



UEFISCDI



SINTEZA privind rezultatele obținute în etapa 2011 – a proiectului de cercetare încheiat între USAMVB Timișoara, Facultatea de Medicină Veterinară și Ministerul Educației Cercetării, Tineretului și Sportului, **Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI)**

Contract: Nr. 116 / 28.07.2010

Cod CNCIS: TE_277

Comisia: 4

Titlul proiectului:

CERCETĂRI PRIVIND EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSTICUL ȘI CONTROLUL UNOR HEMOPARAZITOSE LA CÂINI

Faza 2011: Cercetări asupra etiologiei, prevalenței hemoparazitozelor la câini în sud vestul și vestul României, cartarea speciilor identificate și evaluarea patogenității hemoparaziților asupra gazdelor.

Director de proiect: Asist. univ. dr. **Marius Stelian ILIE**

Echipa de cercetare: dr. **Kalman IMRE**, drd. **Ionela HOTEA**, drd. **Mirela IMRE**

VALOAREA PROIECTULUI APROBATA - 750000 LEI

Perioada de derulare - 36 luni – 2010 - 2013

Valoarea fazei 2011 a contractului: 217160 LEI

Contact:

Director proiect: Asist. univ. dr. **Marius ILIE**
e-mail: marius.ilie@fmyt.ro; telefon: 0256277190
mobil: 0745534336, 0764702372

DEVIZ CADRU 2011

NR. CRT	DENUMIRE CAPITOL BUGET	VALOARE 2010 (lei)
1.	CHELTUIELI DE PERSONAL** <i>max. 60% din bugetul proiectului</i>	92160
2.	CHELTUIELI INDIRECTE (regie) <i>max. 10% din bugetul proiectului</i>	21716
3	MOBILITATI <i>(se asigura participarea la stagii de documentare-cercetare in tara si in strainatate, participari la manifestari stiintifice nationale si internationale)</i>	30000
4.	CHELTUIELI DE LOGISTICA <i>(infrastructura de cercetare, cheltuieli materiale, diseminare etc)</i>	73284
5.	PRIMA DE INSTALARE <i>max 170.000 lei (doar pentru tinerii cercetatori ce revin in tara</i>	0
	TOTAL	217160

Obiectiv 1. Cercetări asupra etiologiei hemoparazitozelor la câini în sud-vestul României 3

- a. Investigații etiologice în babesioza canină în zona de sud-vest a țării prin tehnica de colorare Diff-Quick 3
- b. Investigații etiologice în dirofilarioza canină în sud-vestul României prin tehnici uzuale de diagnostic și tehnici imunoenzimaticice 3
- c. Investigații etiologice în babesioza, erlichioza, anaplasmoza și borelioza canină în zona de sud-vest a țării prin tehnica imunofluorescenței indirecte 3

Obiectiv 2. Determinarea prevalenței hemoparazitozelor la câini în sud vestul și vestul României și cartarea speciilor identificate 4

- a. Screening seroepidemiologic prin tehnica imunofluorescenței indirecte asupra răspândirii hemoparazitozelor la câini în zona de vest și sud-vest a României 4
- b. Screening epidemiologic asupra răspândirii dirofilariozei canine în zona de vest și sud-vest a României 4

Obiectiv 3. Evaluarea patogenității hemoparaziților asupra gazdelor 4

- Determinarea profilului hematologic și profilului biochimic la câini în infestația cu hemoparaziți 4

Contact:

Director proiect: Asist. univ. dr. Marius **ILIE**
e-mail: marius.ilie@fmyt.ro; telefon: 0256277190
mobil: 0745534336, 0764702372

Obiectiv 1. Cercetări asupra etiologiei hemoparazitozelor la câini în sud-vestul României

a. Investigații etiologice în babesioza canină în zona de sud-vest a țării prin tehnica de colorare Diff-Quick

Pe parcursul anului 2011 au fost investigați un număr de 130 de câini, suspecți de babesioză, proveniți din 15 localități ale județelor Caraș-Severin, Mehedinți, Gorj, Dolj și Olt. Câinii au avut vârste cuprinse între 7 luni și 13 ani și au fost de sexe diferite (78 femele și 52 masculi). Fiecare animal investigat a prezentat unul sau mai multe simptome specifice babesiozei cum ar fi febra, hemoglobinuria, icterul și anemia. De la fiecare animal s-a recoltat probă de sânge pe anticoagulant (EDTA). În decurs de cel mult 12 ore, materialul biologic a fost prelucrat în vederea identificării babesilor, în laboratorul disciplinei de Parazitologie și Boli Parazitare.

