
Studiu epidemiologic privind evoluția unor endoparazitoze la bubalinele din nord-vestul României

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Bărburaș Diana Ancuța**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Vasile Cozma**

Membru titular al Academiei de Științe Agricole și Silvicultură București



REZUMAT

În ciuda scăderii populației de bubaline în ultimii 40 de ani, România se situează pe locul doi în ceea ce privește populația de bubaline în Europa, după Italia (BORGHESE, 2005; BORGHESE, 2013). Populații de bubaline se găsesc în special, în Transilvania (Nord-Vest), unde au fost înregistrate pentru prima dată în secolul al XVII-lea (KOS, 1975).

Bubalinele sunt crescute în mod tradițional în România pentru producția de lapte și carne și într-o măsură mai mică pentru tracțiune. Laptele de bivol prezintă interes pentru investiție și cercetare în multe țări, datorită conținutului mare de nutrienți pe care îi are (AMARJIT și TOSHIHIKO, 2003). Se situează pe locul doi în lume, după laptele de vacă, constituind astfel peste 12% din producția mondială de lapte (CNIEL, 2002). Având în vedere implicațiile asupra sănătății și potențialul economic al bivoliilor, investigațiile privind infestațiile parazitare prezintă o relevanță considerabilă (RINALDI și colab., 2007; VENEZIANO și colab., 2007).

Bolile parazitare, prin particularitățile lor evolutive, cu manifestări clinice șterse, dar cu evoluție tot mai mare în efectivele de animale, unele dintre acestea prezentând și caracter zoonotic, determină pierderi economice însemnate.

Paraziții produc tulburări locale și generale, mortalitate, care duce la pierderi economice importante în rândul efectivelor de animale. Infestațiile parazitare constituie o problemă importantă în efectivele de bubaline, cu implicații atât asupra morbidității cât și a mortalității la animalele afectate și riscul de transmitere al unor paraziți la om. Astfel bolile parazitare ocupă un rol important în ceea ce privește afectarea stării de sănătate a animalelor și împiedică sporul în greutate al animalelor, cât și producțiile acestora. Condițiile climatice locale, practicile de creștere a animalelor și pășunatul determină în mare măsură incidența și gravitatea diferitelor boli parazitare într-o anumită zonă (ALAM și colab., 2016).

Prevalența endoparazitozelor în sistemul gospodăresc este mai mare deoarece acolo există o sursă permanentă de contaminare (RADOSTITS și colab., 1994). Creșterea bubalinelor în ferme ar putea fi o metodă de profilaxie care ar putea duce la scăderea numărului de animale contaminate, și de asemenea ar trebui acordată o atenție deosebită și deparazitărilor.

Un control parazitologic în efectivele de animale cu rol în reducerea frecvenței și intensității infestațiilor parazitare este necesar pentru menținerea unor efective sănătoase și cu productivitate ridicată.

Teza de doctorat intitulată " Studii privind endoparazitozele la bubalinele din Nord-Vestul României" cuprinde mai multe cercetări privind prevalența parazitozelor la bubalinele din Nord-Vestul României.

Elementele de originalitate ale acestei lucrări sunt conferite de studierea din punct de vedere epidemiologic a parazitozelor prezente la bubalinele crescute în sistemul gospodăresc și fermă, din Nord-Vestul României, precum și efectuarea corelațiilor și diferențelor statistice a rezultatelor obținute în cadrul examenelor serologice, coproparazitologice și de biologie moleculară.

Teza este structurată în două părți: prima parte intitulată "Stadiul actual al cunoașterii", conține date bibliografice găsite în literatură de specialitate și alte lucrări publicate, iar partea a II-a intitulată "Cercetări proprii", detaliază activitatea de cercetare și toate rezultatele obținute de-a lungul perioadei de studii doctorale.

Prima parte a tezei, intitulată "Stadiul actual al cunoașterii", se extinde pe 7 capitole și conține date generale din literatura de specialitate, despre parazitozele studiate în această teză. Pentru întocmirea acestor capitole, au fost efectuate studii de documentare, utilizând diverse surse: articole științifice, cărți, teze de doctorat, tratate de specialitate, reviste, precum și o serie de informații web recente. Fiecare capitol al primei părți prezintă informații privind impactul acestor parazitoze asupra sănătății bubalinelor.

Capitolul I al acestei teze prezintă aspecte generale privind endoparazitozele la bubaline.

