

REZUMAT

Teza de doctorat intitulată **”CERCETĂRI PRIVIND FILARIOZELE LA CÂINE ÎN MOLDOVA”** a avut ca motivație creșterea prevalenței filariozelor la câine în ultimii ani. Datorită potențialului zoonotic al acestor helminți am considerat utilă cercetarea și îmbunătățirea metodelor morfologice, serologice și moleculare de diagnostic al filariozelor, în special ale dirofilariozei și relevanța aplicării acestora în diagnosticul dirofilariozei la câine și la om în Moldova.

Teza este structurată în două părți conform normelor uzuale: prima parte care este dedicată unui studiu al tematicii cu date actuale din literatura de specialitate și partea a-II-a, care vizează cercetările proprii.

Rezultatele lucrării sunt ilustrate printr-o iconografie originală, cu figuri și tabele explicative clare și relevante.

În prima parte, intitulată **„Stadiul actual al cunoașterii”**, se prezintă un studiu bibliografic cu privire la răspândirea geografică a filariozelor, fiind inserate date despre ecologia și epidemiologia acestor helmintoze cu transmitere vectorială la câine și la om. Informațiile obținute în urma efectuării acestui studiu au fost utilizate ulterior în elaborarea, interpretarea și compararea rezultatelor obținute în cercetările proprii.

Primul capitol, intitulat **„Importanța filariozelor la câine”** este destinat unei scurte descrieri privind principalele filarioze ce evoluează la câine, prezentarea unor date importante privind epidemiologia și răspândirea geografică a dirofilariozei la câine, date curente despre utilizarea tratamentului termic în diagnosticul dirofilariozei la câine, precum și descrierea pe scurt a ciclului biologic al speciilor ce determină evoluția acestei zooantroponoze.

În capitolul II, intitulat **„Aspectul zoonotic al dirofilariozei: importanța dirofilariozei la om”**, se realizează o trecere în revistă a datelor despre aspectele clinice ale dirofilariozei pulmonare și subcutanate la om, fiind descrise epidemiologia, diagnosticul și răspândirea geografică a dirofilariozei.

Într-un subcapitol sunt prezentate aspectele clinice ale infestației cu *Dirofilaria immitis* și *Dirofilaria repens*, cu localizările caracteristice fiecărei specii, iar într-un alt subcapitol sunt prezentate aspectele de epidemiologie a bolii, arătând -conform datelor din literatură- caracterul endemic al bolii în bazinul mediteranean până în jurul anilor 2000, ulterior acestei perioade fiind înregistrată o extensie și în alte zone considerate non-endemice.

Într-un alt subcapitol sunt descrise aparte, metodele de diagnostic utilizate la om, avînd în vedere caracterul zoonotic al bolii. Sunt arătate procedurile esențiale care trebuie respectate pentru confirmarea bolii și anume o colectare adecvată a probelor și o identificare corectă a agentului patogen, lucru valabil și pentru diagnosticul bolii la animale. Se descriu atît metodele invazive, precum puncția biopsică a nodulului parazitar, dar și metodele alternative de diagnostic molecular, imunohistochimic ori serologic (ELISA și Western Blott), ținînd cont și de posibila interferență antigenică ca răspuns a prezenței și a altor helminți ai omului cum ar fi cei din genurile *Toxocara*, *Ascaris*, *Echinococcus*.

Motivația acestei abordări rezidă în faptul că literatura de specialitate raportează o cazuistică în creștere, dar care nu reprezintă de fapt adevărata evoluție a bolii în zonele rurale și urbane, impunându-se o reevaluare a acestor date -ceea ce am încercat și noi, în acest demers științific. Este necesară continuarea investigațiilor atît pentru om cît și pentru animale, întrucît prin cross-overul epidemiologic realizat de noi rezultă că există zone în care este prezentă dirofilarioza la om dar nu sunt deloc relatate cazuri care să evolueze la animale și invers.

Partea a-II-a „**Cercetări proprii**” este compusă din 6 capitole în care sunt prezentate și discutate rezultatele cercetărilor efectuate.