Diagnosticul de babesioză s-a pus prin observarea directă la microscopul optic (ob.x100) a protozoarului în frotiul de sânge colorat Diff-Quick.

b. Investigații etiologice în dirofilarioza canină în sud-vestul României prin tehnici uzuale de diagnostic și tehnici imunoenzimatic

Cercetările au fost realizate pe un efectiv de 414 câini proveniți din 28 de localități a 7 județe din sud-vestul României. De la fiecare animal s-a recoltat o probă de sânge în vacutainere de 3 ml cu anticoagulant (EDTA). În vederea evidențierii microfiliariilor de *Dirofilaria* spp. probele de sânge au fost prelucrate utilizând examenul direct între lamă și lamelă. Ulterior, probele în care s-au găsit microfiliarii au fost colorate histochimic cu fosfataza acidă și prin metoda Knott modificată, în scopul diferențierii speciilor de dirofilarii pe baza caracterelor morfologice. Mai mult, tot ca test de diferențiere între *Dirofilaria immitis* și *Dirofilaria repens*, s-a utilizat testul Snap® 4DX ca metodă rapidă imunologică calitativă bazată pe principiul sandwich imunocromatografic. Acest test identifică antigenele circulante ale femelelor gravide de *D. immitis*.

c. Investigații etiologice în babesioza, erlichioza, anaplasmoza și borelioza canină în zona de sud-vest a țării prin tehnica imunofluorescenței indirecte

În perioada ianuarie – decembrie 2011 au fost investigați 414 câini aparent clinic sănătoși (asimptomatici) proveniți din 28 de localități ale județelor Caraș-Severin, Mehedinți, Hunedoara, Gorj, Dolj, Olt și Vâlcea. De la fiecare animal s-a recoltat probă de sânge în vacutainere sterile, care au fost ținute la temperatura camerei pentru exprimarea serului/plasmei prin sedimentare liberă. În momentul recoltării prin interviu, despre fiecare animal, s-au obținut date suplimentare cu privire la proveniență (214 câini din mediul urban și 200 de câini din mediul rural), rasă (278 de metiși și 136 de rasă pură), vârstă (81 de câini ≤1 an; 134 de câini de la 1 până la ≤3 ani; 103 câini de la 3 până la ≤6 ani; 96 cu vârstă de peste 6 ani) sex (212 femele și 202 masculi). Tot în acest caz proprietarii au fost întrebați dacă animalul a avut vreodată contact cu căpușe (în 148 de situații da respectiv în 266 de situații nu). După obținere, materialul biologic a fost depozitat în tuburi Eppendorf de 1.5 ml și păstrat la temperatura de congelare până în momentul prelucrării. Probele au fost prelucrate în vederea identificării unor agenți etiologici hemoparazitari (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* și *Borellia burgdorferi* sensu lato), prin tehnica imunofluorescenței indirecte, în laboratorul disciplinei de Parazitologie și Boli Parazitare, a Facultății de Medicină Veterinară Timișoara.

Pentru fiecare animal luat în studiu s-au făcut investigații pentru toți cei patru, posibili agenți etiologici menționați anterior. În vederea realizării scopului propus, s-a utilizat kit-ul MegaScreen® FLUOVET® (Diagnostic MegaCor, GmbH) conform instrucțiunilor din prospect.

Pe ansamblu, screeningul etiologic efectuat prin tehnica imunofluorescenței indirecte a demonstrat un parazitism cu *B. canis*, *B. gibsoni*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* și *B. burgdorferi* sensu lato.

