesiosis and infections with *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*". *Veterinary Parasitology* 244:7-11.
- Tomazatos, Alexandru, Daniel Cadar, Edina Török, Iulia Maranda, Cintia Horváth, Lujza Keresztes, Marina Spinu, Stephanie Jansen, Hanna Jöst, Jonas Schmidt-Chanasit, Egbert Tannich, și Renke Lühken. 2018. „Circulation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in the Danube Delta Biosphere Reserve, Romania". *Parasites and Vectors*.
- Tsakmakidis, Ioannis, Katerina Angelopoulou, Chrysostomos I. Dovas, Emmanouil Dokianakis, Androniki Tamvakis, Isaia Symeonidou, Maria Antoniou, și Anastasia Diakou. 2017. „Leishmania infection in rodents in Greece". *Tropical Medicine and International Health*.
- Tsatchev, Illia, Ioannis D. Kyriazis, Sofia Boutsini, Evdokia Karagouni, și Eleni Dotsika. 2010. „First report of canine visceral leishmaniasis in Bulgaria". *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 34:465-69.
- Vaselek, Slavica, Nazli Ayhan, Gizem Oguz, Ozge Erisoz Kasap, Sara Savić, Trentina Di Muccio, Luigi Gradoni, Yusuf Ozbel, Bulent Alten, și Dušan Petrić. 2017. „Sand fly and *Leishmania* spp. survey in Vojvodina (Serbia): First detection of *Leishmania infantum* DNA in sand flies and the first record of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908". *Parasites and Vectors*.
- Vojta, Lea, Vladimir Mrljak, Snježana Ćurković, Tatjana Živičnjak, Albert Marinculić, și Relja Beck. 2009. „Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia". *International Journal for Parasitology* 39:1129–1136.
- Vucaj Cirilovic, Viktorija, Mirjana Dobrosavljev, Dijana Niciforovic, Daniela Donat, Dragana Bogdanovic-Stojanovic, și Mirela Jukovic. 2014. „Dirofilariasis of the breast: Sonographic appearance". *Journal of Clinical Ultrasound* 42(7):433-35.
- Wongkamchai, Sirichit, Nuntiya Monkong, Pakpimom Mahannol, Piyanan Taweethavonsawat, Sumat Loymak, și Suporn Foongladda. 2013. „Rapid detection and identification of *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Dirofilaria immitis* by high-resolution melting assay." *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 13(1):31-36.
- Yssouf, Amina, Christophe Flaudrops, Rezak Drali, Tahar Kernif, Cristina Socolovschi, Jean Michel Berenger, Didier Raoult, și Philippe Parola. 2013. „Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors". *Journal of Clinical Microbiology*.
- Zurita, A., R. Djeghar, R. Callejón, C. Cutillas, P. Parola, și M. Laroche. 2019. „Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a useful tool for the rapid identification of wild flea vectors preserved in alcohol". *Medical and Veterinary Entomology*.

ANEXA I
LISTĂ DE ABREVIERI
ABBREVIATIONS

- ADN** – acid dezoxiribonucleic (deoxyribonucleic acid)
- BLAST** – program de căutare și analiză pentru secvențele de baze azotate (Basic Local Alignment Search Tool)
- EDTA** – acid etilendiaminetetraacetic (ethylenediaminetetraacetic acid)
- ELISA** – testul imunoenzimatic (enzyme-linked immunosorbent assay)
- IgG** – Imunoglobulina G (Immunoglobulin G)
- ABTS** – acid 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonat (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))
- PBS** – tampon fosfat salin (phosphate buffered saline)
- PCR** – reacție de polimerizare în lanț (polymerase chain reaction)
- qPCR** – reacție de polimerizare în lanț cu detecție în timp real (quantitative real-time PCR)
- HRP** – peroxidază din hrean (horseradish peroxidase)
- DDT** – diclor-difenil-triclorețanul (dichloro-diphenyl-trichloroethane)
- HCH** – hexaclorociclohexan (hexachlorocyclohexane)
- DOPA** – 3,4-dihidroxifenilalanina (3,4-dihydroxyphenylalanine)
- apă HPLC** – apă destinată cromatografiei de lichide de înaltă performanță (high-performance liquid chromatography water)
- bp** – perechi de baze azotate (base pairs)
- FML** – ligand fructoză-manoză (fructose-manose ligand)