Capitolul III „**Distribuția și epidemiologia dirofilariozei (*Dirofilaria immitis*) la câinii din adăposturi din estul României**” este un studiu realizat în partea de est a României pentru a evalua prevalența și distribuția geografică a infecției cu *Dirofilaria immitis* la câine. Au fost colectate probe de plasmă de la 458 de câini găzduiți în adăposturi din 8 județe și testați serologic pentru prezența antigenului *D.immitis*. Studiul de față a arătat rezultate negative în județele Botoșani, Suceava, Neamț, Bacău și Vrancea. De asemenea, au fost examinate 45 de probe de sânge de la câinii dintr-un adăpost din municipiul Galați, folosind metoda Knott modificată și tehnica multiplex-PCR (reacția de polimerizare în lanț). Testul imunoenzimatic a arătat o prevalență a infecției cu *D. immitis* de 8,9%. Valorile de densitate optică (DO) obținute pentru probele pozitive au variat între 0,217 și 2,683. Au fost utilizate sisteme de informare geografică (GIS) pentru a efectua suprapuneri ale hărților de distribuție a prevalenței *D. immitis* și hărți predictive bazate pe temperaturi optime necesare perioadei de incubație extrinsecă a dirofilariozei. Cea mai mare prevalență obținută în acest studiu s-a constatat în partea central-estică până la granița de nord a țării, și anume în județul Galați (60%), urmat de județele Vaslui (12,0%) și Iași (7,7%). Din 45 de probe examinate cu ajutorul metodei Knott, 23 au fost pozitive pentru microfilarii circulante

(51,1%), în timp ce 19 au fost pozitive pentru *D. immitis* și 4 au fost pozitive atât pentru *D. immitis*, cât și pentru *D. repens*, folosind testul multiplex-PCR. Prevalența ridicată a speciei *D. immitis* din zona de sud-est (Galați - 42,2%), folosind de asemenea tehnica multiplex-PCR, a oferit o susținere puternică pentru rezultatele obținute cu ajutorul testelor serologice. Studiul de față confirmă capacitatea sistemelor de informare geografice de a identifica distribuția și epidemiologia dirofilariozei în diferite teritorii geografice, astfel cum a fost deja demonstrat prin intermediul datelor epidemiologice empirice obținute la nivel continental, național și inter-regional.

Capitolul IV intitulat „**Prognoza dirofilariozei în estul României pe baza modelului matematic ET30**” prezintă un studiu în care s-a utilizat un model matematic bazat pe regim termic pentru a estima distribuția dirofilariozei în partea de est a României în următorii 20 de ani. Calcularea unităților HDUs (Heartworm Development Units) a fost realizată utilizând valorile temperaturilor maxime, medii și minime zilnice, în intervalul de timp 1 ianuarie 1961 - 30 iunie 2016, înregistrate în stațiile meteorologice principale din zona Moldovei, partea de est a României (Botoșani, Bacău, Iași și Galați pentru zona de deal și podis, iar Ceahlău – Toaca pentru zona de munte înalt).

Studiul prezintă următoarele rezultate: gruparea valorilor termice pe anotimpuri arată că vara sunt îndeplinite condițiile optime de dezvoltare a larvei infestante (L3) în corpul țânțarilor, în aproape toate zilele, iar primăvara și toamna nu avem 30 zile consecutive în care se pot acumula unitățile (HDU), însă larva infestantă (L3) se poate dezvolta și în aceste perioade deoarece poate rezista în corpul vectorului dacă zilele cu temperaturi optime alternează cu temperaturii extreme.

În perioada de iarnă nu este posibil să se acumuleze suficiente unități (HDU) pentru a se dezvolta agentul patogen. Estimările pentru anii 2035, obținute utilizând modelul ET30, arată aceeași creștere și în următorii 20 ani, cu o valoare de 1,1°C. Datorită creșterii temperaturii în anii 2035 durata de incubare extrinsecă a dirofilariozei se va micșora cu aproximativ 5 % / an.