Contact:

Director proiect: Asist. univ. dr. Marius ILIE
e-mail: marius.ilie@fvmv.ro; telefon: 0256277190
mobil: 0745534336, 0764702372

Obiectiv 2. Determinarea prevalenței hemoparazitozelor la câini în sud-vestul și vestul României și cartarea speciilor identificate

a. Screening seroepidemiologic prin tehnica imunofluorescenței indirecte asupra răspândirii hemoparazitozelor la câini în zona de vest și sud-vest a României

În vederea realizării scopului propus au fost investigați 608 câini asimptomatici proveniți din 51 de localități ale județelor Arad (4 localități), Bihor (5 localități), Timiș (8 localități), Caraș-Severin (8 localități), Hunedoara (5 localități), Mehedinți (2 localități), Dolj (4 localități), Gorj (5 localități), Olt (4 localități) și Vâlcea (6 localități). De la fiecare animal s-a recoltat probă de sânge în vacutainere sterile, care au fost menținute la temperatura camerei pentru exprimarea serului/plasmei prin sedimentare liberă. După obținere, materialul biologic a fost depozitat în tuburi Eppendorf de 1,5 ml și păstrat, la temperatura de congelare, până în momentul prelucrării. Probele au fost prelucrate în vederea identificării unor agenți etiologici hemoparazitari (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* și *Borellia burgdorferi sensu lato*), prin tehnica imunofluorescenței indirecte, în laboratorul disciplinei de Parazitologie și Boli Parazitare, Timișoara. Pentru fiecare animal luat în studiu s-au făcut investigații pentru toți cei patru agenți etiologici menționați anterior. În momentul recoltării prin interviu cu proprietarii, despre fiecare animal, s-au obținut date suplimentare cu privire la proveniență (339 de câini din mediul urban și 269 de câini din mediul rural), rasă (415 de metiși și 193 de rasă pură), vârstă (115 de câini ≤1 an; 195 de câini de la 1 până la ≤3 ani; 150 câini de la 3 până la ≤6 ani; 148 cu vârstă de peste 6 ani) și sex (313 femele și 295 masculi). De asemenea, proprietarii au fost întrebați dacă animalul a avut vreodată contact cu căpușe (în 229 de situații *da* respectiv în 379 de situații *nu*).

Pentru serodiagnosticul babesiozei, ehrlichiozei și boreliozei s-a utilizat kit-ul MegaScreen® FLUOVET® (Diagnostik MegaCor, Austria, GmbH). Kitul conține mai multe lame (slideuri), fiecare cu 10 microgodeuri specifice pentru un agent etiologic de cercetat. Slideurile conțin în godeurile marcate eritrocite canine fixate și infectate cu specii de babesii (*B. canis* sau *B. gibsoni*), monocite infectate cu *E. canis*, neutrofile parazitare cu *A. phagocytophilum* sau antigene fixate de *Borellia*. Modul de lucru a urmat pașii înscrși în instrucțiunile de utilizare a kit-ului. Fiecare slide a fost examinat la microscopul (Motic-031) cu posibilități de examinare în lumină ultravioletă (fluorescentă) prin reflexie sau transmisie cu sistem de filtre adecvat fluorocromului conținut de conjugat. Reacția pozitivă (complexul antigen-anticorp) a fost marcat de apariția unei culori având o nuanță de verde crud sau verde gălbui pe un fond negru. Interpretarea rezultatelor s-a făcut prin comparație cu martorul pozitiv și negativ.

Prelucrarea statistică a datelor s-a făcut cu ajutorul programului Minitab 16 Statistical Software (Minitab, Inc., 2011), iar diferențele de prevalență între diferitele grupuri investigate au fost considerate semnificative când valoarea lui *p* a fost mai mică sau egală cu 0.05.

b. Screening epidemiologic asupra răspândirii dirofilariozei canine în zona de vest și sud-vest a României

