



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPOSDRU



USAMV Iași

REZUMAT

Unul din efectele încălzirii globale îl reprezintă adaptarea unor noi vectori la condiții climatice considerate până la momentul respectiv improprie dezvoltării, precum și riscul introducerii și/sau re-emergenței unor boli. Malaria se numără printre bolile a cărui risc de re-emergență este legat de efectele încălzirii globale. Malaria este boala cu distribuția cea mai largă de pe glob. Anual mii de oameni bolnavi sau purtători de malarie călătoresc în țări libere de malarie, reintroducând riscul re-emergenței acestei boli. Necesitatea cartografierii distribuției globale a malariei este mare întrucât aceasta se află într-o continuă schimbare, iar vectorii implicați în transmiterea ei se adaptează pe teritorii tot mai diverse, fiind transportați odată cu intensificarea călătoriilor intercontinentale.

Astfel în lucrarea de față s-a urmărit identificarea speciilor de culicidae din complexul *Anopheles maculipennis* și stabilirea rolului lor vectorial în transmiterea malariei.

Lucrarea este structurată în două părți, ce corepund ca întindere a subiectului tratat, regulilor impuse redactării tezei de doctorat.

Prima parte tratează studiul bibliografic al temei propuse, consultându-se literatura de specialitate din țară și străinătate, fiind o literatură de actualitate, oferind date de ultimă oră asupra temei propuse și se întinde pe 48 de pagini cu 7 figuri și 5 tabele.

În **capitolul I** sunt redate aspecte ale bioecologiei culicidelor din zona orașului Iași- ca studiu de caz, cu prezentarea factorilor climatogeni, care influențează dezvoltarea țânțarilor: radiația solară, caracteristica reliefului, termica multianuală, umiditatea aerului și regimul pluviometric.

Capitolul al-II-lea din partea de cercetări bibliografice a fost destinat unei descrieri morfologice pe bază de chei de determinare a țânțarilor din complexul *Anopheles maculipennis*, în diferite stadii de dezvoltare și compararea stadiului actual al cunoașterii complexelor de specii din genul *Anopheles*, care transmit malaria, pe plan național și internațional.

În **capitolul al-III-lea** au fost observate aspecte privind epidemiologia malariei, dată fiind patogenitatea cunoscută a țânțarilor care pot provoca această boală cu distribuția cea mai



largă de pe glob. Este realizată o descriere a distribuției malariei în Africa, Asia, America și Europa, finalizând capitolul cu date despre distribuția malariei în România.

Capitolul al-IV-lea este destinat descrierii ciclului biologic al paraziților malariei, a grupului de specii din genul *Plasmodium*, descriind ciclul sporogonic, ciclul schizogonic, eritrocitar și modul de transmitere, vectorial sau prin transfuzie a malariei.

Capitolul V este destinat descrierii unor tehnici de clonare moleculară care presupune asamblarea unor molecule de ADN recombinat și replicarea lor în organismul gazdă. Se descrie procesul clonării și etapele acestuia, de la extracția ADN-ului, la amplificarea genei de interes, tratarea cu enzime de restricție a ADN-ului purificat pentru a obține capete care pot fi legate cu cele ale vectorului de clonare și introducerea moleculelor recombinante în celula gazdă, cu verificarea moleculelor recombinante.

A doua parte cuprinde partea de cercetări proprii și se întinde pe 128 de pagini cu 75 de figuri și 28 de tabele, fiind structurată pe cinci capitole după cum urmează:

Capitolul VI cuprinde analiza datelor climatice (temperatură, umiditate și precipitații pentru 1961-2013) cu scopul demonstrării evoluției favorabile a acestora asupra ciclului de viață al culicidelor, în prezent și până în 2030. În acest scop am implementat un model matematic nou numit modelul ET30 ce se bazează pe construcția unei funcții de interpolare de tip polinom Lagrange, și oferă posibilitatea unei prognoze cu o probabilitate de peste 95%. Utilizarea acestui tip de algoritm matematic permite găsirea unei funcții F , prin interpolarea măsurătorii experimentale, care să estimeze cât mai bine temperatura medie în fiecare lună a anul 2030, conform tendinței termice înregistrate în ultimile cinci decenii. Secvențele de program ale modelului ET30 au fost calculate utilizând limbajul de programare FORTRAN, iar prelucrarea datelor fost făcută cu ajutorul aplicației OringiPro.

