



Rezumat

Cuvinte cheie: *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Eimeria spp.*, prevalență, dinamică sezonieră, McMaster, MiniFlotac®, Imunofluorescență, probe compozite

Teza de doctorat intitulată "Prevalența și riscul zoonotic al protozoarelor parazite intestinale la tineretul bovin din regiunea Moldovei, România" a fost elaborată în cadrul Școlii Doctorale a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" din Iași, ca parte a proiectului "Perfecționarea și dezvoltarea resurselor umane pentru cercetare și inovare prin școala doctorală, POSDRU/CPP107/DMI1.5/S/77222", proiect cofinanțat din Fondul Social European, prin intermediul Ministerului Muncii, Familiei, Protecției Sociale și Persoanelor Vârstnice, respectiv Autoritatea de Management pentru Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (AMPOSDRU), în cadrul Programului Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 -2013.

Scopul lucrării a fost acela de a realiza un studiu complex în legătură cu protozoarele parazite la vițeele din zona Moldovei. Obiectivele care au fost realizate pentru îndeplinirea scopului definit au fost următoarele:

Recoltarea probelor din fermele de bovine

Evaluarea comparativă a metodelor de examinare din punct de vedere parazitologic a fecalelor pentru identificarea protozoarelor parazite: Examinarea directă a frotiului (cu sau fără coloranți)

Metoda Willis

Metoda Ziehl-Neelsen

Metoda Giemsa

Metoda imunofluorescenței

Metoda McMaster

Metoda Flotac

Metoda MiniFlotac®

Elaborarea unor noi protocoale de lucru în vederea obținerii reducerii costurilor și a creșterii eficienței;

Pentru îndeplinirea obiectivelor și a scopului am realizat următoarele acțiuni:



Aprofundarea cunoștințelor prin efectuarea unui stagiu în cadrul laboratorului de parazitologie al Facultății de Medicină Veterinară a Universității Gent;

Efectuarea hărții de lucru și aplicarea metodelor în România și Belgia

În urma realizării obiectivelor principale desprindem din studiile noastre următoarele elemente cu grad de noutate ca urmare a studiilor întreprinse următoarele aspecte:

- Perfecționarea unor metode de eșantionaj pentru scăderea costurilor materialelor și a timpului de lucru
- Completarea și modificarea unor protocoale de analiză clasice

Lucrarea a fost realizată pe parcursul a patru ani de studii, în perioada 1.10.2010 – 30.09.2014 și este structurată în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale: prima parte reprezentată de stadiul actual al cunoașterii, ce cuprinde un număr de 40 de pagini și care reprezintă aproximativ 30% din conținutul lucrării și ce-a de a doua parte, de contribuții personale, cu un număr de 91 pagini reprezentând aproximativ 70%.

Cercetările prezentei teze de doctorat au fost valorificate prin publicarea ca prim-autor a trei articole științifice în reviste cotate în baze de date internaționale, rezultatele finale, prezentate în ultimele două capitole fac subiectul unui articol “in press”, intitulat: “*The effect of different detection methods and pooling of samples on the detection of protozoan infections in housed calves*”.

Conținutul **primei părți**, stadiul actual al cunoașterii, este structurat în două capitole, în care sunt relatate în sinteză, informații din literatura de specialitate națională și internațională legate de relația funcție cauzalitate a particularităților morfologice, fiziologice, fizipatologice, imunitare, de furajare și de întreținere a tineretului bovin și evoluția protozoozelor la viței. Sistemul digestiv monogastric al vițelului la fătare suferă modificări, transformări și evoluții până devine rumegător prin diferențierea compartimentelor pregastrice (rumen, rețea, foios și cheag). Sunt prezentate mecanismele producerii diareei, ca principal proces fiziopatologic ce produce însemnate pierderi economice pe lângă afecțiunile respiratorii. De altfel este realizată și o sinteză a proceselor implicate în imunitatea specifică și nespecifică, care luptă în apărarea împotriva paraziților. Placenta și imunoglobulinile din colostrum au o funcție importantă în dezvoltarea viitorului organism din punct de vedere imunitar. Diferitele modalități de întreținere, hrănire și creștere a tineretului taurin care au influență în transmiterea, evoluția și prevenirea parazitozelor, sunt prezentate la sfârșitul capitolului întâi.