ANEXA II
LISTA TABELELOR
LIST OF TABLES

Tabel 1.1: Tabelul reprezintă speciile de leishmania ce afectează câinii, distribuția geografică și vectorii ce transmit fiecare specie de leishmania. Cu excepția <i>Leishmania arabica</i> , toate speciile au potențial zoonotic dar câinele este considerat un rezervor important doar pentru <i>Leishmania infantum</i> (Dantas-Torres et al. 2012) / Table 1.1: The table presents all leishmania species that infect dogs. The geographic distribution and the competent vector is presented for each species as well. With the exception of <i>Leishmania arabica</i> , all species are zoonotic but the dog is only considered the main reservoir for <i>Leishmania infantum</i> (Dantas-Torres et al. 2012).....	2
Tabel 5.1: Numărul de probe colectate pe județ și oraș / Table 5.1: The number of samples collected per each county and town.....	35
Tabel 5.2: Program Real-time qPCR descris de (Francino et al. 2006) pentru amorsele LEISH-1 și LEISH-2 / Table 5.2: The qPCR cycle described by (Francino et al. 2006), for the primers LEISH-1 and LEISH-2.....	38
Tabel 6.1: Seroprevalența infecțiilor cu <i>Leishmania infantum</i> in cele două județe / Table 6.1: The seroprevalence of <i>Leishmania infantum</i> infections in the two counties.....	45
Tabel 7.1: Rezultatul reacției PCR pentru piroplasmide pe orașe și județe / Table 7.1: Positive samples for the piroplasmid PCR, per county and town.....	53
Tabel 7.2: Prevalența infecțiilor cu <i>Hepatozoon canis</i> pe oraș și pe județ. Diferența statistică între prevalențele din orașele de unde au fost recoltate probe / Table 7.2: The prevalence of <i>Hepatozoon canis</i> per county and city. The statistical difference between the prevalence in the sampling locations.....	54
Tabel 7.3: Prevalența infecțiilor cu <i>Babesia</i> spp. pe oraș și pe județ și coinjecțiile cu <i>Hepatozoon canis</i> și <i>Babesia</i> spp. Diferența statistică între prevalențele din orașele de unde au fost recoltate probe / Table 7.3: The prevalence of <i>Babesia</i> spp. per county and city and the coinfections with <i>Hepatozoon canis</i> and <i>Babesia</i> spp. The statistical difference between the prevalence in the sampling locations.....	55
Tabel 8.1: Program RT-PCR descris de (Wongkamchai et al. 2013) și modificat de (Rojas et al. 2015) / Table 8.1: RT-PCR cycles as described by (Wongkamchai et al. 2013) and modified by (Rojas et al. 2015).....	68

Tabel 8.2: Program PCR clasic descris de (Rishniw et al. 2006) pentru amorsele non specifice DIDR-F1 și DIDR-R1 / Table 8.2: PCR cycles as described by (Rishniw et al. 2006), using the non-specific primers DIDR-F1 and DIDR-R1..68	68
Tabel 8.3: Lungimea secvenței amplificate pentru fiecare parazit în baze azotate obținute cu tehnica descrisă de (Rishniw et al. 2006) pentru amorsele non specifice DIDR-F1 și DIDR-R1 / Table 8.3: The length of each PCR product using the technique described by (Rishniw et al. 2006) and the non-specific primers DIDR-F1 and DIDR-R1.....69	69
Tabel 8.4: Program PCR clasic descris de (Rishniw et al. 2006) pentru amorsele specifice pentru <i>Dirofilaria immitis</i> , <i>Dirofilaria repens</i> și <i>Acanthocheilonema reconditum</i> / Table 8.4: PCR cycle as described by (Rishniw et al. 2006), using the species specific primers for <i>Dirofilaria immitis</i> , <i>Dirofilaria repens</i> și <i>Acanthocheilonema reconditum</i>69	69
Tabel 8.5: Prevalența infecțiilor cu <i>Dirofilaria repens</i> , <i>Dirofilaria immitis</i> și <i>Acanthocheilonema reconditum</i> în sudul României. Infecțiile sunt separate pe județe și pe orașe / Table 8.5: The prevalence of infections with <i>Dirofilaria repens</i> , <i>Dirofilaria immitis</i> și <i>Acanthocheilonema reconditum</i> in the south of Romania. The infections are separated by counties.....75	75