Astfel făcându-se o comparație cu perioada de eradicare a malariei în România, anii 60', la Iași s-a înregistrat până în prezent o creștere cu $1,1^{\circ}\text{C}$, iar la nivelul întregii țări o creștere de $0,72^{\circ}\text{C}$, arătând probabilitatea adaptării unor noi specii de culicide la clima noastră. Într-un studiu realizat de Jonathan A. Patz și Sarah H. Olson în 2006 demonstrează că în zona montană, unde malaria este absentă sau sezonieră, o încălzire cu $0,5^{\circ}\text{C}$ ar duce la o înmulțire a populațiilor



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL PUNII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELUR VÂRSTNICE
AMPOSORI



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OECD



USAMV Iași

de culicide cu 30-100% și de asemenea ar favoriza dezvoltarea parazitului în interiorul vectorului.

Umiditatea medie relativă la Iași înregistrează o scădere cu 8,0% față de perioada de eradicare a malariei, înregistrându-se o umiditate relativă medie anuală de 64%, favorabilă dezvoltării culicidelor, o umiditate excesivă încetinindu-le dezvoltarea. Au fost realizate și două hărți, cu situația actuală a României în prezent și o extrapolare a datelor în 2030, arătându-se o creștere cu 0,7-0,8°C, rezultate ce coincid cu cele furnizate la nivel global pentru 2030 de către cele mai prestigioase institute de cercetare din lume (0,8-1,7°C), demonstrând validitatea modelului matematic implementat de noi ET30.

Capitolul VII cuprinde studii referitoare la colectarea și identificarea speciilor de culicide ce aparțin complexului *Anopheles maculipennis*, prin tehnici de biologie moleculară, făcându-se capturi în trei puncte din orașul Iași: lacul Ciurbești, iazul Cotu Morii și râul Nicolina (cartier Galata). Capcanele au fost instalate la lăsarea serii, ora 20.00 și până dimineață, ora 06.00 în punctele considerate cele mai propice pentru activitatea țânțarilor. În vederea identificării genurilor și speciilor de țânțari aceștia sunt păstrați în alcool etilic 80%.

Recoltarea probelor s-a făcut începând cu luna mai, până în luna octombrie, capcanele fiind amplasate la începutul și la sfârșitul lunii, în 2010 și 2012. Țânțarii conservați în alcool au fost identificați pe baza cheilor de identificare descrise de Norbert Becker în 2003. Culicidele din genul *Anopheles* încadrate în complexul *Anopheles maculipennis* au fost folosite pentru extracția ADN-ului și identificarea prin tehnici de biologie moleculară, fiind specii gemene identice din punct de vedere morfologic.

În total au fost examinați 1830 de țânțari încadrați în genurile *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus* și *Anopheles*. În complexul *Anopheles maculipennis* au fost încadrați 243 de țânțari pe baza caracteristicilor morfologice (chei de identificare date de Norbert Becker), speciile fiind identificate apoi prin tehnici de biologie moleculară.

În total au fost identificate prin PCR 217 exemplare aparținând complexului *Anopheles maculipennis* din care: 58 exemplare *Anopheles atroparvus*, 18 exemplare *Anopheles melanoon*, 2 exemplare *Anopheles labranchiae*, 52 exemplare *Anopheles maculipennis* și 87 exemplare *Anopheles messeae*. Au fost folosiți pentru identificare țânțari adulți și larve de stadiul III și IV.



Regiunea ITS2 a ADN-ului a fost amplificată în întregime prin PCR, folosind primerii utilizați de Jana Proft în 1999.