În cadrul **Capitolului II, Metode de identificare a protozoarelor intestinale la tineretul bovin**, al primei părți s-a realizat un studiu bibliografic referitor la metodele standard utilizate în diagnosticarea protozoarelor parazite. Metodele au fost atât calitative cât și cantitative. Cea mai accesibilă și uzuală metodă folosită pentru depistarea formelor vegetative de paraziți flagelați sau ciliați; de sporozoare este realizarea frotiului direct, cu sau fără coloranți sau soluții clarificatoare, conform Cosoroabă și col., 2002. Metoda Willis descrisă atât de Mircean V. și colab., 2011 cât și Cosoroabă și colab., 2002 se pretează pentru identificarea ouălor ușoare, flotabile în soluție hipersalină. Pentru diagnosticarea *Cryptosporidium spp.* sunt descrise conform literaturii atât metoda *Ziehl Neelsen* modificată de Henricksen (Iacob O, 2000) cât și metoda de colorare *Giemsa* (Cosoroabă și colab., 2002). Imunofluorescența permite identificarea chiștilor de *Giardia spp.* și a celor de *Cryptosporidium spp* prin examinarea lamelor la microscopul cu imunofluorescență. Pentru realizarea studiilor noastre am utilizat kitul „*Cryptosporidium/Giardia detection kit*” de la firma Merifluor. Tehnica este ușor de realizat iar identificarea chiștilor se face prin examinarea cu obiectiv 200x sau 400x. La probele pozitive în câmpul microscopic se observă formațiuni cu morfologie și dimensiuni specifice colorate în verde fluorescent pe un fundal roșu- portocaliu. Examinarea microscopică cantitativă se poate face prin metodele: McMaster, Flotac și MiniFlotac® pentru *Eimeria spp.*. Metoda McMaster este cea mai utilizată metodă în parazitologia veterinară la nivel mondial. A fost dezvoltată pentru a ușura diagnosticarea parazitozelor la ovinele din Noua Zeelandă. Pentru a facilita realizarea studiilor de eficiență a medicamentelor s-au dezvoltat metode inovative care combină flotația cu centrifugarea (Flotac), translația sau metode mai puțin consumatoare de timp și necesar de aparatură- MiniFlotac® cu dispozitivul FillFlotac. În cazul acestor două metode partea superioară din soluția de examinat este supusă translației, ceea ce permite o examinare facilă, fără prezența detritusurilor (rămase la partea inferioară a camerei de examinare). Sensibilitatea este mai crescută în comparație cu metodele clasice și astfel se pretează a fi utilizate atât în realizarea supravegherii eficienței medicamentelor cât și la efectuarea de studii de prevalență a diferitelor specii de paraziți.

Cea de-a doua parte a acestei tezei, **CONTRIBUȚII PERSONALE**, este alcătuită din șase capitole urmate de concluziile generale:



Capitolul III - SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR motivează tema de cercetare a prezentei teze, prin importanța studiului și a utilizării metodelor moderne de identificare a protozoarelor parazite la bovine dar și îmbunătățirile aduse tehnicilor de identificare a acestora.

Finalitatea studiului întreprins poate fi concluzionată astfel:

În România, în fermele de bovine evoluează pe tot parcursul anului cele 3 boli studiate de noi:

Eimerioza cca 30%

Giardioza cca 45%

Criptosporidioza cca 8%

MiniFlotac, ca metodă de investigație paraclinică se poate utiliza pentru diagnosticarea eimeriozei atât în metodele individuale cât și în cele din probe compozite.

Metoda probelor compozite "pooling-ul" se poate utiliza în diagnosticul complexului parazitar *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.* și *Eimeria spp.*, având eficiență mai mare la 5 probe compozite în comparație cu probe compozite 10. Rezultatele au fost degajate din studii complexe cu peste 250 de probe din peste 35 de ferme din România și din Belgia, studii realizate în echipe mixte de cercetători români și belgieni pe parcursul elaborării acestui demers științific.

Capitolele IV și V prezintă locurile desfășurării studiilor, recoltare a probelor dar și agenții patogeni studiați. În cadrul laboratorului de Parazitologie al FMV Iași s-au desfășurat cea mai mare parte a cercetărilor din România. În cadrul Laboratorului de Imunologie și Virusologie al Direcției de Sănătate Veterinară și Siguranța Alimentelor Iași s-a realizat examinarea lamelor la microscopul cu fluorescență. Probele incluse în studiile efectuate în decursul celor patru ani au provenit de pe teritoriul întregii României dar în special din zona Moldovei. Modul de întreținere diferit, perioada de recoltare diferită și metodele diversificate au permis obținerea de valori conforme cu cele întâlnite în literatura internațională de specialitate. Astfel în urma efectuării studiului din oct 2010-martie 2013 au fost analizate 354 de probe prin metoda Willis și s-a obținut o prevalență a coccidiozei la viței de cca 20%, speciile cel mai des întâlnite au fost: *Eimeria bovis* și *Eimeria zuernii*. (Tronciu și colab,c 2014). În a doua etapă a studiului din România au fost recoltate 160 de probe și analizate prin metodele: McMaster (modificată), MiniFlotac® și IFA (modificată). Efectuarea în paralel a tehnicilor McMaster (modificată) și MiniFlotac® au permis realizarea unui studiu comparativ