Scăderea semnificativă se va înregistra primăvara și toamna cu aproximativ 6,5 %. Aceasta reprezintă o scădere a perioadei de incubare extrinsecă a dirofilariozei cu 1-2 zile ceea ce duce la o creștere a generațiilor de Dirofilaria în țânțar precum și răspândirea semnificativă a infecției în zona de studiu. Aceasta înseamnă o creștere a prevalenței și o posibilă extindere de areal pentru *Dirofilaria spp.*

În capitolul V intitulat “**Efectul tratamentului de încălzire (heat treatment) asupra serului provenit de la câini infectați în mod natural cu *Dirofilaria repens* și *D. immitis***” sunt prezentate rezultatele aplicării tratamentului termic în diagnosticul serologic al câinilor cu dirofilarioză cardiopulmonară și subcutanată. Prelevarea probelor de ser s-a realizat de la o populație de câini expusă în mod natural la infecția cu *D. immitis* și *D. repens*. Probele de ser au fost testate pentru prezenta antigenului *Dirofilaria immitis* înainte și după tratamentul termic. Din cei 194 de câini testați pentru antigenul *D. immitis*, 16 caini (8,2%) au răspuns pozitiv înainte de aplicarea tratamentului termic și 52 caini (26,8%) au răspuns pozitiv după aplicarea tratamentului termic. Din cei 108 câini testați prin metoda Knott, 24 de câini (22,2%) au fost depistați cu microfilarii circulante. După identificarea ulterioară cu ajutorul tehnicii multiplex-PCR a probelor pozitive la Knott rezultatele au fost: șase câini infectați cu *D. immitis*, 12 câini infectați cu *D. repens* și 5 infectați cu ambele specii. 50 % din câinii cu microfilarii circulante de *D. immitis* au răspuns pozitiv la testul de depistare a antigenului înainte și după tratamentul termic, în timp ce restul de 50% au răspuns pozitiv numai după tratamentul termic. 60% din câinii cu infecții mixte *D. Immitis/D. repens* au răspuns pozitiv la testul de depistare a antigenului înainte și după tratamentul termic, în timp ce restul de 40% au răspuns pozitiv numai după tratamentul termic. Testul de depistare a antigenului pentru *D. immitis* la cei 12 câini infectați numai cu microfilarii de *D. repens* a avut rezultate contradictorii. Doar doi câini (16%) au răspuns negativ atât înainte cât și după tratamentul termic. La șase câini (50%) rezultatul testului a devenit pozitiv după tratamentul termic, iar la patru câini (30%) rezultatul testului a fost pozitiv atât înainte cât și după tratamentul termic. În urma acestui studiu putem deduce că rezultatul fals negativ pentru testul de depistare a antigenului *D. immitis* poate fi inversat prin tratarea termică a probei de ser și câinii infectați cu *D. repens* pot avea de asemenea, o infecție ocultă cu *D. immitis*.

Capitolul VI intitulat “**Investigații serologice privind dirofilarioza la om în România și în Republica Moldova**” relatează următoarele date: în perioada decembrie 2014 -martie 2015, s-a realizat un screening serologic cu participarea a 450 de pacienți: 187 pacienți din România (Galați, București, Bacău, Iași) și 263 pacienți din Republica Moldova. Vârsta subiecților participanți se încadrează în intervalul 7-78 ani și dintre aceștia 166 sunt bărbați și 284 sunt femei. Serul pacienților s-a utilizat pentru identificarea răspunsului anticorpilor IgG la antigenul ce provine din extracția adulților *Dirofilaria immitis* și *D. repens*.

Raportându-ne la județele din România în care s-a desfășurat screeningul, seroprevalența a fost 6% în județul Bacău, 7% în județul Galați,

2.3% în județul Iași și de 18,2% în București. Seroprevalența dirofilariozei pentru pacienții din Republica Moldova a fost de 9.1% (n=236)

Testul t pentru eșantioane independente a arătat că nu există o diferență semnificativă statistic a vârstei medii între cele două grupuri. Astfel, atât pacienții pozitivi la IgG anti-*D. immitis* (M=50,31 ani) cât și cei negativi (M=47,10) au o vârstă medie apropiată. Prin urmare, vârsta nu reprezintă un factor predispozant pentru transmiterea infecției cu *D. immitis* la om.

Având în vedere că în Republica Moldova nu sunt raportate date despre dirofilarioza la câine, iar studiul de față confirmă prezența dirofilariozei la om prin metode imunologice, sunt necesare studii serologice și anchete epidemiologice care să ateste și să identifice prevalența parazitozei la câine și implicit evaluarea reală a riscului zoonotic al acestei boli

Rezultatul testului t pentru eșantioane independente a arătat deasemenea, că vârsta medie nu diferă semnificativ statistic între grupul de pacienți care au răspuns pozitiv la IgG anti-*D. repens* și grupul de pacienți fără răspuns la IgG anti-*D. repens*. Prin urmare, putem afirma că vârsta nu este un factor predispozant nici pentru infecția cu *D. repens* la om.

