

Teză de doctorat

Boli transmise prin intermediul vectorilor la felide domestice și sălbatice din Europa

Doctorand: **Rus Luciana - Cătălina**

Conducător de doctorat: **Prof. dr. Andrei Daniel Mihalca, Dipl ECZM**



REZUMAT

În ultimele decenii, incidența și diversitatea bolilor transmise prin intermediul căpușelor, atât la oameni, cât și la animale, a crescut datorită acțiunii mai multor factori, cum ar fi existența unor metode de diagnostic avansate, schimbări ale caracteristicilor mediului (de exemplu, schimbările climatice), creșterea gradului de conștientizare și contactul crescut al oamenilor cu animale sălbatice sau vectori (ESTRADA-PEÑA ET AL., 2012; JAENSON ET AL., 2012; ALVARADO-RYBAK ET AL., 2016). În ciuda faptului că în ultimii ani a existat un interes crescut pentru investigarea agenților patogeni transmiși prin intermediul vectorilor la specia canină, există cunoștințe limitate despre prevalența și natura lor la felide. Pisicile sunt omniprezente, atât în societățile dezvoltate, cât și în cele în curs de dezvoltare și împart mediul în mod egal cu omologii canini (CHOMEL AND SUN, 2011).

În Europa, sunt prezente trei specii de felide sălbatice: râsul iberic (*Lynx pardinus*), râsul eurasiatic (*Lynx lynx*) și pisica sălbatică europeană (*Felis silvestris silvestris*) (SUNQUIST AND SUNQUIST, 2009). Râsul eurasiatic și pisica sălbatică europeană sunt prezente și pe teritoriul României (MURARIU, 2010).

Există mai multe moduri de transmitere a agenților patogeni de la animalele domestice la cele sălbatice și viceversa, acestea fiind reprezentate de rețele complexe în cadrul ecosistemelor (OTRANTO ET AL., 2015). După cum este menționat în prezenta lucrare, s-a demonstrat prezența infecțiilor transmise prin intermediul vectorilor la felidele domestice și sălbatice din Europa, în unele circumstanțe prezentând rate crescute ale infecției. Mai mult, există specii care servesc drept rezervor și o varietate de potențiali vectori care pot facilita menținerea ciclurilor silvatică a paraziților în aria lor geografică de răspândire (ALVARADO-RYBAK ET AL., 2016). Cu toate acestea, lipsesc date importante cu privire la prezența și distribuția agenților patogeni transportați de vectori la felide. Prin urmare, obiectivele prezentei lucrări sunt următoarele:

- Să descrie datele clinice și de laborator ale infecției cu sușele europene de *Cytauxzoon* în asocierie cu infecția cu virusul imunodeficienței feline la o pisică domestică și să confirme molecular prezența piroplasmului.

- Să evalueze diversitatea genetică a variantelor europene de *Cytauxzoon* la felidele sălbatice din Europa prin analiza 18S ADN ribozomal (18S ADN_r), a genelor mitocondriale și genomurilor mitocondriale complete ale izolatelor reprezentative.

- Să determine diversitatea speciilor de *Babesia* asociate felinelor la felidele sălbatice din România și să caracterizeze molecular speciile implicate cu ajutorul 18S ADN_r și a markerilor mitocondriali.

- Să evalueze apariția *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp. și *Hepatozoon* spp. la pisicile domestice din România prin intermediul testelor PCR și să identifice potențialii factori de risc asociați acestor agenți patogeni.

- Să investigheze prezența și distribuția speciilor de *Rickettsia* din grupul febrei pătate, *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis* și *D. repens* la pisicile domestice și sălbatice din România.

Prima parte a tezei (1. Introducere), prezintă date rezumate din literatura de specialitate privind ecologia felidelor domestice și sălbatice, principalele artropode parazite și agenții patogeni de natură parazitara și bacteriană transmiși prin intermediul vectorilor identificați până în prezent la felidele domestice și sălbatice din Europa. A doua parte (2. Cercetări proprii) constă în 5 manuscrise originale axate pe prezența și diversitatea hemoparaziților din Încrângătura Apicomplexa și a patogenilor din afara Încrângăturii Apicomplexa transmiși prin intermediul vectorilor, atât la felidele sălbatice, cât și la cele domestice din Europa.