între aceste metode. Tot pe baza datelor obținute s-au validat utilizării probelor compozite dar și stabilirea prevalenței coccidiozei, giardiozei și criptosporidiozei la vițeii din fermele luate în studiu. În fermele cu vaci de lapte de tip intensiv întreținerea tineretului se face în cușete individuale, situate în special în afara adăpostului. La fermele extensive, microfermele de tip familial întreținerea vițeilor se face în Țarcuri comune, în adăposturi. La fermele cu vaci pentru carne vițeii pot cazați, până la înțarcare, împreună cu mamele. Atât tipul fermei, extensiv sau intensiv, cu vaci pentru carne sau cu vaci pentru lapte, modul de întreținere și hrănire a vițeilor influențează evoluția protozoarelor parazitare. Aceste rezultate au fost prezentate în articolele intitulate: The distribution of the parasitic complex of *Eimeria*, *Giardia* and *Cryptosporidium* in housed calves from Moldavia, Preliminary research on the parasitic complex of *Eimeria*, *Giardia* and *Cryptosporidium* in young cattle from Northern Moldavia, și The prevalence of *Eimeria* species in dairy farms from Romania. Tehnica modificată a imunofluorescenței permite stabilirea OPG/EPG pentru *Giardia spp* și *Cryptosporidium spp*.

În intervalul Ianuarie 2013-Mai 2013 s-a efectuat un stagiul de deplasare, din cadrul proiectului "Improvement and Development of Human Resources for Research and Innovation by Doctoral School", Contract: POSDRU – CPP107-DMI1/5/S/77222, în Belgia, la Facultatea de Medicină Veterinară a Universității Gent. Studiile au fost realizate în echipa de cercetători condusă de prof. univ. dr **Edwin Claerebout** și sub supravegherea a lui **Bruno Levecke**. Aici au fost consolidate cunoștințele legate de metodele McMaster modificată, MiniFlotac®, imunofluorescența, utilizate pentru validarea realizării probelor compozite de 5 sau 10 eșantioane individuale. Materialul coprologic a provenit din 22 ferme localizate în partea vestică a Belgiei, din regiunea Flandra. Fermele sunt axate pe creșterea vacilor de carne, rasa predominantă este Belgian blue and white, vacile, în număr de 8-10, sunt cazate în Țarcuri situate în adăposturi închise sau semiînchise. Tineretul bovin are acces nelimitat atât la colostru cât și la laptele matern până la înțarcare.

În total s-au analizat 730 de probe individuale în intervalul Octombrie 2010- Mai 2014 prin metode calitative și cantitative.

În capitolul V sunt prezentați agenții etiologici incriminați, cu descrierea etiologiei, metode de diagnostic, tratament și a riscurilor zoonotice sau economice pentru:

Giardia spp.,

Cryptosporidium spp.



Eimeria spp.

Giardia spp. are cea mai mare prevalență la viței cu vârste până la șase luni, iar subtipurile zoonotice (A și B) sunt întâlnite în 20% din cazurile pozitive la viței. Studiile arată nivele foarte mari de răspândire a protozoarelor la viței, în unele cazuri rata infestației fiind de 100%.

Ciclul biologic permite eliminarea de elemente infestante și de rezistență în 72 de ore de la contaminare. Trofozoitul are forma de pară, cu dimensiunile de 12-15 μm lungime și 5-9 μm lățime. Chistul are forma ovală, aproximativ de la 5 până la 7-10 μm în diametru și conține patru nuclei. Peretele are o grosime de 0,3-0,5 μm și este compus dintr-o rețea de filamente de 7-20 nm. Fixarea trofozoitului se face prin intermediul discului adeziv. Ph-ul ridicat face ca trofozoizii de *Giardia spp.* să dezvolte vezicule, care nu sunt observate în mod normal la trofozoizi. Chistul are o formă ovalară și conține patru sau doi nuclei, corpul bazal și axonema sunt localizate mult mai aproape de nuclei și de fragmentele din discul adeziv. Patogeneza în *Giardia spp.* poate fi considerată ca un proces multifactorial incluzând atât caracteristicile parazitului, dar și răspunsul imun. Distrugerea microvililor marginii în perie și scăderea eficienței enzimelor, în special lipaza, unele proteaze, lactază și maltoză este dată de toxinele trofozoizilor. Distrugerea difuză a microvililor conduce la scăderea ratei de absorbție, în intestinul subțire, a apei, a electroliților și a nutrienților. Efectul combinat a acestei scăderi și deficiența enzimală are ca rezultat direct malabsorbția, diareea, și scăderea scorului de greutate corporală. Scăderea activității lipazei și creșterea producției de mucus poate explica steatoreia descrisă la gazdele infestate cu *Giardia spp.* (Lujan și colab., 2011). Principala manifestare clinică este diareea, care nu răspunde nici la tratamentul cu antibiotice, nici la cel cu coccidiostatice. Eliminarea unor fecale păstoase, cu aspect mucos indică apariția giardiozei, în special când diareea survine la animalele tinere.

