

Epidemiological and experimental studies regarding *Trichinella* spp. infestations in sylvatic fauna (wild boars, mustelids) from Romania

TEZĂ DE DOCTORAT

Studii epidemiologice si experimentale asupra infestațiilor cu *Trichinella* spp. in fauna silvatica (mistreti, mustelide) din România

(Rezumatul tezei doctorale)

Doctorand: **Zsolt Boros**

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

Membru titular al Academiei de Științe Agricole și Silvicultură București



REZUMAT

Trichineloză este o boală parazitară, o antropozoonoză, determinată de un nematod din genul *Trichinella*, familia Trichinellidae. Ca toți paraziții, *Trichinella* spp. necesită o gazdă pentru a-și desfășura ciclul de viață. Localizarea parazitului în interiorul gazdei depinde de stadiul acestuia de dezvoltare, astfel adulții se localizează la nivel intestinal iar larvele au localizare musculară (Pozio, 2001). Această boală afectează peste 300 specii de animale dar și oamenii. La marea majoritate a speciilor boala evoluează asimptomatic, dar există și excepții, una din ele fiind chiar omul (Pozio, 2001). Potrivit specialiștilor, acest parazit are două tipuri de cicluri de viață, cel silvatic și domestic. Ciclul silvatic se referă la infestațiile care apar la animale sălbatice, pentru care principalele rezervoare sunt carnivorele (lupi, vulpi, șacali, feline sălbatice) (Pozio, 2005). Ciclul domestic se referă la infestațiile cu *Trichinella* spp. la animalele domestice, cum ar fi porcii și caii (Mikkonen și colab., 2005).

Cea mai importantă specie de *Trichinella* este *Trichinella spiralis*. În 1835, James Paget, student la medicină, descoperă pentru prima dată parazitul în timpul unei disecții anatomice a unor țesuturi musculare umane. Denumirea de *Trichina spiralis* a fost dată însă de către Sir Richard Owen în 1835 (Gould, 1970). Numele *Trichina* fusese dat anterior unui gen de muște motiv pentru care în 1895, Railliet a decis să redenumescă acest parazit în *Trichinella* spp. După determinarea ciclului de viață al speciilor de *Trichinella* și stabilirea modului de transmitere în stransă legătură cu consumul de carne crudă sau insuficient preparată termic, următorul pas a fost luarea de măsuri preventive pentru a proteja oamenii (Gould, 1970).

Există în total 13 specii de *Trichinella* care sunt clasificate în două grupe majore: încapsulate și neîncapsulate. Prima grupă (încapsulate) cuprinde următoarele specii: *Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella britovi*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella patagoniensis* și alte 3 genotipuri desemnate arbitrar *Trichinella* T6, T8 și T9 cu taxonomii nerezolvate (Pozio și Zarlenga). O specie încapsulată recent identificată din Canada a fost numită *Trichinella chanchalensis* și este diferită de ceilalți doi taxoni arctici, *Trichinella nativa* și T6, dar prezintă caracterul rezistent la îngheț și este filogenetic mai strâns legată de *T. patagoniensis* din America de Sud (Sharma et al., 2020). A doua grupă (neîncapsulate) cuprinde speciile: *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella papuae* și *Trichinella zimbabwensis* (Pozio și Zarlenga, 2013).

Caracteristicile majore ale acestor nematozi sunt corpurile lor cilindrice, prezența ambelor sexe, femelele fiind de obicei mai mari decât masculii, și tractul digestiv unidirecțional (Murrel et al., 2000b). Extern, adulții sunt acoperiți de o cuticulă

chitinoasă, elastică și transparentă, sub aceasta se află stratul subcuticular, care are formațiuni laterale mai largi și două cordoane mai înguste – unul dorsal și unul ventral, acestea se numesc linii. Cordoanele împart mușchii în patru zone, fiecare constând din 4-5 celule alungite plasate una lângă cealaltă (Despommier și colab., 2000).