Cercetările au fost realizate pe un efectiv de 608 câini proveniți din 51 de localități a 10 județe din vestul și sud-vestul României. De la fiecare animal s-a recoltat probă de sânge în vacutainere de 3 ml cu anticoagulant (EDTA). În vederea evidențierii microfiliariilor de *Dirofilaria* spp. probele de sânge au fost prelucrate prin examenul direct între lamă și lamelă. Ulterior, probele în care s-au găsit microfiliarii au fost colorate histochimic cu fosfataza acidă și prin metoda Knott modificată, în scopul diferențierii speciilor de dirofilarii pe baza caracterelor morfologice. Mai mult, tot ca test de diferențiere între *Dirofilaria immitis* și *Dirofilaria repens*, s-a utilizat testul Snap® 4DX ca metodă rapidă imunologică calitativă bazată pe principiul sandwich imunocromatografic. Acest test identifică antigenele circulante ale femelelor gravide de *D. immitis*.

Obiectiv 3. Evaluarea patogenității hemoparaziților asupra gazdelor

Determinarea profilului hematologic și profilului biochimic la câini în infestația cu hemoparaziți

Studiul a fost efectuat pe probe de sânge recoltate de la câini, infestați natural cu *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. și *Dirofilaria* spp., surprinse în faza acută a bolii, din 15 rase diferite, cu vârsta cuprinsă între opt luni și 11 ani, 16 masculi și 9 femele.

Contact:

Director proiect: Asist. univ. dr. Marius ILIE
e-mail: marius.ilie@fmyt.ro; telefon: 0256277190
mobil: 0745534336, 0764702372

Sângele a fost recoltat din vena jugulară în vacutainere, cu anticoagulant (EDTA) și fără anticoagulant. Pentru profilul hematologic au fost determinați următorii parametri: hematocrit (Ht), hemoglobina (Hb), numărul de eritrocite (E), volumul eritrocitar mediu (VEM), hemoglobina eritrocitară medie (HEM), concentrația în hemoglobină eritrocitară medie (CHEM), coeficientul de variație a dimensiunii eritrocitelor (RDW), trombocitele (PLT), numărul de leucocite (L), procentul de neutrofile, limfocite, monocite, eozinofile și bazofile. Hematocritul s-a determinat prin centrifugare la 12000 rpm în tuburi capilare (micrometodă). Calculul indicilor eritrocitari a fost efectuat după formulele clasice¹: $VEM (MCV) = \frac{Ht \times 10}{E}$; $HEM (MCH) = \frac{Hb \times 10}{E}$; $CHEM (MCHC) = \frac{Hb \times 100}{Ht}$

Pentru profilul biochimic probele de sânge au fost prelucrate cu ajutorul aparatului Vet Screen. S-au determinat: bilirubina totală (BT), lipaza, albuminele, creatinina, GGT – ul (gamaglutamil transferazei), GOT-ul (aspartat amino transferaza = AST), GPT-ul (alanin amino transferaza = ALT), fosfataza alcalină, proteinele totale. Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul programului Microsoft Office Excel.

În cele ce urmează sunt puse în discuție modificările clinicopatologice întâlnite în hemoparazitoze și consecințele asupra gazdelor raportate la literatura de specialitate din domeniu. În babesioza canină cele mai comune modificări hematologice sunt anemia și trombocitopenia. Anemia normocitară și normocromă apare de obicei în babesioza produsă de speciile de babesii mari. Severitatea anemiei este strâns legată de specia de babesie implicată, cele mai severe cazuri fiind asociate cu *B. canis rossii*. Anemia hemolitică este indusă de fiziunea binară intraeritrocitară a trofozoizilor. Secundar anemia hemolitică mediată imun deteriorează eritrocitele câinilor. Prezența în ser a factorului hemolitic a fost descris în infecția cu *B. gibsoni*.

Cele mai întâlnite modificări ale eritrocitelor sunt anisocitoza și poikilocitoza. Pe lângă acestea se mai întâlnesc policromazia, hipocromia, eritroblastoza, dar și normocitoza și ortocromazia.