Diagnosticul paraclinic se face prin identificarea trofozoizilor sau chisturilor în fecale, chisturile pot fi colorați, cel mai adesea cu iod. Kiturile de IFA utilizează anticorpii imunoclonali anti proteina din pereții chistici. Cea mai sensibilă metodă de diagnostic este PCR-ul care a fost utilizat inițial la genotiparea și identificarea diferitelor specii de *Giardia spp.*. Teoretic, limita de detecție a PCR-ului este de un chist, care permite să crească considerabil sensibilitatea de diagnostic. (Geurden T., 2007)



Producerea și rolul anticorpilor anti – *Giardia spp.* Șoarecii imunocompetenți infestați cu *Giardia muris* produc anticorpi împotriva trofozoizilor de *Giardia muris*. Este o dovadă că anticorpii joacă un rol important în imunitatea organismului. A fost demonstrat că odată cu introducerea trofozoizilor de *Giardia lamblia* în lumenul duodenal al șobolanilor își face apariția Ig A specifică.

Fenbendazolul are o eficiență mărită în tratamentul oral al giardiozei la o doză de 15mg pe kg 3 zile consecutiv. În cazul tratamentului cu Fenbendazol se observă lipsa modificării consistenței fecalelor, și dispariția simptomelor clinice. Totodată este întreruptă și eliminarea intermitentă a chiștilor. Cu toate acestea, infestația cu *Giardia duodenalis* este mai puțin severă în comparație cu coccidioza, care poate produce forme letale de boală. Trenarea bolii în grupurile de viței infestați poate dura până la 6 luni, sugerând faptul că *Giardia duodenalis* are un impact potențial major în fermele de bovine. (Appelbee A.J. și colab 2003, Santana M. și colab., 2012) Diferențele de spor corporal la vițeei tratați pentru *Giardia spp.* au fost de cca 3kg într-un interval de 4 săptămâni. (Geurden T. și colab., 2010)

Albendazolul, alături de fenbendazol poate fi folosit pentru tratarea vițeeilor. Fenbendazolul a contribuit la înlăturarea trofozoizilor și microvilii s-au refăcut la 7 zile de la aplicarea tratamentului. Chiar dacă se folosește un tratament eficient, reinfestările sunt destul de frecvente dacă sursa de contaminare persistă în mediu sau colectiv. Vacile lactante produc colostrum și lapte cu anticorpi anti-Giardia, astfel vițeeii cu vârste fragede sunt protejați, și astfel există potențialul pentru producerea unui vaccin. (Olson M.E. și colab., 2004)

Din cauza unei prevalențe crescute atât a *Giardia spp* și *Cryptosporidium spp.* în fermele de bovine din întreaga lume riscul transmiterii zoonotice este foarte mare. *Giardia spp.* prezintă specificitate de gazdă având cele 2 subtipuri zoonotice întâlnite la câini, pisici, viței și animale sălbatice. Există posibilitatea prezenței infecțiilor mixte cu *Cryptosporidium spp* al cărui rezervor principal rămân vițeeii. Copii reprezintă un grup cu risc crescut, igiena precară a fost indicată ca fiind un factor crucial. *Cryptosporidium spp.* și *Giardia spp.* pot fi transmise prin apă, fiind incluse sursele de apă potabilă, apele utilizate în scop recreativ cât și lacuri și râuri. În cazul contaminării cu *Giardia spp.* pot apărea episoade diareice.

Din punctul de vedere al sănătății publice, izolatele recoltate de la rumegătoare sunt morfologic și imunologic asemănătoare *Giardiei duodenalis* întâlnită la om. Cel mai mare risc zoonotic prezintă subtipul A și subtipul B. Studiile arată că aproximativ 20% din vițeeii sunt



infestați cu subtipul A. Aceasta ne îndrumă spre evaluarea riscului zoonotic fie prin contactul direct, fie prin contaminarea apelor de suprafață. (R.C. Andrew Thompson, 2000)

În urma studiilor de biologie moleculară, (PCR), au fost identificate genotipuri zoonotice de *Giardia* în fermele de bovine. (Trout J.M. și colab., 2006; O'Handley R.M. și colab., 2000)