Infestațiile cu *Trichinella* la oameni au fost raportate de mai multe ori în ultimele decenii. Această boală zoonotică poate fi întâlnită în peste 55 de state și pe cinci continente. Trichineloză este strâns corelată cu obiceiurile culturale și culinare de a consuma carne crudă sau insuficient preparată termic de la porci, cai, urși și mistreți (Dupouy-Camet, 2000). Cazurile de trichineloză în zone neendemice rezultă din transferul non-internațional al acestui parazit. Un bun exemplu ar fi transferul de carne sau produse din carne din regiuni endemice în regiuni non-endemice (Pozio și Marucci, 2003). Trichineloză reprezintă o problemă serioasă de sănătate publică, cu tot mai multe infestații umane înregistrate anual în România (Blaga și colab., 2007). În 1993, în România au fost raportate cele mai multe cazuri de trichineloză, 3649. La noi în țară, populația umană poate contacta boala prin consumul de carne de porc și mistreț crudă, afumată sau insuficient preparată termic. Carnea de la aceste animale este de obicei preparată în conformitate cu tradițiile și obiceiurile locale care nu întotdeauna inactivează larvele (Cironeanu și Ispas, 2002).

Metoda standard pentru identificarea larvelor musculare de *Trichinella* spp. este digestia artificială. Conform Regulamentului Comunității Europene nr. 1375/2015, animalele sacrificate pentru consumul uman trebuie testate prin această metodă. Trichineloză reprezintă o adevărată problemă economică în ceea ce privește industria creșterii porcinelor, marketing-ul și siguranța alimentelor. Cele mai mari eforturi, în marea majoritate a țărilor, s-au concentrat pe controlul sau eliminarea trichinelozei din circuitul alimentar (Gottstein et al., 2009).

Cele mai utilizate medicamente pentru tratarea trichinelozei sunt derivații de benzimidazoli. Există tot mai mult interes pentru dezvoltarea de noi medicamente antihelmintice, inclusiv cele din plante medicinale și probiotice. Acest lucru se datorează studiilor care au relevat antihelminto rezistența acestor paraziți. (Pozio et al. 2001).

Lucrarea de față cuprinde 138 de pagini și este structurată pe două părți: prima parte, stadiul actual al cunoașterii, iar partea a doua, contribuția personală.

Prima parte a acestei teze (I. Stadiul actual al cunoașterii) este structurată pe 9 capitole. În capitolele I.1. I.2 și I.3 sunt prezentate aspecte generale privind taxonomia, ciclul biologic și morfologia *Trichinella* spp. În capitolele I.4 și I.5 sunt prezentate aspecte legate despre efectul oncogenic și oncostatic, și aspect generale despre trichineloză la oameni. În capitolele I.6, I.7 și I.8 sunt prezentate aspecte legate de diagnostic, importanța economică și socială a trichinelozei și aspecte legate despre stadiul actual al trichinelozei în România. În capitolul I.9 sunt prezentate aspecte legate

despre terapia aplicată la ora actuală, punându-se accent pe studiul tratamentelor alternative (probiotice și unele extracte de plante medicinale în diferite concentrații)

A doua parte (II. Contribuția personală) este structurată pe 4 capitole, incluzând, 5 manuscrise originale. De asemenea cuprinde concluziile generale, partea de originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei și bibliografia. Este împărțită în 4 părți:

Capitolul II.1 acoperă studiul privind prezența anticorpilor anti-*Trichinella* la mistreții care anterior au fost negativi prin metoda standard de diagnostic (digestia artificială). Capitolul II.2 se concentrează pe două studii epidemiologice efectuate pe bursuci și dihorni europeni din România, în care sunt identificate infestații cu *T. britovi*, respectiv *T. spiralis* și *T. britovi*. Capitolul II. 3 descrie un protocol experimental *in vitro* efectuat pe larve de *T. spiralis* și *T. britovi*, expuse la patru extracte alcoolice de plante autohtone. Capitolul II. 4 acoperă protocolul experimental *in vivo* efectuat pe șoareci de laborator cu larve de *T. britovi* și două tulpini de probiotice (*Lactobacillus*). La final, am rezumat concluziile generale, partea de originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei și bibliografia..

În primul capitol al celei de-a doua părți (II.1), ne-am propus să evaluăm prezența și prevalența infestațiilor cu *Trichinella* spp. la mistreți din județul Bihor, România, prin utilizarea metodei standard de diagnostic și a metodelor serologice.