Capitolul II este împărțit în 3 subcapitole, în care sunt descrise aspecte privind etiologia (încadrare taxonomică, morfologie, ciclul biologic) patogeneza și tablou clinic și metode de diagnostic pentru *Giardia duodenalis*.

Capitolul III este împărțit în 3 subcapitole, în care sunt redată aspecte privind etiologia (încadrare taxonomică, morfologie, ciclul biologic) patogeneza și tablou clinic și metode de diagnostic pentru *Cryptosporidium* spp..

Capitolul IV este împărțit în 3 subcapitole, în care sunt descrise aspecte privind etiologia (încadrare taxonomică, morfologie, ciclul biologic) patogeneza și tablou clinic și metode de diagnostic pentru *Eimeria* spp.

Capitolul V este împărțit în 3 subcapitole, în care sunt prezentate aspecte privind etiologia (încadrare taxonomică, morfologie, ciclul biologic) patogeneza și tablou clinic și metode de diagnostic pentru *Toxoplasma gondii*.

Capitolul VI este împărțit în 3 subcapitole, în care sunt descrise aspecte privind etiologia (încadrare taxonomică, morfologie, ciclul biologic) patogeneza și tablou clinic și metode de diagnostic pentru *Neospora caninum*.

Capitolul VII al primei părți este împărțit în 3 subcapitole, în care sunt descrise aspecte privind etiologia (încadrare taxonomică, morfologie, ciclul biologic) patogeneza și tablou clinic și metode de diagnostic pentru *Toxocara vitulorum*.

Partea a doua a tezei, intitulată "Cercetări proprii", este compusă din 4 capitole în care sunt prezentate și discutate rezultatele cercetărilor efectuate.

Primul capitol (II.1) a avut ca obiectiv determinarea prevalenței infecției cu *Toxoplasma gondii* la bubalinele din Nord-Vestul României. Studiul a fost realizat prin prelevarea de probe de sânge de la 197 animale provenite din sistemul gospodăresc și 74 de probe de țesut prelevate din abator. Vârsta animalelor a variat de la 2 săptămâni până la 300 de luni (25 de ani), cu o medie de 84.4 ± 77.6 luni ($7 \pm 6,5$ ani). În ceea ce privește vârsta, bivoli au fost împărțiți în trei categorii de vârstă: malaci (0 - 6 luni), tineret (6 - 30 luni) și adulți (> 30 luni). Majoritatea animalelor incluse în studiu au fost crescute în sistemul gospodăresc (166/197; 84.3%) și au fost femele (172/197; 87.3%).

Frecvența, prevalența și intervalul de încredință 95% (CI) au fost calculate pentru fiecare metodă de detectare. Gradul de concordanță între metodele serologice (ELISA și MAT) și între metodele indirecte (ELISA, MAT) și directe (bioprobă, PCR) a fost măsurat prin testul Cohen kappa (k) în EpiTools.

Prevalența totală a anticorpilor anti-*T.gondii* la bubalinele din România a fost de 12.7% (25/197). În funcție de metoda utilizată, seroprevalența a fost de 6.6% (13/197) prin tehnica ELISA și 8.1% (16/197) prin tehnica MAT. Patru probe (n=4) au fost pozitive prin ambele metode, în timp ce nouă probe (n=9) au fost pozitive numai prin tehnica ELISA, iar douăsprezece animale (n=12) au fost pozitive numai prin tehnica MAT. Prevalența (prin tehnicile ELISA, MAT) nu a fost influențată nici de sex și nici de sistemul de creștere. S-a constatat că adulții sunt mai predispuși să prezinte anticorpi anti-*T. gondii*, detectați fie prin tehnica ELISA, fie prin tehnica MAT, comparativ cu animalele tinere ($p = 0.05$) cu 2,73 (CI 95% CI: 0.74-10.0). Diluția maximă la care au fost detectați anticorpi anti-*T.gondii* la MAT a fost de 1:768. Comparând rezultatele obținute prin tehnica ELISA și prin tehnica MAT, a rezultat concordanță aproape perfectă între cele 2 metode ($k=0.219$). Concordanța totală a fost de 93.3%, iar procentul de concordanță pozitivă între cele 2 metode a fost de 85.7%, la ambele metode, 4 probe au fost pozitive, seroprevalența fiind 2% (4/197).