Cryptosporidium spp. Infecțiile criptosporidiene au fost raportate pe întreg mapamondul. Din perspectiva sănătății umane, bovinele au fost implicate deseori ca sursă de contaminare cu speciile de *Cryptosporidium*. (Ortega G. și colab., 2009). Vițeei se pot infecta prin contaminarea oro-fecală dar este posibilă și calea vectorială (unelte, intermediul îngrijitorilor, păsări sau artropode). La vițeei cu vârste fragede principala sursă de contaminare o poate constitui mama. La fermele cu vaci pentru lapte, unde vițeei sunt crescuți în cușete individuale, este mai mică infestarea în comparație cu fermele cu vaci pentru carne, unde sistemul tehnologic implică cazarea cu mama, posibilitatea de contaminare. Trei specii de *Cryptosporidium* au fost identificate la vițee: *C. parvum* (59.4%), urmat de *C. bovis* (20.3%) and *C. ryanae* (9.8%). Infecțiile mixte *C. parvum/C. bovis* și *C. parvum/ C. ryanae* au reprezentat 9.8 %.(Josephine Su Yin, 2012). *C. parvum* este responsabil pentru aproximativ 85% din infecții la vițeei neîntărcați și doar 1% la cei întărcați. Schizogonia debutează prin consumul oochiștilor infectanți care conțin patru sporozoiți liberi și un corp rezidual. Odată ajuns în interiorul organismului gazdă, sub influența sucurilor gastrointestinale, are loc spargerea peretelui oochistului pe o singură parte numită zona de sutură, fiind eliberați sporozoiții. Spre deosebire de alte coccidii, care invadează enterocitele ei produc fuziunea și expansiunea microvililor rezultând înconjurarea parazitului cu o membrană dublă. (Hanna Borowski și colab., 2008). Macrogametocitul dă naștere unui macrogamet și zigot, care se transformă, în lumenul intestinal, în oochist, iar la eliminarea prin fecale este sporulat, conținând patru sporozoiți. Oochistul este rotund sau ușor oval, are dimensiuni medii de 5μm, cu o membrană dublă, iar cei patru sporozoiți sunt în formă bacilară sau de banană, de cca 1μm, așezați marginal, în formă de U. (Mitrea I.L., 2002)

Atrofia microvililor este cauzată de distrugerea enterocitelor și retracția microvililor în încercarea de a menține continuitatea barierei epiteliale. Hiperplazia criptică apare de asemenea ca un efort de a înlocui celulele epiteliale distruse. Astfel absorbția este modificată din cauza dispariției enterocitelor mature la nivelul microvililor și a funcției lor transportoare. Distrugerea celulelor absorbitive de la extremitatea microvililor și mărirea secreției clorului la nivelul



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELOR VÂRSTNICE
IMPTSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPOSDRU



USAMV Iași

criptelor conduce la o secreție accentuată. Totodată scade și suprafața totală absorbantă. (Andrew S și colab 2005)

Simptomele clinice sunt diareea și malabsorbția. Diareea poate fi moderată spre severă cu fecale gălbui apoase sau mucoide. Vițeii cu forme severe de boală pot avea nevoie de perioade mai lungi, de până la câteva săptămâni pentru a se refăce. Se crede că patogenitatea este mai diminuată la vițeii cu vârste mai mari din cauza intervenției proceselor imunologice. (Geurden T., 2007)

Examinarea microscopică se poate face fie direct fie cu colorare. Cele mai utilizate metode de colorare sunt metodele Ziehl-Neelsen și colorația cu carbolfuxină. Diferențele morfologice între speciile de criptosporidii sunt insesizabile, în câmpul microscopic pot apărea și alte componente ce conduc la un diagnostic greșit.

În comparație cu examinarea microscopică, tehnicile imunologice și PCR-ul oferă o sensibilitate crescută chiar și la concentrații scăzute de oochiști. Singurul medicament din România, înregistrat pentru tratamentul criptosporidiozei la viței, la ora actuală este lactatul de halofuginonă (Halocur, Intervet). Doza terapeutică a lactatului de halofuginonă variază în funcție de greutatea și scopul urmărit. În cazul tratamentului profilactic la vițeii care cântăresc 35-45 kg doza zilnică este de 8 ml cu aplicare timp de 7 zile, începând cu primele 24-48 ore după naștere. La vițeii cu greutate între 45-60 kg se recomandă administrarea a 12 ml Halocur. (Kalman I., 2010; Andrew S și colab. 2005)

Eimerioza bovină (cunoscută sub denumirea de diareea roșie) este produsă de diferite specii de eimerii dintre care cele mai patogene fiind *E. bovis* și *E. zuernii*. Contaminarea se realizează pe calea orală prin ingerarea oochisturilor odată cu apa sau furajele. Ciclul biologic are două faze de înmulțire, sexuată și asexuată. Coincide cu pătrunderea oochistului în tubul digestiv, unde sub acțiunea tripsinei și a bilei oochistul exchistează, eliminând sporozoiții. Coccidioza clinică este cel mai des cauzată de *Eimeria bovis* și *Eimeria zuernii* gameții acestor 2 specii patogene produc leziuni la nivelul intestinului gros, cauzând diareee severă sau chiar moartea. (Cornelissen W.C.A. și colab., 1995). Leziunile cele mai distructive se găsesc în ultimii 2 metri ai ileonului vițeilor examinați în ziua 19 postinfecție. Microvilii au fost scurtați, vârfurile fiind ulcerate. Lamina proprie a fost denudată și acoperită cu fibrină.