Anopheles labranchiae a fost pentru prima dată semnalată în România, specia fiind capturată la iazul natural Ciurbești, aflat la periferia orașului Iași în comuna Miroslava. Cele două exemplare identificate au fost larve de stadiul IV, ceea ce poate concluziona cu adaptarea speciei la clima orașului Iași. Asemănarea în proporție de 96% cu specia *Anopheles labranchiae* din Italia arată posibilitatea importării speciei din această țară, având în vedere și că o mare parte din locuitorii din municipiul Iași și comunele periferice, își exercită forța de muncă în Italia (vara întorcându-se în țară și putând transporta cu ei și țânțari din această specie). Larvele de *Anopheles labranchiae* se dezvoltă în apă stagnantă, dulce sau sărată, în zonele de coastă din Europa, preferând căldura. Hibernarea se face ca femelă adultă la întuneric, în grajduri sau cavități naturale. Diapauza poate fi completă sau incompletă, existând prânzuri de sânge ocazionale. Femelele sunt în principal antropofage, ocazional hrănindu-se și pe animale domestice.

Anopheles labranchiae este o specie endofilică, locuind în locuințe umane, grajduri, adăposturi de animale și ocazional în aer liber în adăposturi naturale (cavități de copac). Prezența larvelor a fost semnalată din aprilie până în octombrie. Zborul acestei specii este limitat la 2-5 km. *Anopheles labranchiae* are o distribuție limitată în sudul și sud-estul Europei. Acesta a fost raportat în sud-estul Spaniei, Corsica, zonele de coastă din Italia, Sardinia, Sicilia. În Africa de Nord specia se găsește în Maroc, Algeria și Tunisia (A.R.Zahar 1990). *Anopheles labranchiae* a înregistrat o creștere în Sardinia în ultimii 35 de ani.

Probele PCR, specifice speciilor de țânțari identificate au fost supuse secvențierii și rezultatele au fost comparate cu cele înregistrate în GenBank, asemănările găsindu-se în proporții între 96% și 100%. Astfel specia *Anopheles labranchiae* din România se aseamănă în proporție de 96% cu specia *Anopheles labranchiae* din Italia (Cagliari), cod-AY253840.1; secvențierea probei de *Anopheles maculipennis sp.* din România (Iași) a fost verificată în GenBank prin NCBI Blast: Nucleotide sequence și corespunde în proporție de 99% cu specia *Anopheles maculipennis sp.* din Turcia (Anatolia), cod-JN112927.1; secvențierea probei de *Anopheles messeae* din România (Iași) a fost verificată în GenBank prin NCBI Blast: Nucleotide sequence și corespunde în



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPOSDRU



USAMV Iași

proporție de 99% cu specia *Anopheles messeae* din Italia, cod-AY365011.1; secvențierea probei de *Anopheles melanoon* din România (Iași) a fost verificată în GenBank prin NCBI Blast: Nucleotide sequence și corespunde în proporție de 100% cu specia *Anopheles melanoon* din Italia, cod- AY365009.1.

Distribuția globală a malariei depinde foarte mult de caracteristicile intrinseci ale vectorului, competența vectorului (capacitatea unei specii de *Anopheles* de a asigura dezvoltarea completă a parazitului) și capacitatea sa vectorială, *Anopheles labranchiae* dovedindu-se a fi cel mai important vector al malariei în Europa.

Anopheles labranchiae, *Anopheles messeae*, *Anopheles melanoon*, *Anopheles atroparvus* și *Anopheles maculipennis* au fost incriminați în transmiterea malariei în Europa, ultimii 4 fiind responsabili de transmiterea malariei în România în perioada 1948-1963.

Capitolul VIII cuprinde studii referitoare la epidemiologia malariei în România în ultimii 37 de ani, cu analiza cazurilor pe vârstă, sex, profesie și zona de infestație pentru perioada 2007-2013, în vederea stabilirii unor măsuri profilactice.

Din 1976 când malaria a fost eradicată complet și până în 2012 în România au fost diagnosticate 744 de cazuri de malarie. Incidența cea mai mare a malariei s-a raportat în Constanța cu 229 de cazuri și București cu 221 de cazuri. Deși nu avem o detaliere a cazurilor din Constanța, privind profesia celor diagnosticați cu malarie, raportat la datele din 1997-2005 când 70% din cazuri s-au înregistrat la cei de profesie marinar, putem afirma că o mai bună instruire a echipajului maritim, precum și înăsprirea investigațiilor medicale a celor întorși din zone endemice de malarie, pot fi considerate ca măsuri profilactice.