În urma efectuării bioprobei (n=74), toate probele au fost negative. În serul șoarecilor nu au fost detectate IgG specifice *T. gondii* prin tehnica MAT (n = 148). Lobii olfactivi și regiunea mediană ale creierului șoarecilor (n = 148) au fost examinate prin microscopie optică și nu au fost identificate chisturi de *T. gondii*. De asemenea în urma analizei PCR toate probele (omogenate de creiere de șoareci) au fost negative. Nu a existat nici o concordanță între metodele indirecte și bioprobă.

Toate probele de țesut recoltate de la bivoli (cord, ficat, limfonoduri mezenterice, limfonoduri mediastinale și digerat diafragm) au fost supuse metodelor PCR, nPCR și qPCR. Prin metodele nPCR și qPCR, a fost detectat AND-ul de *T. gondii* la o probă de limfonod mezenteric provenită de la o bubalină de 252 de luni (21 de ani) prin nPCR și la o probă de digerat diafragm de la un mascul de 30 de luni (2,5 ani) prin qPCR, prevalența fiind de 2,7% (2/74; CI 95%: 0,33-9,42). Nu a existat concordanță între metodele indirecte și detectarea PCR, deoarece animalele pozitive prin nPCR și qPCR au fost seronegative la ambele metode (atât la MAT cât și la ELISA).

Capitolul II (II.2) a avut ca obiectiv determinarea prevalenței infecției cu *Neospora caninum* la bubalinele din Nord-Vestul României. Studiul a fost realizat prin prelevarea de probe (n=197) de la bivoli proveniți din sistemul gospodăresc și din abator (n=74). 123 (n=123) de probe au fost recoltate în condiții

de teren, restul probelor au fost recoltate din abator (n = 74). Bivolii au provenit din 5 județe din Nord-Vestul României, respectiv: Sălaj, Cluj, Maramureș, Bihor și Bistrița-Năsăud.

Pentru analiza statistică s-a utilizat software-ul Epi Info TM 7 (CDC, SUA). S-au calculat frecvența, prevalența și intervalul de încredere de 95% pentru rezultatele obținute prin metoda ELISA, cPCR și nPCR.

Prevalența totală a anticorpilor anti-*N. caninum* la bubalinele din România a fost de 68.5% (135/197), prin tehnica ELISA. Conform categoriei de vârstă, seroprevalența a fost semnificativ mai mare ($p = 0.0009$) la adulte comparativ cu malacii și tineretul. În ceea ce privește sexul animalelor studiate, prevalența a fost semnificativ mai mare ($p = 0,009$) la femele, în timp ce în funcție de origine, prevalența a fost semnificativ mai mare ($p = 0.00004$) în cazul animalelor provenite din gospodăria comparativ cu sistemul de creștere industrial prevalența a fost semnificativ mai mare ($p = 0.00004$).

Prin PCR convențional toate probele examinate (probele supuse digestiei (diafragm), probe de cord și limfonoduri mezenterice) au fost negative, iar prin intermediul nPCR, 8,1% (n = 6) din probele de digerat diafragm au fost pozitive, iar dintre acestea, trei animale (50%) au fost serologic negative.

Prin analiza BLAST au rezultat cinci secvențe unice, care au fost 97-100% identice cu tulpina Liverpool de *N. caninum* (Accession number LN714488). Secvențele noastre au fost grupate într-o singură încrengătură, împreună cu alte trei izolate de *N. caninum*, originare din Europa și Asia.

Capitolul III (II.3) a avut ca obiectiv determinarea prevalenței parazitozelor pe categorii de vârstă la bubalinele crescute în sistemul gospodăresc și fermă, din Nord-Vestul României. Studiul a fost realizat prin prelevarea de probe fecale de la 180 de bubaline. Cele 180 probe fecale au provenit de la 101 malaci, 28 bivoli tineri și 51 bivoli adulți, astfel, 122 femele și 58 de masculi, cu vârsta cuprinsă între 2 săptămâni și 25 de ani. Majoritatea animalelor au fost crescute în sistemul gospodăresc (160/180), restul animalelor provenind dintr-o fermă din județul Cluj. Pentru toate probele de fecale s-a efectuat examenul coproparazitologic prin tehnica de flotație (Willis), sedimentare și prin metoda McMaster.

