

REZUMAT

CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE PRIVIND INFECȚIA CU *Anaplasma phagocytophilum* LA CABALINE ÎN ROMÂNIA

Doctorand: BOGDAN Andreea-Monica

**Conducător științific: Prof. univ. Dr. IONIȚĂ Mariana
Dipl. EVPC**

**CUVINTE CHEIE: *Anaplasma phagocytophilum*; agenți patogeni transmiși de
căpușe; anaplasmoză granulocitară; epidemiologie; cabaline; România**

Anaplasma phagocytophilum - agent patogen transmis de căpușe Ixodidae, manifestă specificitate largă de gazdă și potențial zoonotic, infectând o gamă variată de animale domestice și sălbatice. Acest patogen este cunoscut de mai bine de 80 de ani în medicina veterinară și mai recent fiind recunoscut și în patologia umană (Gordon și col., 1940; Chen și col., 1994). Infecția cu *A. phagocytophilum* determină febra de căpușe la rumegătoare și anaplasmoza granulocitară la animale (cabaline, câini și pisici) și om (Heikkilä și col., 2010; Stuen și col., 2013). Având în vedere caracterul zoonotic al speciei *A. phagocytophilum*, este necesară investigarea apariției acesteia la animalele care au contact frecvent cu oamenii, printre care se numără și cabalinele.

Anaplasmoza granulocitară la ecvine poate evolua de la o boală cu semne clinice nespecifice, la o boală cu complicații fatale, fiind posibilă înregistrarea de pierderi economice date de investigațiile și tratamentele complexe (Boni și col., 2009; Nowicka și col., 2022). Cercetările privind această infecție la cabaline din diferite regiuni geografice și diferite sisteme de creștere, prezintă o mare importanță în practica veterinară, întrucât ar permite diagnosticarea adecvată a cazurilor cu simptome nespecifice, astfel încât să se administreze un tratament adecvat pentru a se evita complicațiile.

În România, *A. phagocytophilum* a fost detectată molecular în căpușe și la unele animale domestice și sălbatice. Până în prezent, nu s-au raportat studii cu privire la infecția cu *A. phagocytophilum* la cabaline în România. Astfel, cunoscând interesul mare pentru cabaline în România, acestea fiind crescute atât în gospodăriile oamenilor, cât și în herghelii de stat și particulare (cluburi de echitație, hipoterapie) este necesară și de un real interes studierea bolilor transmise de căpușe care ar putea afecta starea de sănătate a acestor animale dar și a oamenilor, în cazul bolilor cu risc zoonotic.

Cabalinele au o relație strânsă cu oamenii, iar prin supravegherea infecțiilor cu caracter zoonotic la aceste specii de animale, s-ar supraveghea și o parte din bolile raportate în patologia umană.

În acest context, cercetările cuprinse în prezenta teză de doctorat au vizat contribuții la studiul epidemiologiei infecției cu *A. phagocytophilum* la cabaline din România, cu următoarele obiective specifice: (i) investigarea expunerii la infecția cu *A. phagocytophilum* la cabaline din diferite regiuni geografice ale României și diferite sisteme de creștere (herghelii și gospodării ale populației) prin screening serologic; identificarea potențialilor factori de risc asociați; (ii) studiu privind tabloul clinic, modificările patologice, tehnici de diagnostic și management terapeutic în formele clinice de anaplasmoză granulocitară la cabaline; (iii) optimizarea și testarea prin metode de biologie moleculară bazate pe tehnica PCR, pentru confirmarea infecției cu *A. phagocytophilum* la cabaline în România.

Structura tezei de doctorat respectă Normele de redactare ale Școlii Doctorale de Medicină Veterinară - UȘAMV București și cuprinde șapte capitole incluse în cele două părți: Partea I – *Studiu bibliografic*, format din trei capitole (reprezentând aproximativ 25%) și Partea a II-a – *Cercetări proprii*, prezentate în patru capitole (reprezentând aproximativ 75%). Lista bibliografică conține 250 de titluri relevante tezei, iar anexele tezei cuprind 23 de tabele și 40 de figuri.