Optzeci și patru de probe de plasmă și diafragm, colectate de la mistreți, au fost incluse în acest studiu. Probele au fost testate prin metoda digestiei artificiale, ELISA și Western blot. Pentru analiza statistică a fost utilizat testul de independență Chi-pătrat.

În urma digestiei artificiale, toate probele de diafragm au fost negative în ceea ce privește prezența larvelor de *Trichinella*. Metoda ELISA, realizată pe probele de plasma a relevat o pozitivitate de 54 (64,2 %). Metoda Western blot a fost realizată pe 26 de probe de plasmă alese aleatoriu, dintre care 6 (23,0 %) au fost pozitive. Din punct de vedere statistic nu s-a observat niciun acord inter-evaluat între metodele alese pentru diagnostic.

Dovezile serologice indică prezența infestațiilor cu *Trichinella* spp. la mistreți din vestul României. Prin urmare, consumatorii umani ar putea fi expuși riscului de a ingera larve de *Trichinella*, chiar și în număr redus.

În cadrul celui de-al doilea capitol (II. 2) sunt prezentate două manuscrise privind epidemiologia *Trichinellei* spp. la mustelide sălbatice din România.

Primul manuscris (II. 2.1) a avut ca scop investigarea apariției acestor paraziți la bursucii europeni din România și identificarea speciilor de *Trichinella* implicate cu ajutorul biologiei moleculare.

În total, 61 de bursuci (32 masculi, 29 femele; 47 adulți, 14 tineri) proveniți din 14 județe au fost examinați prin trichinoscopie și digestie artificială. Pentru

determinarea speciilor, probele musculare pozitive și larvele obținute prin metoda digestiei artificiale au fost prelucrate în vederea testării lor prin metoda multiplex PCR.

O singură femelă de bursuc din județul Sibiu, centrul României, a fost găsită pozitivă pentru *Trichinella* spp. Prin trichinoscopie au fost identificate cinci chisturi: patru în diafragm și unul în musculatura picioarelor anterioare. Digestia artificială a evidențiat o rată de infestație de 70 de larve/100 g de mușchi. Prin PCR s-a pus în evidență prezența lui *T. britovi*.

Deși *T. britovi* a fost semnalat anterior în România la alte specii, acesta este primul raport al apariției sale la bursucul european la noi țară. Cu toate acestea, prevalența scăzută indică un rol minor de rezervor al acestei specii de animale.

Al doilea manuscris al acestui capitol (II.2.2) a avut ca scop investigarea apariției *Trichinella* spp. la dihorii europeni din România și identificarea speciilor de paraziți prin metode moleculare.

În total, 75 de dihoari sălbatici europeni au fost examinați prin trichinoscopie și digestie artificială. Probele de mușchi pozitive și larvele recuperate în urma digestiei artificiale au fost colectate pentru izolarea ADN-ului și prelucrate în continuare prin tehnica Multiplex PCR. Prevalența și intervalul de confidență de 95% (IC 95%) au fost calculate folosind software-ul EpiInfo 7 (CDC, SUA).

Două animale (2,7 %; 95 % CI 0,32 – 9,3 %) din sudul României au fost testate pozitiv pentru *Trichinella* spp. La examenul trichinoscopic, în probele de mușchi testate (56 eșantioane/animal) au fost depistate 48 (la un dihor din județul Giurgiu) și 78 (la un dihor din județul Ialomița) de chisturi. Digestia artificială a indicat o infestație cu 2466 larve/100 g de mușchi la animalul din Ialomița și 254/100 g la animalul din Giurgiu. PCR-ul a confirmat prezența lui *Trichinella spiralis* la dihorul din Giurgiu și o co-infestație cu *T. spiralis* și *T. britovi* la dihorul din Ialomița.

Studiul actual confirmă, prin biologie moleculară, apariția *T. spiralis* și a *T. britovi*, precum și apariția co-infestației cu aceste două specii de *Trichinella* la dihoari europeni din România.

În capitolul al treilea al celei de-a doua părți (II.3), ne-am propus să observăm și să comparăm efectele antiparazitare ale *Artemisia absinthium* (pelin), *Allium sativum* (usturoi), *Cucurbita pepo* (dovleac) și *Coriandrum sativum* (coriandru) împotriva larvelor de *T. spiralis* și *T. britovi* printr-un experiment realizat *in vitro*.