În mod compensator, organismul reacționează, fie prin creșterea numărului de celule active la nivelul măduvei hematogene prin expansiunea măduvei roșii în cavitățile oaselor, fie prin scurtarea timpului necesar pentru producerea unui eritrocit matur funcțional. În condiții normale pentru organism, eritronului îi este caracteristică o anumită constanță între comportamentul de producere, aflat în măduva hematogenă (compartimentul de exploatare funcțională din sânge) și cel în care are loc destrucția (dominant în splină și ficat). Modificările apărute în rapoartele stabilite între compartimente și în special, în raportul producere/distrugere, determină intervenția rapidă a mecanismelor de reglare a homeostaziei, dominate de activitatea eritropoietinei. Măduva osoasă hematogenă are capacitatea de a înlocui, în orice moment, de cca 7-8 ori, eritrocitele distruse sau pierdute în circulația sanguină periferică.

În diversitatea extrem de mare a stărilor patologice, atât din punct de vedere etiologic, cât și patogenetic, cercetarea valorilor leucocitemiei cantitative și calitative joacă un rol esențial, dar rareori specific. Modificările leucocitare trebuie, în mod obligatoriu, să fie clasificate în: modificări ale organelor hematopoietice cu caracter reactiv-reacțional și modificări esențiale, de plus sau minus producție. Modificările cantitative și calitative ale leucocitelor (scăderi, creșteri, apariția de forme imature, forme cu structuri alterate etc.) oglindesc diferite faze ale luptei și adaptării la condițiile nou create de acțiunea agenților patogeni.

În **anaplasmoză**, unele studii precizează că hematologic se observă trombocitopenia severă, prezentă la aproximativ 80% din cazuri, limfopenie, apoi limfocitoză și mai rar, neutropenie. Uneori, poate fi observată o ușoară anemie nonregenerativă. Din punct de vedere biochimic, fosfataza alcalină este crescută și sunt prezente hipoalbuminemia și hiperfibrinogenemia. Hipoalbuminemia dispăre odată cu febra.

Semnele clinice ale bolii apar în faza bacteremică a infecției, iar durata și severitatea acestora variază în limite largi. Tabloul clinic, polimorf și nespecific, include: febra, letargia, anorexia, dureri musculare și dificultate în mers, vomă, diareea, poliartrita, splenomegalia, limfadenopatia și anemia. De asemenea, adițional, mai pot apărea șchiopăturile și durerile articulare. Rar, pot fi observate probleme la nivelul căilor respiratorii (ca tusea, tahipneea) sau la nivelul sistemului nervos central, cum ar fi: meningita, ataxia sau alte manifestări neurologice nespecifice.

În **babesioză** severitatea semnelor clinice este strâns legată de gradul de replicare al parazitului în eritrocitele gazdei, de liza celulară produsă, precum și de patogenitatea tulpinii de *Babesia* infectantă.

Din punct de vedere hematologic, în infecțiile cu *Babesia* spp., s-au constatat prezența anemiei hipocrome-normocitare, policromastiei, neutropeniei, anizocitozei, leucocitozei neutrofile, monocitozei, limfopeniei și trombocitopeniei. La analiza hemogramei s-au constatat prezența anemiei hemolitice

¹ Ht – hematocrit, Hb – hemoglobină, MCV=VEM -volumul eritrocitar mediu, MCH=HEM-hemoglobina eritrocitară medie, MCHC=CHEM-concentrația în hemoglobina eritrocitară medie.

Contact:

Director proiect: Asist. univ. dr. Marius ILIE
e-mail: marius.ilie@fvmv.ro; telefon: 0256277190
mobil: 0745534336, 0764702372

regenerative, scăderea volumului celular total și trombopenie. Severitatea anemiei poate varia în linii largi, iar în unele cazuri, numărul total de eritrocite poate scădea până la $1,7 \times 10^6/\text{mm}^3$. Volumul leucocitar total poate fi scăzut sau crescut. În infecția cu *B. gibsoni* modificările leucogramei sunt nespecifice, deși a fost observată neutropenie tranzitorie severă.

După administrarea tratamentului trombocitemia, numărul total de leucocite și hematocritul au crescut zilnic, ajungând la valorile de referință în patru zile.