În **prima parte** a tezei de doctorat (capitolele I-III) sunt sintetizate informații actualizate privind specia *A. phagocytophilum* și infecția cu acest agent patogen la animalele domestice. Astfel, în capitolele I și II sunt prezentate *date privind taxonomia și caracteristicile morfo-biologice ale speciei A. phagocytophilum*, cuprinzând și o scurtă sinteză a prevalenței acestui agent patogen la vectori și animale sălbatice din România. În capitolul III sunt sintetizate informații actuale cu privire la *epidemiologia, patogeneza și evoluția clinică a infecției cu A. phagocytophilum la animalele domestice*, incluzând date generale și *caracteristici epidemio-clinice* ale acestei infecții la ecvine, bovine, ovine, canide și feline. Aceste informații cuprinse în *Studiul bibliografic* au fundamentat planul de cercetare aferent tezei de doctorat, ca bază pentru realizarea studiilor, precum și pentru analiza și interpretarea rezultatelor obținute.

În **partea a doua** sunt prezentate **cercetările proprii** în patru capitole (IV-VII) ce descriu studiile efectuate conform planului de cercetare și obiectivelor propuse. Astfel, pentru fiecare studiu sunt descrise *Materialele și metodele de lucru, Rezultatele* obținute, *Discuții, Concluzii* parțiale și generale, care sunt prezentate sintetic pe capitole.

Capitolul IV prezintă investigațiile serologice efectuate în vederea evaluării epidemiologiei infecției cu *Anaplasma phagocytophilum* și cu alți agenți patogeni transmiși de căpușe la cabaline din diferite regiuni geografice ale României (Nord, Centru și Sud-Est) și diferite sisteme de creștere. Studiul a inclus 223 de cabaline din cinci județe (Bistrița-Năsăud - în Nord; Brașov, Sibiu - în Centru; Buzău, Călărași - în Sud-Est), crescute în herghelii (n=118) și gospodării ale populației (n=105). Animalele

au avut vârste cuprinse între 8 luni și 26 de ani (medie 9 ani; DS=5,4); alocate în 3 categorii de vârstă, astfel: <5 ani (n=65); 5-10 ani (n=81); >10 ani (n=77). În ceea ce privește sexul și rasa, screening-ul serologic a fost efectuat atât la femele (n=135), cât și la masculi (n=88), de rasă pură (n=113) și metiși (n=110).

Investigațiile serologice au fost efectuate cu ajutorul unui kit ELISA (IDEXX Laboratories, Inc.), care permite detectarea simultană a Ac anti-*Anaplasma phagocytophilum*, anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato și anti-*Ehrlichia* spp. - agenți patogeni transmiși de căpușe. Rezultatele testelor serologice au evidențiat o seroprevalență totală de 26,0% (58/223 cabaline au fost pozitive pentru cel puțin unul din patogenii testați; IC 95%: 20,38-32,29%); 22,9% au prezentat infecții unice, iar 3,1% - infecții mixte, din care 2,7% cu 2 patogeni (*A. phagocytophilum* și *B. burgdorferi* s.l.), și 0,5% (un cal) cu toți cei 3 patogeni testați.

În ceea ce privește *A. phagocytophilum*, 10,3% (23/223; IC 95%: 6,7-15,1%) cabaline au fost seropozitive, din care 7,2% (n=16) au prezentat infecții unice, și 3,1% (n=7) - infecții mixte. Valorile medii de seroprevalență înregistrate la animalele din cele trei regiuni au variat de la 5,0% (în Nord) la 11,7% (în Sud-Est). Caii din gospodării au prezentat o seroreactivitate mai mare (14,3%; 15/105), comparativ cu cei din herghelii (6,8%; 8/118). De asemenea, ratele de infecție au fost mai mari la caii cu vârste de peste 10 ani (13,0%), comparativ cu tineretul cabalin (7,7% pentru caii cu vârste <5 ani), la masculi comparativ cu femele (13,6% versus 8,1%) și la caii metiși comparativ cu cei de rasă (13,6% versus 7,1%), dar cu diferențe ne semnificative statistic.

În plus, 18,8% (42/223; IC 95%: 13,92-24,6%) dintre cabalinele testate au fost seropozitive pentru *B. burgdorferi* s.l. și 0,5% (1/223; IC 95%: 0,01-2,5%) pentru *Ehrlichia* spp. Seroreactivitatea cabalinelor la infecția cu *B. burgdorferi* s.l. a fost corelată cu sistemul de creștere, sexul și rasa, înregistrându-se rate mai mari de infecție la caii din gospodării, la masculi (29,5% versus 11,9%, la femele) și la caii metiși (27,3% versus 10,6%, la caii de rasă), probabil în urma unei expuneri mai îndelungate la căpușe și la patogenii transmiși de acestea.