Analizând relația dintre gen și prezența răspunsului IgG anti-*D. immitis* și anti-*D. repens* la pacienții luați în studiu, putem observa repartiția echilibrată între cele două sexe. Prin urmare, nu se constată o prevalență mai mare în cazul unuia dintre sexe, sexul nefiind un factor predispozant pentru infecția cu *Dirofilaria spp.* la om.

. Rezultatele studiului confirmă impactul zoonotic al bolii pe teritoriul României și pe teritoriul Republicii Moldova. Având în vedere că rezorvorul bolii este reprezentat de câinii microfilariemici iar boala este transmisă prin țânțari sunt necesare programe de monitorizare și control a vectorilor și a câinilor în ambele teritorii: România și Republica Moldova în vederea diminuării riscului zoonotic al bolii.

Capitolul VII intitulat **“Investigații privind tabloul clinic și diagnosticul oncocercozei la câine în România”** descrie prima raportare a infestației cu *Onchocerca lupi* la câine în România. Acest studiu prezintă tabloul clinic a trei câini infestați cu *Onchocerca lupi*: o femelă, Ciobănesc German de 4 ani din Târgoviște, un mascul, rasă mixtă 5 ani din Târgoviște și un mascul de 6 ani, rasă mixtă din Iași. Pacienții au fost aduși la clinică datorită unor conjunctivite cu secreții oculare excesive. La examenul oftalmologic aceștia au prezentat următoarele leziuni oculare: primul caz: conjunctivită moderată, cu prezența de viermi subțiri albi pe suprafața conjunctivei, dinspre unghiul interior al ochiului, blefarospasm, iar secrețiile lacrimale erau mucopurulente, cu efect de aglutinare a blănii. Pe unghiul exterior al OS (ochiul stâng) a fost observat un nodul subconjunctival de aproximativ 0,5 cm în diametru; cazul doi: secreții

mucopurulente, conjunctivită moderată și o masă la nivel conjunctival de 1,2 cm în diametru. OD (ochiul drept) nu prezenta aspecte anormale și starea generală a pacientului era bună și în cazul al treilea: hiperemie conjunctivală, secreții mucopurulente și congestie episclerală vasculară. S-a observat prezența unui nodul episcleral la ambii ochi, caracterizat prin prezența mai multor mase individuale elevate, provenind de sub conjunctiva bulbară (situate bilateral, în limbul lateral sau dorsolateral). Nodulii au fost îndepărtați chirurgical, la două săptămâni distanță, mai întâi la OD, apoi la OS. Două luni mai târziu, a fost constatată o recidivă la OS. Câinele a fost adus înapoi pe fondul ftofobiei, hiperemiei conjunctivale pronunțate și a secrețiilor purulente. La un control atent al fundului de sac conjunctival inferior, s-a extras sub anestezie locală un vierme lung, de formă spiralată. La examinarea microscopică, viermii recoltați de la cei doi câini erau femele mature, cu uter dublu conținând numeroase microfilarii lipsite de teacă. Femelele adulte prezentau cuticula relativ groasă, compusă din două straturi distincte. Pe scurt, stratul exterior avea creste cuticulare de forma unor proeminențe rotunde aflate la distanțe egale, cu aceeași dimensiune și formă, iar stratul intern era striat, cu o striație sub fiecare creastă și una între crestele adiacente, specifică speciei cu *Onchocerca lupi*. Studiul prezent confirmă răspândirea speciei în partea de est a Europei. Parazitoza este extrem de importantă atât pentru câine cât și pentru om, având în vedere, că riscul zoonotic al acesteia a fost confirmat de alții autori în unele regiuni din Europa și în (USA) Statele Unite ale Americii.

Capitolul VIII cuprinde **Concluziile generale** și unele recomandări care rezultă în urma realizării studiilor din componența tezei.

Lucrarea se încheie cu prezentarea revistei bibliografice cu titluri din literatura de specialitate română și străină utilizate pe parcursul cercetărilor