La examenul coproparazitologic au fost identificate infecții/infestații parazitare la 57.22% (IC 95%: 49.65-64.55) dintre animalele evaluate. Elementele parazitare au fost reprezentate de oochisturi de *Eimeria spp.* (78/180; 43.33%; IC 95%: 35.98-50.91), chisturi de *Buxtonella sulcata* (3/180, 1.7%; IC 95%: 0.35-4.79), ouă de *Fasciola hepatica* (8/180, 4.44%; IC 95%: 1.94-8.57), ouă de *Paramphistomum cervi* (5/180, 2.8%; IC 95%: 0.91-6.36), oncosfere de *Moniezia spp.* (1/180, 0.6%, IC:95%: 0.01-3.06), ouă de *Toxocara vitulorum* (21/180, 11.7%; IC 95%: 7.37-17.28), ouă de tip strongil (6/180, 3.33%; IC 95%: 1.23-7.11), ouă de *Strongyloides spp.* (9/180, 5%; IC 95%: 2.31-9.28) și ouă de *Capillaria spp.* (1/180, 0.6%, IC (95%: 0.01-3.06).

Atât la bubalinele care au provenit din fermă, cât și la cele care au provenit din sistemul gospodăresc, extensivitatea cea mai mare a avut-o infecția cu *Eimeria spp.*.

Numărul oochisturilor/g fecale (OPG) a fost: *Eimeria spp.*- OPG= 2176.55, *N. vitulorum*- OPG= 4348.19 și strongili digestivi- OPG= 126.33. Nu au existat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește valoarea OPG în funcție de categoria de vârstă și sex ($p > 0,05$).

Au fost identificate infestații monospecifice cu *Eimeria spp.*, *F. hepatica*, *P. cervi*, *Moniezia spp.*, *T. vitulorum*, strongili digestivi și *Strongyloides spp.* În ceea ce privește infestațiile polispecifice cea mai frecventă asociere parazitara a fost cea dintre *Eimeria spp.* și *T. vitulorum* (7.22%; IC 95%: 3.9-12.03). De asemenea, a fost observată asocierea dintre *Eimeria spp.* și *Strongyloides spp.* la un număr de 6 (3.33%) bubaline și, la 2 (1.11%) bubaline asocierea dintre *Eimeria spp.* și *F. hepatica*. Alte asocieri parazitare identificate au fost reprezentate de *Eimeria spp.* cu strongili digestivi, *Eimeria spp.* cu *B. sulcata*, *Eimeria spp.* cu *Capillaria spp.* și *Eimeria spp.*, *Balantidium coli* și *T. vitulorum* la câte o singură bubalină (0.56%).

Capitolul IV (II.4) a avut ca obiectiv determinarea prevalenței parazitozelor la malaci în primele trei luni de viață, în România, și identificarea speciilor de *Eimeria* pe baza caracteristicilor morfologice și a genotipurilor de *Cryptosporidium* și *Giardia*. Studiul a fost realizat prin prelevarea de 104 probe fecale de la 38 de malaci cu vârsta cuprinsă între 2-11 săptămâni. Probele de fecale au fost recoltate în dinamică (la interval de 14 zile), începând cu vârsta de 2-3 săptămâni până la vârsta de 10-11 săptămâni. Malacii au provenit din sistem gospodăresc, din 4 localități ale județului Sălaj, respectiv: Românași, Păușa, Poarta Sălajului și Chichișa.

Au fost calculate frecvența, prevalența, intervalul de confidență (IC 95%) pentru fiecare infecție/infestație parazitara identificată. Înainte de prelucrarea statistică s-a verificat distribuția datelor

folosind testul pentru normalitate D'Agostino-Pearson. Calculele statistice au fost realizate utilizând programul EpiInfo versiunea 3.5.1 și MedCalc Statistical Software versiunea 19.0.4..

În urma examenului coproparazitologic, au fost identificate: infecția cu *Cryptosporidium spp.* (10.5%), *G. duodenalis* (2.6%) și *Eimeria spp.* (84.2%), respectiv infestația cu *N. vitulorum* (36.8%) și *S. papillosus* (15.8%).

Au fost identificate 8 specii de *Eimeria*: *E. auburnensis* (8.2%), *E. bareillyi* (32.3%), *E. bovis* (1.7%), *E. canadensis* (3.9%), *E. cylindrica* (14.7%), *E. ellipsoidalis* (14.2%), *E. subspherica* (2.6%) și *E. zuernii* (22.4%), prevalența fiind variabilă în funcție de vârsta malacilor. Cea mai prevalentă specie de *Eimeria* la categoriile de vârstă 2-3 săptămâni, respectiv 6-7 săptămâni a fost *E. bareillyi*, la categoriile de vârstă 4-5 săptămâni, respectiv 8-9 săptămâni a fost *E. zuernii*, iar la categoria de vârstă 10-11 săptămâni a fost *E. ellipsoidalis*.