ANEXA III
LISTA FIGURILOR
LIST OF FIGURES

Figura 1.1: (a) Stadiul larval al flebotomului *Phlebotomus perniciosus* (Maroli et al. 2013) **(b)** Reprezentare grafică a ciclului vital al flebotomilor (Burton et al. 2018) / **Figure 1.1: (a)** The larval stage of *Phlebotomus perniciosus* (Maroli et al. 2013) **(b)** The graphical representation of the sandfly life cycle (Burton et al. 2018).....4

Figura 1.2: Împerecherea a doi flebotomi adulți *Phlebotomus duboscqi*. Se poate observa în dreapta flebotomul mascul cu abdomenul mai subțire ce se folosește de organul genital extern pentru a fixa și copula femela (Lawyer et al. 2017) / **Figure 1.2:** Two adult *Phlebotomus duboscqi* can be observed mating. The male can be observed to the right, with narrow abdomen and using the external copulatory organ to mate the female (Lawyer et al. 2017).....5

Figura 1.3: Câine din vestul Greciei cu semne clinice specifice leishmaniozei: cașexie, limfadenopatie, ulcerări la nivelul urechii și leziuni specifice cu alopecie în zona perioculară (original) / **Figure 1.3:** Dog from the west of Greece manifesting clinical signs specific for leishmaniosis: cachexia, lymphadenomegaly, skin ulcerations on the ear, specific lesions with alopecia in the periocular region (original).....9

Figura 1.4: Keratoconjunctivită și secreții oculare mucopurulente la un câine cu leishmanioză viscerală (Freitas et al. 2017) / **Figure 1.4:** Keratoconjunctivitis and mucopurulent discharge in a dog with visceral leishmaniosis (Freitas et al. 2017).....11

Figura 2.1: Reprezentare grafică a ciclului paraziților din genul *Babesia* (Sz)=sporozoiți, (T)=trofozoiți, (M)=merozoiți, (G)=pregametociți, (Sk)=microși macro-gameți, (Z)=zigotul, (Sg)=glande salivare, (Ts)= transmitere transstadială (To)= transmiterea trans-ovariană. Toate etapele marcate cu litere în figură sunt descrise în textul de mai sus (Schnittger et al. 2012) / **Figure 2.1:** Graphical representation of the *Babesia* spp. life cycle (Sz)= sporozoites, (T)=trophozoites, (M)= merozoites, (G)=pregametocytes, (Sk)=microgametes and macrogametes, (Z)=zygote, (Sg)=salivary glands, (Ts)= transstadial transmission, (To)= transovarial transmission. All stages of the cycle, marked by letters in the figure are described in the text above (Schnittger et al. 2012).....14

Figura 3.1: (a) Meront al parazitului *Hepatozoon canis* din splină, ce conține mai mulți micromerozoiți colorația hematoxilină-eozină (x 400) **(b)** Meront al parazitului *Hepatozoon canis* din splină, ce conține trei macromerozoiți colorația

hematoxilină-eozină (x 400) (Greene 2012a) / **Figure 3.1:** (a) *Hepatozoon canis* meront containing micromerozoites from splenic tissue (Hematoxylin-Eosin staining, x 400) (b) *Hepatozoon canis* meront containing three macromerozoites in splenic tissue (Hematoxylin-Eosin staining, x 400) (Greene 2012a).....18