Grupele martor au fost stabilite prin utilizarea a 100 de larve de *T. spiralis* (9 grupuri) și *T. britovi* (9 grupuri), fiecare grup plasat în plăci de cultură celulară de 3 ml împreună cu 1 ml de alcool etilic de 3 concentrații diferite (70%, 35%, și 17,5%). Pe lângă acestea, au fost stabilite șase grupuri de control suplimentare care conțin 100 de larve de *T. spiralis* (3 grupuri) și *T. britovi* (3 grupuri) pe un mediu RPMI 1640. Grupele experimentale au fost construite în mod similar, utilizând 100 de larve de *T. spiralis* și

T. britovi pe 1 ml de mediu RPMI 1640; 1 ml de extract alcoolic din plantele menționate mai sus a fost adăugat la diferite concentrații (10%, 5%, 2,5%) la fiecare dintre grupurile experimentale. Toate grupurile au fost apoi incubate la 37°C pe durata experimentului. Studiul a durat în total 48 de ore, timp în care atât *T. spiralis*, cât și larvele de *T. britovi* au fost examinate sub un stereomicroscop la 1, 2, 16, 24 și 48 de ore.

Extracțele alcoolice de *A. sativum*, *A. absinthium* (conc. 10%; 5%) și *C. pepo*, cu *C. sativum* (conc. 10%; 5%; 2,5%) au avut efecte similare cu soluțiile alcoolice utilizate în loturile martor, inhibând complet mobilitatea larvelor de *T. spiralis* și *T. britovi*. Extracțele alcoolice de *A. sativum* și *A. absinthium* cu o concentrație de 2,5% au avut o eficiență mai mică în inhibarea mobilității *T. britovi*, deși unele mișcări au fost încă observate după 48 de ore. *A. absinthium*, *C. pepo* și *C. sativum* nu au provocat leziuni la nici o speciile de paraziți. Extracțele alcoolice de *A. sativum* au indus leziuni larvelor la concentrații de 10% (*T. britovi* cu leziuni 6%), 5% (*T. spiralis* cu leziuni 3%) și 2,5% (*T. spiralis* cu leziuni 6%) după 48 de ore.

Este necesară realizarea mai multor studii folosind diferite concentrații pentru a putea fi determinate efectele și mecanismul acestor plante împotriva *Trichinella* spp.

În ultimul capitol (II.4) ne-am propus să evaluăm efectul antiparazitar al *Lactobacillus casei* ATCC 393 (original) și *L. paracasei* CNCM la șoareci CD-1 infestați experimental cu *Trichinella britovi*.

În total au fost utilizate patru loturi a câte 20 de animale (10 șoareci masculi și 10 femele/lot) două loturi de control și două loturi experimentale. Fiecare lot a primit o doză zilnică (pe cale orală) de 100 μ l de 10^5 CFU/ml probiotice în soluție Ringer/animal pe toată durata experimentului. În ziua 7, toți șoarecii (cu excepția controlului negativ) au fost infestați oral cu *Trichinella* (100 larve). În ziua 9 post-infecție (p.i.), 10 șoareci/lot au fost eutanasiați. A fost testată prezența paraziților adulți în conținutul și peretele intestinal. În ziua 32 p.i., 10 șoareci/lot au fost eutanasiați. Au fost efectuate trichinoscopii (1 compresor/șoarece) și digestii artificiale pentru a identifica infestația musculară cu *T. britovi*.

În ziua 9 p.i., grupul experimental pretrat cu *L. casei* ATCC 393 ($6,3 \pm 3,03$) a prezentat un număr semnificativ mai mic de paraziți adulți în peretele intestinal, comparativ cu grupul martor pozitiv ($24,6 \pm 4,78$). Un număr semnificativ mai scăzut de paraziți adulți în peretele intestinal a fost înregistrat la femelele de șoareci pretratați cu *L. paracasei* CNCM ($7,4 \pm 4,71$) și *L. casei* ATCC 393 ($4,8 \pm 1,53$) comparativ cu femelele de la controlul pozitiv ($29,0 \pm 5,17$). Nu s-au obținut rezultate relevante din punct de vedere statistic referitor la șoarecii masculi.