Simptomele clinice apar după o incubatie de până la 20 de zile, cu evoluții diferite: forma supraacută, acută, subacută și cronică, Animalele cu forme clinice de coccidioză prezintă întârzieri în creștere, aceste animale riscând să nu mai devină profitabile din punct de vedere economic. Chiar și coccidioza subclinică, de altfel mai puțin evidentă pentru fermieri sau veterinari poate afecta fiziologia intestinală și prin urmare conversia hranei și sporul de creștere al animalelor. Este acceptat faptul că eimerioza subclinică este mai pagubitoare economic, din cauza recurenței mai mari. (Daugeschies A. și colab., 2007) În urma testelor clinice s-a concluzionat că utilizarea Toltrazurilului pentru prevenirea coccidiozei este mai eficientă decât Diclazurilul, sulfamidin și amprol. (Mundt H.C. și colab., 2005; Mohamed M. Ghanem și colab., 2008).

Capitolul VI prezintă metodele utilizate în realizarea cercetărilor cu modificările aduse fiecăreia în vederea facilitării identificării protozoarelor parazite intestinale la tineretul bovin. Cea mai utilizată tehnică, McMaster, a fost modificată în vederea obținerii unui factor de sensibilitate mai mare (50 OPG). Spre deosebire de metoda descrisă de Cosoroabă (2002) și Mircean V (2010) cantitatea de fecale luată în calcul a fost de 4 grame.

Tehnica MiniFlotac® a fost dezvoltată de cercetătorii Universității *Federico II* din Napoli prin simplificarea metodei Flotac, metodă bazată pe flotație și translația părții superioare. În protocolul standard de operare furnizat de producători se recomandă utilizarea soluției hipersaline zaharată pentru identificarea oochiștilor de protozoarelor intestinale din fecalele de viței. Deoarece soluția zaharată are vâscozitatea mai mare și la translarea părții superioare a camerei MiniFlotac®, apar cu o incidență mai mare decât în cazul soluției hipersaline, bule de aer, care pot modifica cantitatea de soluție examinată.

Testul de imunofluorescență pentru identificarea giardiozei și criptosporidiozei se bazează pe utilizarea kitului comercializat de compania Merifluor, *Cryptosporidium/Giardia kit* (Meridian Diagnostics Inc., Cincinnati, Ohio) și prin modificarea metodei folosită de Xiao and Herd (1993). Prin standardizarea cantităților luate în calcul dintr-un test calitativ se obține o metodă cantitativă cu factorul de sensibilitate 50.

Datele privind prevalența protozoarelor, prezentate în **capitolul VII** al tezei, în partea de est a României au fost obținute prin realizarea a două studii din perioade diferite, 2010-2011 și 2013-2014, care au avut la bază principii de identificare a elementelor parazitare atât



clasice cât și moderne. Prevalența protozoarelor intestinale parazite a fost obținută prin analiza a trei genuri : *Eimeria spp.*, *Giardia spp.* *Cryptosporidium spp.* prin metode diferite.

Prevalența eimeriozei este constantă în fermele de bovine, atât din România, din Moldova în special cât și în fermele din Flandra, Belgia. Prin metoda Willis, prevalența eimeriozei a fost de cca 20%, fiind o metodă cu o sensibilitate scăzută, calitativă. După analiza eșantionelor recoltate din cele 16 ferme de pe teritoriul Moldovei prin mai multe metode diferite a rezultat: la McMaster 36,87%, iar la MiniFlotac® au fost 38,12%.

Datele obținute în perioada Octombrie 2010- martie-2011 au fost valorificate prin realizarea lucrării cu subiectul: "The prevalence of eimeria species in dairy farms from Romania" publicat în Revista de Lucrări Științifice a Facultății de Medicină Veterinară, Iași, 2014 Vol. 57(1-2):151-154,

Studiul pentru prevalența giardiozei s-a realizat în perioada iulie 2013- mai 2014, vițeii luați în studiu au avut vârste cuprinse între una și cinci luni. Din totalul de 140 de probe individuale recoltate de la viței 63 au fost pozitive, ceea ce semnifică o prevalență de 45% a parazitozei. Prevalența *Giardia spp.* a fost influențată și de modul de întreținere a vițeilor, din fermele cu țarcuri colective 42.66% au fost pozitive pe când vițeii din cușetele individuale au avut o rată mai mare a infestării: 47.69% .

Criptosporidioza este una din bolile cu evoluție la tineretul bovin manifestată clinic prin producerea diareei și dezechilibrelor metabolice. Asemănător infestațiilor cu *Giardia spp.* prevalența variază între 1-60%. Până la 90% din ferme sunt pozitive pentru *Cryptosporidium spp.* Diferențele sunt polifactoriale: tehnici de diagnostic, vârsta, numărul vițeilor, managementul fermei, dezinfecții. Din totalul de 140 de probe individuale recoltate de la viței un număr de 12 au fost pozitive, ceea ce semnifică o prevalență de 8,57% a probelor pozitive, dar în special datorită vârstei vițeilor, boala fiind mai des întâlnită la vițeii de 8-14 zile. În funcție de modul de întreținere a vițeilor, în țarcuri comune sau individuale rezultatele au fost următoarele: din totalul de 75 probe provenind din ferme cu țarcuri colective 4 (5.33%) au fost pozitive. Pe de cealaltă parte din totalul de 65 de probe din fermele cu cușete sau țarcuri individuale 8 (12.03 %) au fost pozitive.