În **capitolul V** este prezentat un studiu de tip meta-analiză cu privire la tabloul clinic, modificările patologice, tehnici de diagnostic și management terapeutic în formele clinice de anaplasmoză granulocitară descrise la ecvine. Astfel, au fost investigate 189 de cazuri clinice (raportate în perioada 1994-2022, în 31 de publicații) pentru care a fost confirmată infecția cu *A. phagocytophilum* prin diferite metode de diagnostic. Cazurile clinice de anaplasmoză granulocitară la ecvine au fost diagnosticate în Europa (67,20%), Asia (15,34%), America (12,70%) și Africa (4,76%). Cele mai multe cazuri au fost raportate în Suedia (23,81%), urmată de SUA (11,11%), Spania (9,52%), Germania și Pakistan (8,47% fiecare).

Formele clinice de anaplasmoză granulocitară au fost raportate la cai (94,71%; n=179), măgari (3,17%; n=6) și catâri (2,12%; n=4), la animale cu vârste de la 4 luni la 30 de ani (94/189). În ceea ce privește sexul și rasa, atât masculii (55/83; 66,27%), cât

și femelele (28/83; 33,73%), de rasă pură (33/38; 86,84%) și metiși (5/38; 13,16%), au prezentat forme clinice de infecție cu *A. phagocytophilum*.

Animalele au manifestat o simptomatologie complexă în infecția cu *A. phagocytophilum*. Cel mai frecvent au fost raportate semne clinice precum febră (90,30%; 121/134), edemul membrelor (48,51%), anorexie (41,79%), apatie (32,84%), icter (22,39%), ataxie (17,91%), tahicardie (16,42%) și letargie (15,67%). Rabdmioliză și efuziuni cavitare au fost observate la unul și, respectiv, 2 cazuri, iar moartea unui cal a fost raportată consecutiv unei anaplasmoze cerebrale cronice. Principalele modificări evidențiate de investigațiile paraclinice au inclus trombocitopenie (90,32%; 84/93), anemie (75,00%; 30/40), hematocrit scăzut (70,59%; 24/34), leucopenie (55,88%; 19/34), limfopenie (58,14%; 25/43), neutropenie (41,67%; 10/24), hiperbilirubinemie (68,97%; 20/29), hiperfibrinogenemie (13/15; 86,67%) și hiponatremie (10/10; 100,00%). În cazul cu rabdmioliză s-au observat mioglobinurie și proteinurie. Anaplasmoza cerebrală cronică, descrisă la un cal, a determinat moartea acestuia.

Infecția cu *A. phagocytophilum* la cazurile cu forme clinice a fost confirmată prin examen microscopic, teste serologice, izolare și metode moleculare. În urma examenului microscopic, s-au raportat 88,44% (153/173) probe pozitive, la care morulele au fost observate în principal în frotiuri de sânge (75,16%) și concentrat leucocitar (20,92%), colorate cel mai frecvent prin metoda Giemsa (58,17%). Testele serologice au relevat anticorpi anti-*A. phagocytophilum* la 66,67% (56/84) din cazurile clinice, atât în faza acută a bolii – 60,71% (62,75% prin IFAT, 23,53% prin IFAT plus Western Blot, 5,88% prin ELISA și 5,88% prin ELISA plus IFAT) cât și în faza cronică – 5,95% (2/5 pozitive prin IFAT). Agentul patogen a fost izolat într-un singur caz (1/189; 0,53%). Cu ajutorul tehnicilor moleculare s-au raportat 98,36% (120/122) probe pozitive, prin: PCR convențional (77,50%), real-time PCR (17,50%) și PCR-RLB (5,00%); markerii genetici au fost, în principal, genele *16S rRNA* și *msp2*.