Figura 3.2: Reprezentarea grafică a ciclului vieții parazitului *H. canis* în gazda intermediară și gazda definitivă. Este marcat numărul de zile din momentul infecției nimfei. (A) Gameții fuzionează. (B) Oochist imatur. (C) Oochist în dezvoltare. (D) Oochist matur în hemocel. (E) Meront în măduvă. (F) Meront ce conține mai mulți micromerozoți. (G) Meront ce conține doi macromerozoți. (H) Macromerozoți liberi în măduva osoasă. (I) Micromerozoți în măduva osoasă (J) Micromerozoți cea au penetrat un neutrofil și s-au transformat într-un gameți (K) Gamont matur în sângele periferic (Baneth et al. 2007) / **Figure 3.2:** Sequence of events during experimental infection with *H. canis*. Days from infection of nymph ticks are marked on the circumference of the circle. (A) Association of gamonts in syzygy. (B) Early oocyst. (C) Developing oocyst. (D) Mature oocyst in the tick hemocoel. (E) Early meront in the bone marrow. (F) Meront containing micromerozoites aligned in a circle around a basal material mass. (G) Meront containing 2 macromerozoites. (H) Free macromerozoite in the bone marrow. (I) Free micromerozoite in the bone marrow. (J) Micromerozoite after penetration into neutrophil and during transformation to gamont. (K) Mature gamont in the peripheral blood (Baneth et al. 2007).....19

Figura 3.3: (a) Gamont de *Hepatozoon canis* într-un neutrofil. Frotiu cu sânge de la câine cu o colorație Giemsa (x 1000) (b) Un frotiu cu sânge de la câine și cu o colorație Giemsa. Câinele avea o parazitemie ridicată și prezenta neutrofilie iar în frotiu se observă o aglomerare de neutrofile ce conțin meronți de *Hepatozoon canis* (x 1000) (Greene 2012a) / **Figure 3.3:** (a) *Hepatozoon canis* gamont in the cytoplasm of a neutrophil on a Giemsa-stained blood smear (x 1000) (b) A Giemsa-stained blood smear from a dog with leukocytosis and a high *Hepatozoon canis* parasitemia. Almost all of the neutrophils are parasitized with gamonts (x 1000) (Greene 2012a).....20

Figura 3.4: Harta distribuției infecțiilor cu *Hepatozoon americanum* și *Hepatozoon canis* (Greene 2012a) / **Figure 3.4:** A map of the reported geographic distributions of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* (Greene 2012a).....21

Figura 4.1: Ciclul vital al parazitului *Dirofilaria immitis* în gazda definitivă, vertebrată. Ciclul durează 6.5 luni și depinde de maturarea microfiliariilor, într-un țânțar ce este vector, până la stadiu de larvă L3. Această maturare este dependentă

de temperatura externă. **1:** țânțarii ingera microfilariei înțepând câini infectați, **2:** microfilariele se transformă în larve L3 în interiorul țânțarului **3:** țânțarii infectați depun larvele L3 pe pielea animalului după hrănire **4:** larvele L3 pătrund în corpul câinelui prin leziune și se transformă în larve L5 **5:** larvele L5 ajung în sistemul circulator și embolizează la nivelul arterelor pulmonare **6:** ciclul este încheiat după 6.5 luni, când vor fi produse noi microfilarii (Knight și Lok 1998) / **Figure 4.1:** The life cycle of *Dirofilaria immitis* in the mammalian host. The cycle lasts 6.5 months and transmission depends on the temperature- dependent maturation of microfilaria to L3 larva, in a vector-competent mosquito. 1: the mosquito bites the microfilaremic dog and ingests the microfilaria **1:** mosquitoes ingest the microfilaria by biting microfilaremic dogs, **2:** the microfilaria transform in L3 larvae inside the mosquito, **3:** the infected mosquito deposit the L3 larva in the skin while biting the vertebrate host, **4:** the L3 larva enter through the bite wound and mature inside the tissue to the stage of L5, **5:** L5 larva penetrate the systemic veins and embolize in the pulmonary arteries **6:** the life cycle is completed after approximately 6.5 months, when new microfilaria are produced (Knight și Lok 1998).....26

Figură 5.1: Puncte de recoltare a probelor: Drobeta-Turnu Severin (44°37'53.9"N 22°37'55.2"E), Craiova (44°20'32.4"N 23°43'02.6"E), Roșiorii de Vede (44°07'04.8"N 24°59'58.5"E), Alexandria (43°57'14.5"N 25°20'43.6"E) și Slobozia (44°34'18.1"N 27°20'51.4"E) / **Figure 5.1: The locations of the samplings sites:** Drobeta-Turnu Severin (44°37'53.9"N 22°37'55.2"E), Craiova (44°20'32.4"N 23°43'02.6"E), Roșiorii de Vede (44°07'04.8"N 24°59'58.5"E), Alexandria (43°57'14.5"N 25°20'43.6"E) și Slobozia (44°34'18.1"N 27°20'51.4"E).....34