Punctele de recoltare a probelor au fost vizitate în intervalul iulie 2013-mai 2014. Rezultatele arată că în lunile de iarnă apar niveluri crescute de giardioză (61.62%), nivelul eimeriozelor este constant 37,2% pe parcursul întregului an, iar infestația cu *Cryptosporidium* spp. prezintă cel mai mic nivel (8,13%) dintre protozoarele studiate.

Datele preliminare obținute pe parcursul realizării cercetărilor au fost comunicate la în Revista de Lucrări Științifice a Facultății de Medicină Veterinară, Timișoara Vol. XLVII (3), 120-124 - 2014 ISSN: - 1221-5295, cu lucrarea” Preliminary research on the parasitic complex of *Eimeria*, *Giardia* and *Cryptosporidium* in young cattle from northern Moldavia”

Prevalența crescută a protozoarelor parazite intestinale la viței, confirmată atât de datele din literatura de specialitate cât și de datele obținute din cercetările proprii ne-au îndemnat la încercarea de îmbunătățirea metodelor deja existente (prin creșterea factorului de sensibilitate), dar și prin o încercare de scădere a costurilor.

Lucrarea cu datele despre prevalența protozoarelor parazite la viței din Moldova a fost prezentată la cel de al 53-lea simpozion științific al Facultății de Medicină Veterinară, intitulat: "Spre o sănătate globală" și publicat în Revista de Lucrări Științifice a Facultății de Medicină Veterinară, Iași, 2014 Vol. 57(1-2):146-150, intitulat "The distribution of the parasitic complex of *Eimeria*, *Giardia* and *Cryptosporidium* in housed calves from Moldavia"

Pentru realizarea metodelor de flotație costurile sunt doar de consumul de apă și sare (cu excepția achiziției inițiale a camerelor de flotație). Realizarea probelor compozite reprezintă o altă modalitate prin care diagnosticul este obținut mai rapid și facil. Aceste îmbunătățiri avantajează atât personalul din laboratoarele de specialitate cât și pe fermier prin scăderea costurilor de analiză și a timpului de așteptare a rezultatelor. Studiile anterioare au arătat că Flotac are cea mai mare sensibilitate 66,7% în comparație cu McMaster 41,7%, pentru depistarea ouălelor de strongili gastro-intestinali din probele compozite. Este nevoie completarea literaturii cu studii privind posibilitatea utilizării metodelor nou dezvoltate (în special MiniFlotac®) în diagnosticul parazitar la bovine.(Boscol și colab.,2014)

Capitolul VIII prezintă îmbunătățiri ale metodelor de recoltare și analiză a probelor de fecale în vederea identificării protozoarelor intestinale la viței. Prevalența crescută a protozoarelor parazite intestinale la viței, confirmată atât de datele din literatura de



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELOR VÂRSTNICE
IMPLIMENTAT



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSDRU



USAMV Iași

specialitate cât și de datele obținute din cercetările proprii ne-au îndemnat la încercarea de îmbunătățirea metodelor deja existente (prin creșterea factorului de sensibilitate), dar și prin o încercare de scădere a costurilor. Pentru realizarea metodelor de flotație costurile sunt date doar de consumul de apă și sare (cu excepția achiziției inițiale a camerelor de flotație). Realizarea probelor compozite reprezintă o altă modalitate prin care diagnosticul este obținut mai rapid și facil. Aceste îmbunătățiri avantajează atât personalul din laboratoarele de specialitate cât și pe fermieri prin scăderea costurilor de analiză și a timpului de așteptare a rezultatelor. Studiile anterioare au arătat că Flotac are cea mai mare sensibilitate 66,7% în comparație cu McMaster 41,7%, pentru probele compozite. Fiind nevoie de completarea literaturii cu studii privind posibilitatea utilizării probelor compozite cu metodele nou dezvoltate (MiniFlotac®) în diagnosticul parazitar la bovine am recurs la realizarea studiului. MiniFlotac® este o metodă bazată de asemenea pe flotabilitatea elementelor parazitare. Această metodă inovativă a fost dezvoltată de cercetătorii de la Universitatea Federico II din Napoli, Italia și a derivat din simplificarea metodei FLOTAC®. Pe lângă flotabilitate metoda se mai bazează și pe translația părții superioare a soluției de examinat.

În mod uzual stabilirea intensității infestațiilor se face prin analiza individuală a probelor, însă aceasta este consumatoare de timp și materiale, fiind foarte costisitoare în cazul efectuării unui studiu de amploare. O alternativă este analiza probelor *compozite*, de diferite dimensiuni. O practică comună este cea în care fermierul administrează un tratament vițelilor contra eimeriozei, dar fără a face o eventuală verificare a statusului parazitar, nici înainte și nici după tratament. Cauze ale acestei practici pot fi prețul crescut necesar examinării individuale, timpul de așteptare. Folosirea probelor compozite va permite scăderea prețului și astfel încât examinarea să fie la îndemâna fermierilor și a medicilor veterinari practicieni. Datele obținute au fost analizate cu ajutorul programului Excel, unde au fost calculate 2 valori statistice „coeficientul Pearson” și „P value”. În majoritatea situațiilor indicele de corelație Pearson s-a încadrat între valorile 0,900607 și 0,999809. Atunci când avem o legătură strânsă între cele 2 variabile, cu direcția pozitivă și formă lineară există o asocierie pozitivă puternică.