În perioada 2007-2012 în România au fost diagnosticate 142 de cazuri toate fiind de import. *Plasmodium falciparum* a fost diagnosticat în 52% din cazuri, fiind de altfel și cea mai periculoasă specie de *Plasmodium*, responsabilă de malaria cerebrală, ducând la moarte în scurt timp dacă nu este instituit un tratament corespunzător. La nivel global *Plasmodium falciparum* este responsabil de 85% din cazurile de malarie. Dintre speciile de malarie care infectează omul, *Plasmodium vivax* și *Plasmodium ovale* pot dezvolta etape hepatice latente, care se pot reactiva după intervale de până la 2 (*P. vivax*) la 4 ani (*P. ovale*). Cazurile diagnosticate în România în



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELUR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPOSDRU



USAMV Iași

perioada 2007 -2012 au fost reprezentate într-o proporție de 12% de *P.vivax* și doar 2% de *P.ovale*.

În 57,7% din cazurile diagnosticate în România, infestația s-a produs într-o țară de pe continentul Africa. Statistici exacte privind situația exactă a malariei în Africa nu pot fi obținute din cauza problemelor existente în obținerea datelor din sistemul de sănătate și din cauza faptului că multe tratamente și decese nu sunt înregistrate. Snow et al. au făcut o cartografiere a distribuției malariei în lume în anul 2002, an în care s-a înregistrat 515 milioane de episoade clinice de *P. falciparum*. Aceste estimări globale sunt cu până la 50% mai mari decât cele raportate de către Organizația Mondială a Sănătății (OMS) și 200% mai mare pentru zonele din afara Africii.

Africa reprezintă 85% din cazurile de malarie înregistrate și 90% din decesele cauzate de malarie la nivel mondial.

În perioada 1997-2005 cazurile de malarie diagnosticate în România au fost reprezentate de personalul marinar, procentaj ce a scăzut la 0.01% în perioada 2007-2012 ceea ce arată o îmbunătățire a instruirii personalului, a companiilor de transport maritim.

Situația este cu totul diferită în perioada 2007-2012 când majoritatea cazurilor de malarie au fost reprezentate de muncitori. Conform statisticilor criza economică mondială a început în decembrie 2007, și se pare că aceasta reprezintă motivul imigrării românilor în zone geografice foarte îndepărtate, zone endemice de malarie care până atunci nu au reprezentat o oportunitate de câștig. Majoritatea celor încadrați în categoria muncitori nu au avut studii superioare, sau nu au lucrat calificați într-o anumită profesie, ceea ce arată și o explicație a lipsei de documentare în ceea ce privește riscurile călătoriilor în zone endemice de malarie. O rezolvare a educării populației în ceea ce privește importanța instituirii unei profilaxii corecte și durata acesteia s-ar putea rezolva prin centralizarea călătoriilor în momentul achiziționării biletului, și beneficierea automat de o consiliere medicală.

Următoarea categorie a fost reprezentată de turiști care au urmat o profilaxie dar nu constantă și de cele mai multe ori necorespunzătoare. Acest lucru arată că oamenii nu sunt informați corespunzător în ceea ce privește importanța unei profilaxii și gravitatea problemei legate de contactarea unei boli tropicale cu o rată a mortalității foarte ridicate la nivel mondial.



În perioada 2007-2012 cazurile de malarie diagnosticate în România au fost reprezentate într-o proporție de 71% de bărbați, fiind în strânsă legătură cu graficul anterior ce ilustrează profesia. Sexul este deci direct influențat de meseria celor care au migrat în zone endemice de malarie fiind strict în scop profesional, în domenii ce implică mână de muncă bărbătească. În ceea ce privește studiile de caz au fost luate în calcul 2 cazuri reprezentând studenți, și 2 cazuri de muncitori dar cu studii superioare și profilaxie administrată.