Eliminări de oochisturi de *Eimeria spp.* au fost observate încă de la vârsta de 2-3 săptămâni. La categoriile de vârstă 4-5 săptămâni, s-a înregistrat prevalența cea mai ridicată, respectiv 60.5%. Media aritmetică a oochisturilor/g fecale (OPG) a fost 417,155.6 la *Eimeria spp.*, 26,509.9 la *N. vitulorum* și 444.12 la *S. papillosus*.

Prin colorația Henriksen au fost identificate 4 probe pozitive, iar prin metoda nPCR 3 probe pozitive, privind infecția cu *Cryptosporidium spp.*, de asemenea a fost identificată infecția cu *Giardia duodenalis* la un singur malac prin metoda nPCR.

Au fost înregistrate eliminări de oochisturi de *Cryptosporidium spp.* încă de la vârsta de 2-3 săptămâni, prevalența cea mai ridicată constatându-se la categoria de vârstă 4-5 săptămâni, dar după această vârstă nu au mai fost identificate animale pozitive.

Ouă de *N. vitulorum* au fost identificate începând cu vârsta de 2-3 săptămâni, cu prevalența cea mai ridicată la categoria de vârstă 8-9 săptămâni, prezentând semnificație statistică coabitarea malacilor împreună cu bubalinele tineret ($p=0,0009754566$) și adulte ($p=0,0050705694$), iar ouă de *S. papillosus* au fost identificate începând cu vârsta de 4-5 săptămâni, prevalența cea mai mare înregistrându-se la categoria de vârstă 10-11 săptămâni.

În urma genotipării pentru determinarea speciei de *Cryptosporidium spp.* care evoluează la malaci, au fost identificate speciile *C. ryanae*, *C. bovis* și *C. xiaoi*, de asemenea a fost identificat genotipul din asamblajul E al *Giardiei duodenalis*, în urma genotipării.

Obiectivul final al acestei teze a fost de a completa informațiile despre epidemiologia parazitozelor la bubalinele din Nord-Vestul României.

BIBLIOGRAFIA

1. ALAM, M.R., ERFAN, R., SEN, A.B., DAS, S., RAHMAN, M.M., NATH, S.K., 2016, Prevalence of gastrointestinal helminthiasis in naturally infested buffalo in Sylhet district. Int. J. Adv. Multidiscip. Res. 3(8): 52-58.
2. AMARJIT, S., TOSHIHIKO, N., 2003, Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: current status and future prospectus. Anim Sci J 74, 443-455.
3. BORGHESE, A., 2005, Buffalo production and research, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Buffalo Production and Research. FAO (ed), REU Technical Series 67:1-315.
4. BORGHESE, A., 2013, Buffalo livestock and products. CRA – Council for Research in Agriculture, 511 pp. ISBN 978-88-97081-27.
5. CNIEL (CENTRE NATIONAL INTERPROFESSIONNEL DE L'ECONOMIE LAITIÈRE), 2002, L'économie laitière en chiffres, 183 pp.
6. KOS, K., 1975, Contribuții la cercetarea etnografică a creșterii bivoliilor, Anuarul Muzeului Etnografic al Transilvaniei, VII, seria 1974-1975, 121-136.
7. RADOSTITS, O.M., BLOOD, D.C., GAY, C.C., 1994, Veterinary Medicine: A text book of disease of cattle, sheep, pigs, goats and horse. 8th ed. BaillereTindall Publication. London, 1223-1225, 1237-1238.
8. RINALDI, L, MUSELLA, V., CONDOLEO, R., SARALLI, G., VENEZIANO, V., BRUNI, G., CONDOLEO, R.U., CRINGOLI, G., 2007, Giardia and Cryptosporidium in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). Parasitol Res 100, 1113-1118.
9. VENEZIANO, V., SANTANIELLO, M., CARBONE, S., PENNACCHIO, S., MORGOGLIONE, M.E., SCHIOPPI, M., CONDOLEO, R., CRINGOLI, G., 2007, Lice (*Haematopinus tuberculatus*) in water buffalo farms from central Italv. IIAS 6. 926-927.