Figura 5.2: (a) capcana tip "CDC light trap", se poate observa sursa de lumină, cilindrul ce conține ventilatorul și plasa **(b), (c)** capcanele amplasate la adăposturile din Roșiorii de Vede și Slobozia / **Figure 5.2: (a)** CDC light trap that contains an incandescent light bulb that lures the insects and the cylinder below contains the fan that directs the insects in the net **(b), (c)** the light traps placed at the sampling locations of Roșiorii de Vede and Slobozia.....35

Figura 6.1: Harta evidențiază locația celor două adăposturi. Județele sunt scoase în evidență iar stelele marchează poziția orașelor / **Figure 6.1:** The map marks the locations of the sampling sites and highlights the corresponding counties....41

Figura 7.1: Ampliconii PCR a 5 din cele 300 de probe analizate folosind amorsele PIROA și PIROB. La pozițiile "M" marcatori moleculari, "nc" și "ntc" sunt controalele negative, "HEP" (~400bp) și "BAB" (~350bp) sunt controalele

pozitive pentru *Hepatozoon* spp. și *Babesia* spp.. Probele 1 și 2 sunt pozitive pentru *Hepatozoon* spp., probele 3 și 5 sunt negative iar proba 4 este coinfectată cu *Hepatozoon* spp. și *Babesia* spp. / **Figure 7.1:** PCR products of 5 out of 300 de samples analysed using the PIROA and PIROB primers. “M” are the molecular markers, “nc” and “ntc” are the negative control and the negative template control, “HEP” (~400bp) și “BAB” (~350bp) are the positive controls for *Hepatozoon* spp. and *Babesia* spp.. Samples 1 and 2 are positive for *Hepatozoon* spp., samples 3 and 5 are negative and sample 4 is coinfectated with *Hepatozoon* spp. and *Babesia* spp.....50

Figura 7.2: Studiul filogenetic se bazează pe ampliconul reacției PCR specifică pentru *Babesia* spp., de o dimensiune de 378 baze azotate și a fost făcut prin metoda „Maximum Likelihood” și bazat pe modelul Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al. 1985). Pentru studiul filogenetic a fost folosit programul MEGA X (Kumar et al. 2018). Secvențele înconjurată cu roșu aparțin studiului nostru / **Figure 7.2:** Phylogenetic tree of *Babesia* spp. based on a 378bp-long sequence of the 18S rRNA gene. The animal species from which sequences are derived and geographic locations are marked for each entry. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Hasegawa-Kishino-Yano model (Hasegawa et al. 1985). Sequences obtained in this study are marked with a diamond. Only bootstrap values above 80% are shown.....55

Figura 7.3: Studiul filogenetic se bazează pe ampliconul reacției PCR specifică pentru *Hepatozoon canis*, de o dimensiune de 505 baze azotate și a fost făcut prin metoda „Maximum Likelihood” și bazat pe modelul Tamura 3-parameter (Tamura 1992). Pentru studiul filogenetic a fost folosit programul MEGA X (Kumar et al. 2018). Secvențele înconjurată cu roșu aparțin studiului nostru / **Figure 7.3:** Phylogenetic tree of *Hepatozoon canis* based on a 505bp-long sequence of the 18S rRNA gene. The animal species from which sequences are derived and geographic locations are marked for each entry. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Tamura 3-parameter model (Tamura 1992). Sequences obtained in this study are marked with diamond. Only bootstrap values above 80% are shown.....56

Figura 8.1: (a) Caz de dirofilarioză umană, cauzată de *Dirofilaria repens*, cu localizare subconjunctivală din anul 2013. Pacientul provenea din Galați (sud-estul României), de sex feminin, avea 16 ani și locuia în mediu rural (Arbune și Dobre 2015). (b) Extracția chirurgicală a unei larve de *Dirofilaria repens* de la un pacient de 54 de ani, sex feminin, ce provine dintr-o zonă rurală, din județul