Ca și măsuri profilactice călătorii ar trebui să doarmă sub o plasă de țânțari impregnată cu insecticid. Dacă sejurul este de lungă durată, se pot achiziționa kit-uri de impregnare simple și eficiente ce conțin compuși pentru impregnare unică (comprimate efervescente, plicuri, sticle) ce sunt amestecate cu apă, pentru impregnarea plaselor. Utilizarea aerului condiționat nu constituie o protecție împotriva mușcăturii de țânțar, poate reduce agresivitatea, dar nu împiedică mușcătura. Utilizarea de difuzoare electrice, spray-uri de cameră, constituie o modalitate complementară de protecție împotriva țânțarilor. Este indicată purtarea bluzelor cu mâneci lungi și a pantalonilor, precum și folosirea de repelente pe zonele expuse (față, gât), ce completează protecția mecanică dată de haine. De asemenea folosirea spray-urilor repelente pe haine, crește protecția de la câteva zile la câteva săptămâni. Se mai poate utiliza impregnarea hainelor cu permetrină (insecticidul cu toxicitatea cea mai mică pentru om - o impregnare prin pulverizare cu doza de 1g/m²) oferă protecție pe o perioadă de 2 luni și rezistă la 8 spălări cu apă și săpun (protejând astfel și de disconfortul mușcăturii și altor specii de țânțari).

Conform datelor analizate, călătoriile în zone endemice de malarie, în scop turistic sau profesional sunt în continuă creștere, întreținând riscul introducerii parazitului malariei în țară. De asemenea orașul Iași este încadrat ca și oraș cultural, cu multe universități, ce găzduiește studenți străini ce vin din zone endemice de malarie, putând fi purtători de *Plasmodium*. Corelat cu prezența vectorului ce aparține complexului *Anopheles maculipennis* și factorii climatici favorabili, introducerea periodică a malariei în țară, riscul re-emergenței acesteia în țară este posibil.

Capitolul IX a avut ca obiectiv studiul mecanismului molecular desfășurat în momentul infecției ficatului cu *Plasmodium*, cu crearea de paraziți transgenici *Plasmodium berghei* și *Plasmodium yoelii* exprimând o proteină de fuziune GFP-LUC. Obiectivul pe termen lung este



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSORII



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSDRU



USAMV Iași

de a permite, grație unei bune înțelegeri a mecanismului de pătrundere și a diferențierii intracelulare a sporozoiților, abordarea de noi posibilități terapeutice sau de vaccinuri care vizează prevenirea infecției ficatului de către *Plasmodium*. Complexitatea parazitului *Plasmodium falciparum* a contrariat logistica vaccinurilor și a imunologiei de mai bine de un secol, reprezentând un impediment în crearea unui vaccin pentru o protecție integrală. Această complexitate este datorată capacității parazitului de schimbare totală a învelișului celular și molecular în fiecare etapă de dezvoltare, proces controlat de un genom cu peste 5000 de gene recunoscute; și de asemenea schimbarea nișelor de dezvoltare extracelulară și intracelulară.

S-au utilizat ca modele parazitare *Plasmodium berghei* și *Plasmodium yoelii* de la rozătoare. La acești paraziți pot fi studiate toate stadiile ciclului parazitar, în special după infectarea țânțarilor *Anopheles* hrăniți pe șoareci infectați.

Comparativ cu *Plasmodium falciparum*, principalul agent al paludismului la om, modificările genetice sunt relativ ușor de realizat la *P.berghei* și *P.yoelii*, prin recombinații omoloage. Pentru a studia infecția ficatului cu *Plasmodium*, se utilizează ficat, *in vitro*, consistent, infectat cu culturii celulare de sporozoiți și modele *in vivo*, unde șoarecii sunt inoculați cu sporozoiți, pe cale intravenoasă. Noi am folosit o nouă abordare pentru cuantificarea paraziților în ficat, bazate pe utilizarea paraziților transgenici ce exprimă luciferază, ce permite detecția paraziților *in vivo* prin bioluminescență după injectarea unui substrat adaptat (Luciferazele sunt enzime care controlează oxidarea luciferinei în oxiluciferină provocând emisie de fotoni. Luciferaza cea mai cunoscută este cea a lui *Photinus pyralis* (licurici). S-a utilizat bioluminescența, ce permite cuantificarea paraziților într-un mod neinvaziv, fără sacrificarea animalului, și permite deci urmărirea în timp pe același animal. Un aspect important al studiului infecției ficatului cu *Plasmodium*, este capacitatea cuantificării *in vivo* a schimbării parazitemiei în ficat.