În ceea ce privește managementul terapeutic, 77,01% (67/87) din cazuri au fost tratate pentru anaplasmoză, 12,64% au primit tratament nespecific înainte de diagnostic, iar 10,34% s-au recuperat fără terapie. Pentru tratament, cel mai frecvent au fost administrate oxitetraciclină (52,24%; 35/67) și tetraciclină (14,93%). Ameliorarea semnelor clinice s-a observat la 10-12h după tratament (16/45; 34,56%), în 24-48 h (19/45; 42,22%) și la/după 3 zile (2/45; 4,44%). Recuperarea completă a fost raportată pentru 54,55% (24/44) din cazuri, la 12 h până la 8 luni după tratament.

Capitolul VI descrie optimizarea și testarea unei metode de biologie moleculară bazată pe tehnica Real-Time PCR pentru detectarea moleculară a ADN-ului de *A. phagocytophilum* în probe de sânge de la cabaline (România). Pentru aceasta, probele de ADN genomic extras și purificat din sânge integral de la cabaline au fost testate prin tehnica Real-Time PCR pentru detectarea moleculară a celor trei biovariante de *A. phagocytophilum* (*phagocytophilum*, *equi* și agentul cauzal al anaplasmozei granulocitare umane). Într-o primă etapă s-a procedat la optimizarea

metodei. Consecutiv aplicării protocolului de amplificare (s1 x 1: 50°C - 2 min; s2 x 1: 95°C - 10 min; s3 x 45: 60°C - 1 min) au fost obținute curbe de amplificare la ambele controale pozitive, cu valoarea Ct-CP1= 26,9092 și Ct-CP2=27,4285, în timp ce pentru ambele controale negative nu s-au obținut curbe de amplificare. Aceste rezultate au permis validarea metodei, întrucât pentru ambele controale pozitive valoarea Ct<45, conform cu recomandările producătorului pentru validarea metodei. Ulterior, metoda a fost folosită pentru testarea a 23 de probe de la ecvine seroreactive pentru infecția cu *A. phagocytophilum*; consecutiv reacției RT-PCR s-a obținut amplificare, într-o primă etapă, la o probă, amplitudinea curbei de amplificare fiind însă sub amplitudinea CP. Pentru confirmare se impune analiză genetică, motiv pentru care se va proceda, într-o etapă ulterioară, la amplificare prin PCR convențional și secvențiere, folosind markeri genetici specifici. Metoda astfel optimizată poate fi utilă în studii clinice ulterioare pentru confirmarea infecției cu *A. phagocytophilum*, în special în infecții acute la animale cu semne clinice de suspiciune.

Capitolul VII cuprinde *Concluziile generale și recomandările* exprimate ca urmare a coroborării și analizei rezultatelor obținute în urma efectuării studiilor incluse în prezenta teză de doctorat cu cele mai recente studii din domeniu. Astfel, rezultatele studiilor confirmă expunerea naturală la infecția cu *A. phagocytophilum* a cabalinelor în zonele investigate, din România, subliniind importanța studiilor de screening serologic privind infecțiile cu agenți patogeni transmiși de căpușe, precum și importanța implementării programelor adecvate de supraveghere și control pentru bolile determinate de aceștia. În plus, întrucât ecvinele pot dezvolta simptomatologie și modificări patologice variate în infecția naturală cu *A. phagocytophilum*, se evidențiază importanța unei bune cunoașteri, bazată pe evidențe, privind tabloul clinic, modificările patologice, diagnosticul și managementul terapeutic în anaplasmoza granulocitară la cabaline, necesitatea includerii acestora în diagnosticul diferențial la animalele cu simptomatologie de suspiciune și aplicarea de măsuri adecvate de terapie și prevenție.

În concluzie, prin rezultatele studiilor aferente prezentei teze de doctorat se aduc contribuții la cunoașterea științifică cu privire la eco-epidemiologia infecției cu *A. phagocytophilum* la cabaline în România - studiu în premieră - precum și contribuții cu valoare practic-aplicativă pentru medicii veterinari practicieni, respectiv oferirea de soluții fundamentate pentru provocările legate de confirmarea diagnosticului, abordarea terapeutică și măsurile adecvate de control în anaplasmoză granulocitară la cabaline. În plus, aceste rezultate contribuie la dezvoltarea unor noi direcții de cercetare în domeniul bolilor transmise de căpușe la cabaline în România, domeniu de mare relevanță națională și internațională, în acord cu contextul actual al schimbărilor climatice care influențează răspândirea vectorilor și a agenților patogeni transmiși de aceștia.