Sălaj (nord-vestul României) (Macarie et al. 2017) / **Figure 8.1: (a)** One case of human dirofilariasis, with subconjunctival localization, from 2013 caused by *Dirofilaria repens*. The patient is female, lived in a rural area, has 16 years, and is from Galați (south-east of Romania) (Arbune și Dobre 2015). **(b)** The surgical extraction of a *Dirofilaria repens* larvae, from a 54 year, female patient, from a rural area, from Sălaj county (north-west of Romania)(Macarie et al. 2017).....63

Figura 8.2: Parte a secvenței *Dirofilaria repens* obținute în urma analizei PCR folosind amorsele non specifice DIDR-F1 și DIDR-R1 și programul PCR clasic descris de (Rishniw et al. 2006). Proba provine de la un câine din comunitar din Drobeta Turnu-Severin / **Table 8.2:** Part of a nucleotide sequence of *Dirofilaria repens* obtained using the PCR technique as described by (Rishniw et al. 2006), and using the non-specific primers DIDR-F1 and DIDR-R1. This sample was obtained from a stray dog from the town Drobeta Turnu-Severin.....69

Figura 8.3: Studiul filogenetic se bazează pe secvențe nucleotidice specifice paraziților *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* și *Acanthocheilonema reconditum*, ce au fost obținute în urma reacției PCR clasic, cum a fost descrisă de Rishniw et al. (Rishniw et al. 2006), și folosind amorsele DIDR-F1 și DIDR-R1. Arborele a fost făcut folosind metoda „Maximum Likelihood” și bazat pe modelul “Tamura 3-parameter” (Tamura 1992). Pentru studiul filogenetic a fost folosit programul MEGA X (Kumar et al. 2018). Secvențele înconjurată cu roșu aparțin studiului nostru / **Figure 8.3:** Phylogenetic tree of *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* și *Acanthocheilonema reconditum* based on the amplicons obtained using the classic PCR reaction, described by a Rishniw et al. (Rishniw et al. 2006), and using the DIDR-F1 și DIDR-R1 primers. The evolutionary history was inferred by using the “Maximum Likelihood” method and “Tamura 3-parameter” model (Tamura 1992). Sequences obtained in this study are marked with a red rectangle. Only bootstrap values above 80% are shown.....71

Figura 9.1: Cronologia descoperirilor de noi metode de a identifica bacterii paraziți și vectori, folosind tehnica MALDI-TOF (Murugaiyan și Roesler 2017) / **Figure 9.1:** Time line of the development of MALDI-TOF techniques for the identification of bacteria, parasites and their vectors (Murugaiyan și Roesler 2017).....78

Figura 9.2: (a) Regiunile din nordul Greciei, de unde au fost colectați flebotomi. **(b)** Localitățile unde au fost amplasate capcane pentru recoltarea flebotomilor / **Figure 9.2: (a)** The regions, from the north of Greece, where sandfly sampling was done. **(b)** The geographical location where light- traps were placed.....80