Strategiile alese sunt următoarele:

1. Construcția de vectori a expresiei la E.coli utilizând plasmidul comercial (pSP- luc+NF Fusion vector, ref e4471, Promega) ce conține o genă de rezistență la ampicilină (pentru selecția de bacterii recombinante) și o secvență codantă pentru luciferaza licuriciului (LUC), flancată de multiple situri de restricție. În acest plasmid au fost clonate succesiv 5 fragmente: GFP,



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OSPODRU



USAMV Iași

promotorul (HSP70-1), 3'UTR (DHFR), regiunea omoloagă 5' (Pb sau Py), regiunea omoloagă 3' (Pb sau Py).

2. Alegerea transgenei: Noi am utilizat luciferaza de la licurici, la care s-a fuzionat o proteină fluorescentă GFP. GFP-ul a fost utilizat ca marker de selecție, este o proteină formată din 238 reziduri de aminoacizi, ce exprimă fluorescență când este expusă la lumină UV. Cel mai frecvent GFP este obținut de la meduza *Aequorea Victoria*. Luciferazele sunt enzime care controlează oxidarea luciferinei în oxiluciferină provocând emisie de fotoni. Luciferaza cea mai cunoscută este cea a lui *Photinus pyralis* (licurici).

3. Alegerea promotorului : S-a utilizat promotorul genei HSP70, pentru că permite o expresie puternică și constitutivă (a tuturor stadiilor) a transgenei. Acest promotor ar trebui să permită detectarea bioluminescenței emise de formele hepatice precoce a *Plasmodium*-ului.

4. Metode de integrare în genom

Caseta de expresie GFP-LUC a fost integrată în genomul parazitului receptor stabil omolog de recombinare. Pentru asta, noi am utilizat o abordare, de înlocuire genică care permite integrarea ireversibilă a transgenei după dublu crossing-over.

Pentru a permite această recombinare, caseta de expresie a genei a fost flancată de două regiuni omoloage regiunilor 5' și 3' a genei P230p, care nu este necesară parazitului, și poate fi deci înlocuită de o altă genă (ex:transgenă).

5. Selecția de paraziți transgenici.

O abordare clasică pentru selecția de paraziți transgenici, este introducerea ca marker de selecție a unei gene de rezistență la pyrimetamină.

6. Infecții experimentale pe șoareci de laborator, după o prealabilă transfecție. Transfecția este o tehnică foarte dificilă, rata reușitei fiind în general mică. Transfecția poate fi reușită dar pot apărea mutații, care conferă rezistență contra antibioticului utilizat. Se poate ca transfecția să nu reușească din cauza nedistrugerii în totalitate a paraziților sălbatici. Dacă paraziții care au fost transfecțați conțin în construcția lor un marker fluorescent (în cazul nostru GFP-LUC) se recomandă verificarea fluorescenței la microscop cu fluorescență (obiectiv x40). Noi am recoltat sânge de la șoarecii ce conțin paraziți transgenici, s-a repatizat sângele în godeurile plăcii și s-a



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPOSDRU



USAMV Iași

examinat la microscop. Sângele transfectat nu a prezentat fluorescență. Conform electroforezelor și secvențierii, introducerea celor 5 fragmente în plasmid s-a realizat cu succes.

Cauzele lipsei fluorescenței, pot fi datorate nivelului scăzut de exprimare a markerilor fluorescenței, nedetectabili la microscop și transfecția să fi reușit, fie transfecția a eșuat, fie gazarea mediului în care s-au cultivat paraziții nu a fost corespunzătoare, urmând ca studiul să continue.

Capitolul X cuprinde concluziile finale, acestea fiind urmate de bibliografie.