Din punct de vedere metabolic, s-a observat creșterea ALT, bilirubinei și ureei, precum și hipoglicemie. Tulburările acido-bazice sunt relativ comune în babesioza severă, cu prezența acidozei metabolice și alcalozei respiratorii. Combinația acidozei metabolice cu hipoglicemia și hiperlactemia este un indicator al hipoxiei tisulare. De asemenea, s-a mai constatat prezența azotemiei renale, anemiei imuno-mediate și pigmenturiei.

Boala de Lyme este o afecțiune inflamatorie multisistemică, afectând sistemele reticuloendoteliale, cardiovascular, nervos, central și osos. Cazurile diagnosticate în prezentul contract sunt animale serologic pozitive, ceea ce înseamnă că nu au fost surprinse cazuri acute de boală. Majoritatea câinilor infectați sunt normali din punct de vedere clinic. Semnele clinice se manifestă doar până la 5% dintre câinii expuși la *B. burgdorferi*.

La câine, boala poate apărea de la două până la cinci luni din momentul inoculării agentului patogen. În faza de debut apare hipertermia ($39,5-40,5^\circ\text{C}$), acompaniată de letargie, anorexie și adinamie. Deseori, la locul înțepăturii se poate observa o maculă roșie destul de discretă.

Dirofilarioza cardiovasculară evoluează diferit, de la un caz la altul, cronic, subclinic, cu manifestări polimorfe, sub formă de sindroame fiind strict legată de gradul de infestație, reactivitatea individuală și efortul depus de câine.

Evoluția dirofilariozei este dependentă de o multitudine de factori. Dacă câinii nu sunt supuși efortului este posibilă o supraviețuire îndelungată. Uneori boala se agravează progresiv, cu anemie, hematurie, albuminurie și moarte în 6-18 luni. Animalele supuse unui efort intens (câini de vânatoare, cei dresați pentru diferite servicii și cei de la stâne) pot muri după o evoluție rapidă, prin insuficiență cardiacă.

Modificările clinicopatologice asociate **infecției cu Ehrlichia canis** variază mult de la un animal la altul și sunt influențate de rezistența organismului, de statusul imun al gazdei și de rasă. De obicei, faza acută a infecției trece neobservată, iar simptomele sunt foarte slabe pentru ca proprietarii să solicite examen medical. Printre puținele simptome nespecifice se numără letargia, febra, anorexia, pierderi în greutate, la care se asociază morfopatologic splenomegalia și limfadenopatia generalizată. În majoritatea cazurilor, boala se diagnostică în faza cronică.

Semne hemoragice cum ar fi epistaxisul, melena, hemoragia peteșială, echimoza, hemoragia retinei sau hematuria se observă în 25% până la 60% din cazuri. Uveita anterioară, perturbări ale retinei sau modificări neurologice sunt observate ocazional.

Paraclinic, anemia nonregenerativă este identificată în majoritatea cazurilor. Celulele albe pot scădea în limitele sau sub limitele normale la câinii cu ehrlichioză. Deși hiperglobulinemia nu a fost raportată în mod repetat, a fost observată în majoritatea cazurilor. Alte modificări ale serului, găsite cu regularitate, includ hipoalbuminemia, scăderea fosfatazei alcaline și concentrației alanil transaminazei. Proteinemia poate să apară independent sau în mod concurent cu glomerulonefrita.

În concluzie se poate spune că modificările clinico patologice, la câini, în hemoparazitoze, depind foarte mult de specia de patogen implicată, de imunitatea gazdei, vârstă, boli intercurrente și zona geografică de proveniență, fiind cunoscut ca patogenitatea speciilor variază cu sușa sau subspecia implicată.

Datorită evoluției subclinice sau cu simptomatologie ștearsă, caracteristică unor hemoparazitoze, boala poate trece neobservată, proprietarii nu efectuează vizita la medicul veterinar, nefiind solicitate examene de specialitate. În consecință aceste animale scapă supravegherii epidemiologice sau complicită epidemia bolii fiind surse importante de patogeni.

Contact:

Director proiect: Asist. univ. dr. Marius ILIE
e-mail: marius.ilie@fvmv.ro; telefon: 0256277190
mobil: 0745534336, 0764702372