- Figura 9.3:** Capcane amplasate lângă ferme de oi, din regiunea Epirus, în nordul Greciei / **Figure 9.3:** Light-traps placed near sheep farms from the Epirus region, from the north of Greece.....81
- Figura 9.4:** Femelă flebotom din genul *Phlebotomus*. Specimen capturat în vestul Greciei. Se poate observa poziția specifică, ridicată a aripilor, în formă de “V” și picioarele lungi și subțiri (colecție proprie) / **Figure 9.4:** Female sandfly, genus *Phlebotomus*. Sample collected from the west of Greece. The typical “V” shape position of the wings and the long and thin legs can be observed (original).....80
- Figura 9.5:** Flebotomi masculi din genul *Phlebotomus* menținuți în etanol 70%. Se pot observa organele genitale externe, poziția specifică a aripilor și picioarele lungi și subțiri. Specimene capturate în vestul Greciei (original) / **Figure 9.5:** Two male sandflies maintained in 70% ethanol. The external copulatory organs can be observed, as well as the typical „V” shaped position of the wings, and the fine, long legs. Samples and pictures belong to the author and have been collected from the west of Greece (original).....82
- Figura 9.6:** Omogenizatorul automat TissueLyser II, de la Qiagen și praful de sticlă folosit pentru omogenizarea și extracția proteinelor / **Figure 9.6:** Automatic homogeniser TissueLyser II, from Qiagen, and the glass powder, used to homogenise and extract proteins from the sample.....83
- Figura 9.7:** (a) Aparatul “Microflex LT MALDI-TOF” folosit pentru identificarea speciilor de artropode. (b) Placa pentru MALDI-TOF, cu probe, încărcată în lăcașul aparatului / **Figure 9.7:** (a) The “Microflex LT MALDI-TOF”, used for the species identification. (b) The steel plate, with samples, loaded in the MALDI-TOF machine.....84
- Figura 9.8:** Aparate genitale ale masculilor flebotomi folosite pentru identificarea morfologică a speciei: (a) *Phlebotomus tobbi*, (b) *Phlebotomus neglectus*, (c) *Sergentomyia minuta*, (d) *Phlebotomus perfiliewi* / **Figure 9.8:** The male genitalia used for species identification of sandflies: (a) *Phlebotomus tobbi*, (b) *Phlebotomus neglectus*, (c) *Sergentomyia minuta*, (d) *Phlebotomus perfiliewi*.....86
- Figura 9.9:** Structuri anatomice folosite pentru identificarea morfologică: armatura de la nivelul faringelui a flebotomilor (a) *Sergentomyia minuta* și (b) *Phlebotomus neglectus*, spermateca ce face parte din organul genital femel a flebotomilor (c) *Phlebotomus neglectus* / **Figure 9.9:** Anatomical structures used for species identification of sandflies: pharyngeal armature of (a) *Sergentomyia minuta* and (b) *Phlebotomus neglectus* sandflies. The spermathecae, part of the female reproductive organ of (c) *Phlebotomus neglectus* sandflies.....87

Figura 9.10: Spectre reprezentative, pentru fiecare specie de flebotom analizată cu metoda MALDI-TOF, dar și două spectre reprezentative pentru căpușa *Amblyomma variegatum* și țânțarul *Aedes albopictus*, pentru comparație. Spectrele au fost analizate folosind programul FlexAnalysis v3.3. (Intens) Intensitate; (a.u) unități arbitrare; (m/z) raportul masă/sarcină electrică / **Figure 9.10:** Spectra, representative for each sandfly species analysed in or study, and spectra, representative for the tick *Amblyomma variegatum* and the mosquito *Aedes albopictus*, for comparison. (Intens) Intensity; (a.u) arbitrary units; (m/z) mass-to-charge ratio.....88

ANEXA IV
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE
LIST OF SCIENTIFIC PAPERS

În reviste ISI

Domeniul tezei (1)

1. **Cimpan Andrei Alexandru**, Yaarit Nachum-Biala, Bar Ben-Shitrit, Liviu Miron, and Gad Baneth. "Epidemiological Study of Canine Babesiosis and Hepatozoonosis in the South of Romania" *Acta Parasitologica* (2020): p. 1-10.

Alte publicații (2)