În mod particular în cazul graficului la comparația între media valorilor individuale analizate prin McMaster și proba compozită 10 rezultată din aceleași eșantioane, P value este de 0,0000182 iar factorul pearson este de 0,90175303. În comparație cu rezultatele obținute la graficul Fig.7.13.(comparația între media valorilor individuale analizate prin MiniFlotac®)



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELOR VÂRSTNICE
IMPLINTE



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSDRU



USAMV Iași

și proba compozită 10 rezultată din aceleași eșantioane unde atât P value este 0 cât și coeficientul pearson este de 0,981194479 rezultă faptul că la formarea probelor compozite din 10 eșantioane individuale se recomandă o metodă de diagnostic cu sensibilitate crescută, în cazul nostru MiniFlotac® . O a doua situație diferită apare în cazul probelor compozite de 10 eșantioane individuale pentru *Giardia spp.* coeficientul pearson de 0,565754138 și P value de 0,02235909 corelația fiind una rezonabilă chiar dacă este pozitivă în comparație cu P5 *Giardia spp.* unde coeficientul pearson este de 0,900607 și P value este 0. Astfel se recomandă utilizarea P5 în cazul probelor compozite *Giardia spp.* la bovine analizate prin IFA.

În cazul criptosporidiozei atât la P5(0,999809) cât și la P10 (0,999974508) avem valori apropiate de limita maximă în această situație rezultatul poate să indice o corelație foarte înaltă cu o relație foarte strânsă între variabile sau poate indica o eroare. Ținând cont că prevalența criptosporidiozei a fost foarte mică nu putem să afirmăm că aceasta (P5/P10)este o metodă fiabilă. Se recomandă refacerea testării cu recoltarea de probe de la viței cu vârste sub o lună, pentru a obține un număr mai mare de probe pozitive.

Concluzii finale

1. Prevalența eimeriozei în cele 36 de ferme de vaci atât pentru lapte cât și de carne este de 20,6% conform rezultatelor studiului efectuat între Octombrie 2010 și Martie 2011. Speciile predominante au fost *Eimeria bovis* 12,99%, și *Eimeria zuernii* 3,38%
2. Prevalența medie a eimeriozei în cele 16 ferme de vaci de lapte din Moldova este de 37%, conform datelor rezultate din studiul efectuat în intervalul iulie 2013-mai 2014.
3. Prevalența giardiozei în cele 16 ferme de vaci de lapte din Moldova este de 45%. În funcție de modul de întreținere al vițelilor, în țarcuri comune sau individuale, prevalența a fost cu 5,03 % mai mare în cazul întreținerii individuale (47,69%) față de 42,66% la vițelii din țarcuri comune.
4. Prevalența criptosporidiozei la vițelii cu vârste între o lună și 5 luni în fermele de unde s-au recoltat probele a fost de 8,57%. La fel ca în cazul giardiozei, vițelii din sisteme de creștere individuală au înregistrat o prevalență mai crescută (12,03%).
5. Eimerioza este o boală constantă în fermele de pe tot teritoriul României cu mici fluctuații sezoniere și influențate de metoda de diagnostic.
6. Giardioza vițelilor apare iarna în procent de 61,62%% iar primăvara în procent de 27,77%



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELOR VÂRSTNICE
IMPROBATE



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSDRU



USAMV Iași

7. Dinamica sezonieră a criptosporidiozei ne arată că boala evoluează cu precădere primăvara(13.88%).
8. MiniFlotac este o metodă inovativă cu sensibilitate mai mare decât a metodei McMaster.
9. *Metoda probelor compozite* funcționează atât pentru probe compuse din 5 eșantioane individuale cât și pentru probe compozite formate din 10 eșantioane.
10. Când infestațiile au niveluri mai scăzute se recomandă utilizarea metodelor de diagnostic cu sensibilitate crescută (MiniFlotac, *Flotac*) .
11. Metoda probelor compozite 5 are o sensibilitate mai mare decât metoda probelor compozite 10 și este recomandată utilizarea metodei MiniFlotac, deoarece se obțin rezultate mai concludente în comparație cu metoda McMaster.
12. Identificarea giardiilor prin metoda imunofluorescenței se poate face și prin metoda probelor compozite 5 sau 10.
13. Prevalența criptosporidiozei a avut valorile cele mai scăzute în comparație cu eimerioza și giardioza.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELOR VÂRSTNICE
IMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



USAMV Iași