Probioticele utilizate în studiul actual ar putea avea un impact potențial asupra dezvoltării stadiilor intestinale ale *T. britovi*, deși mecanismul exact din spatele acestui proces necesită cercetări suplimentare. Studiul actual sugerează că *L. casei* ATCC 393 a

fost mai eficient în reducerea numărului de adulți de *T. britovi* la femele decât *L. paracasei* CNCM.

Concluzii generale:

Scopul principal al acestei teze de doctorat a fost de a investiga prezența infestațiilor cu *Trichinella* la mistreți și mustelide din România.

S-au adus informații noi cu privire la efectele antiparazitare ale unor extracte de plante medicinale și probiotice asupra acestui parazit.

Rezultatele serologice au confirmat că mistreții din județul Bihor, sunt încă expuși la infestații cu *Trichinella* spp.

Datele din prezenta teză atestă faptul că bursucii și dihori europeni din România pot fi gazde pentru *Trichinella* spp. contribuind astfel la menținerea ciclului silvatic al acestui nematod.

În ceea ce privește tratamentele alternative cu plante împotriva acestui parazit, *C. pepo* și *C. sativum* la concentrație de 2,5% au avut un efect puternic împotriva larvelor de *T. spiralis* și *T. britovi*, dar *A. sativum* și *A. absinthium* (2,5%) au fost mai puțin eficiente împotriva larvelor de *T. britovi*.

De asemenea probioticele (*L. casei* și *L. paracasei*) pot afecta stadiile intestinale ale infestației cu *T. britovi* la șoarecii CD-1. Rezultatele prezentate au indicat că *L. casei* ATCC 393 poate fi mai eficient în reducerea numărului de adulți *T. britovi* la șoarecii femele decât *L. paracasei* CNCM. La șoarecii masculi nu s-au obținut rezultate semnificative din punct de vedere statistic.

Bibliografie:

1. BLAGA, R., B., S., DURAND, C., ANTONIU, C.M., GHERMAN, V., CREŢU, V., COZMA, P., BOIREAU, 2007, A dramatic increase in the incidence of human Trichinellosis in Romania over the past 25 years: impact of political changes and regional food habits. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(5), 983- 986.
2. CIRONEANU, I., A.T., ISPAS, 2002, Totul despre trichineloză. [All about trichinellosis]. Bucharest: MAST Publishing House, Bucharest, Romania, 9-64.
3. DESPOMMIER, D.D., R.W., GWADZ, P.J., HOTEZ, C.A., KNIRSCH, 2000, *Trichinella spiralis*: Parasitic Diseases. Apple Trees Productions, LLC. Pub., New York, 125-132.
4. DUPOUY-CAMET, J., 2000, Trichinellosis: a worldwide zoonosis, *Veterinary Parasitology*, 93, 191-200.
5. GOULD, S. E, 1970, Trichinosis in man and animals. *Trichinosis in man and animals*.
6. GOTTSTEIN, B., E., POZIO, K., NÖCKLER, 2009, Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis, *Clinical Microbiology Review*, 22(1): 127-145.
7. MIKKONEN, T., J., VALKAMA, H., WIHIMAN, A., SUKURA, 2005, Spatial variation of *Trichinella* prevalence in rats in Finnish waste disposal sites, *Journal of Parasitology*, 91: 210-213.
8. MURREL, K. D., J. R., LICHTENFELS, D. S., ZARLENGA, E., POZIO, 2000b, The sistematics of the genus *Trichinella* with a key to species, *Veterinary Parasitology*, 93: 293-307.
9. POZIO, E., 2001, New patterns of *Trichinella* infections, *Veterinary Parasitology*, 98: 133–148.
10. POZIO, E., 2005, The broad spectrum of *Trichinella* hosts: from cold- to warmblooded animals, *Veterinary Parasitology*, 132: 3–11.
11. POZIO, E., G., MARUCCI, 2003, *Trichinella*-infected pork products: a dangerous gift, *Trends in Parasitology*, 19: 338.
12. POZIO, E., D. S., ZARLENGA, 2013, New pieces of the *Trichinella* puzzle, *International Journal of Parasitology*, 43: 983-997.