1. Ana Vasić, Nemanja Zdravković, Dragoș Aniță, Jovan Bojkovski, Mihai Marinov, Alexander Mathis, Marius Niculaua, Elena Luanda Oșlobanu, Ivan Pavlović, Dušan Petrić, Valentin Pflüger, Dubravka Pudar, Gheorghe Savuța, Predrag Simeunović, Eva Veronesi, Cornelia Silaghi and the SCOPEs AMSAR training group (Adriana Aniță, Ioana Alexandra Anton, **Andrei Cîmpan**, Lavinia Ciucă, Luciana Crivei, Aleksandar Cojkić, Darko Davitkov, Vladimir Draskovic, Bojan Gajic, Uroš Glavinic, Maria-Larisa Ivănescu, Mihaela Kavran, Andrei-Cristian Lupu, Raluca Mîndru, Daniela Porea, Radiša Prodanović, Oliver Radanović, Cristian Raileanu, Stefan Raileanu, Marko Ristanić, Constantin Roman, Ljubodrag Stanišić, Slavica Vaselek, Miloje Đurić.), (2019) - Species diversity, host preference and arbovirus detection of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in South-Eastern Serbia, *Parasites and Vectors*, 2019 12:61, (IF 3.62).
2. Ana Vasic, Luanda Elena Oșlobanu, Mihai Marinov, Luciana Alexandra Crivei, Ioana Alexandra Rațoi, Adriana Anița, Dragos, Anița, Alexandru Dorosencu, Vasile Alexe, Ștefan Raileanu, Predrag Simeunovic, Cristian Răileanu, Elena Falcuta, Florian Liviu Prioteasa, Jovan Bojkovski, Ivan Pavlovic , Alexander Mathis, Birke Andrea Tews, Gheorghe Savuța, Eva Veronesi, Cornelia Silaghi and the SCOPEs AMSAR training group (**Andrei Cimpan**, Lavinia Ciuca, Aleksandar Cojkić, Vladimir Draškovic, Miloje Djuric, Uroš Glavinic , Maria Larisa Ivanescu, Mihaela Kavran, Andrei Lupu, Raluca Mindru, Daniela Porea, Oliver Radanovic, Marko Ristanic , Constantin Roman, Ljubodrag Stanišic,

Nemanja Zdravkovic, Slavica Vaselek), (2019)- Evidence of West Nile Virus (WNV) Circulation in Wild Birds and WNV RNA Negativity in Mosquitoes of the Danube Delta Biosphere Reserve, Romania, 2016, Tropical Medicine and Infectious Disease, 2019, 4,116

În reviste ISI proceedings

Domeniul tezei (1)

1. **CÎMPAN Andrei Alexandru**, NACHUM-BIALA Yaarit, MIRON Liviu, BANETH Gad, 2019 – "Epidemiological Study of Canine Leishmaniosis in the South of Romania" ISI Proceedings of the Int.Sci.Congress "Life sciences, a challenge for the future" p.476-481. ISBN: 978-88-85813-63-2

În reviste cotate BDI

Domeniul tezei (1)

1. **Cîmpan Andrei Alexandru**, Anastasia Diakou, Elias Papapdopoulos, și Liviu Miron. 2019. „SEROLOGICAL STUDY OF EXPOSURE TO LEISHMANIA IN DOGS LIVING IN SHELTERS, IN SOUTH-EAST ROMANIA”. *Rev Rom Med Vet* 29(3)

Alte publicații (3)

1. Andrei-Cristian LUPU, Alin BARBACARIU, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Gabriela-Victoria MARTINESCU, **Andrei-Alexandru CÎMPAN**, Liviu Dan MIRON, 2018, 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
2. 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
3. Constantin ROMAN, Lavinia CIUCĂ, Raluca MARDARE (MÎNDRU), Andrei-Cristian LUPU, **Andrei-Alexandru CÎMPAN**, Maria-Larisa

IVĂNESCU, Olimpia IACOB, Dumitru ACATRINEI, Liviu Dan MIRON, 2017, Observations regarding in vitro hatching of Raillietina spp. (Cestoda: Cyclophyllidea) onchosphere, Lucr. ȘT: - Medicina Veterinara, Universitatea de Științe Agricole și Medicina Veterinara Ion Ionescu de la Brad Iasi, Vol. 60 (4); p. 477-480, ISSN 1454-7406

Cărți

Domeniul tezei (3)

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.

Alte publicații

1. Malaria - Miron Liviu (coord.), Dumitru Acatrinei, Olimpia Iacob, Larisa Ivanescu, Lavinia Ciuca, Constantin Roman, Raluca Mindru, Andrei Lupu, **Andrei Cîmpan**, Gabriela Martinescu, Elena Velescu, Mioara Matei, Carmen Manciuc, 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.
2. Le paludisme - Malaria - Miron Liviu (coord.), Dumitru Acatrinei, Olimpia Iacob, Larisa Ivanescu, Lavinia Ciuca, Constantin Roman, Raluca Mindru, Andrei Lupu, **Andrei Cîmpan**, Gabriela Martinescu, Elena Velescu, Mioara Matei, Carmen Manciuc, 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.