Primul capitol al celei de-a doua părți (2.1) prezintă tabloul clinic și rezultatele analizelor de laborator ale infecției cu sușele europene de *Cytauxzoon* în asociere cu infecția cu virusul imunodeficienței feline la o pisică domestică. Cytauxzoonoza este descrisă ca o boală a felidelor domestice și sălbatice, cu caracter emergent, transmisă de căpușe și cauzată de protozoare din genul *Cytauxzoon*. Acest studiu descrie primul caz de infecție cu *Cytauxzoon* sp. în Germania, la o pisică domestică, mascul, în vârstă de 6 ani, care prezenta anorexie, letargie și scădere în greutate. Analiza biochimică serică parțială a evidențiat azotemie cu o valoare a dimetilargininei simetrice semnificativ crescute, hipercreatinemie, hiperfosfatemie și hipoalbuminemie. Mai mult, a fost identificată o anemie nonregenerativă moderată. Cu aproximativ un an înainte de aceste constatări, pisica a fost diagnosticată cu infecția cu virusul imunodeficienței feline. Aceste rezultate au indicat o scădere a ratei de filtrare glomerulară, probabil ca urmare a unei disfuncții renale. Organismele intraeritrocitare de formă inelară, rotundă sau ovală, sugestive din punct de vedere morfologic pentru piroplazme, au fost observate în timpul evaluării frotiului sanguin. Analizele PCR și secvențierea unui fragment de 18S ADNr au confirmat prezența infecției cu *Cytauxzoon* sp., cu o similaritate a secvenței de nucleotide de 99-100% cu o sușă de *Cytauxzoon* publicată anterior. Deoarece aceasta este prima confirmare moleculară a infecției cu *Cytauxzoon* sp. la o pisică domestică din Germania, aceste constatări sugerează că cytauxzoonoza ar trebui considerată ca diagnostic diferențial în cazurile de anemie la pisicile domestice cu acces în mediul exterior.

Al doilea capitol din partea a doua (2.2) furnizează date despre diversitatea speciilor de *Cytauxzoon* la felidele sălbatice din Europa. Protistele genului *Cytauxzoon* infectează o mare varietate de felide sălbatice și domestice din întreaga lume. În timp ce specia întâlnită pe continentul American, *Cytauxzoon felis*, a fost îndelung studiată, cunoștințele despre izolatele europene de *Cytauxzoon* sunt încă deficitare. Scopul

studiului actual a fost de a determina diversitatea genetică a *Cytauxzoon* spp. la felidele sălbatice prin analiza unei gene nucleare și a două gene mitocondriale, împreună cu genomurile mitocondriale complete ale unor probe reprezentative. În total, 106 probe biologice de la felide sălbatice (92 de la *Felis silvestris* și 14 de la *Lynx lynx*) din Germania, România, Republica Cehă și Luxemburg au fost analizate pentru identificarea prezenței *Cytauxzoon* spp. folosind protocoale de nested PCR, care vizează genele 18S ADNr, și genele mitocondriale citocrom *b* și citocromul *c* oxidază subunitatea I. Mai mult, 18 probe biologice de felide sălbatice din Europa confirmate anterior ca pozitive și material comparativ din SUA, confirmat ca pozitiv pentru *C. felis*, au fost incluse în studiu. În urma analizelor secvențelor de 18S ADNr, speciile de *Cytauxzoon* de la felide au format două clade separate de izolate din Lumea Nouă și, respectiv, Lumea Veche, clada europeană având o diversitate internă scăzută. Spre deosebire de 18S ADNr, analizele filogenetice ale genelor mitocondriale au evidențiat prezența a trei clade foarte susținute, rezultând trei genotipuri bine definite. Variabilități intra- și interspecifice similare a genelor mitocondriale au fost observate în cazul diferitelor specii de *Babesia*. Având în vedere distribuția geografică, speciile gazdă și analizele celor trei gene, concluzionăm că cele trei genotipuri de *Cytauxzoon* detectate la felidele sălbatice europene reprezintă trei specii noi, pe care le descriem în cadrul prezentei lucrări.

Al treilea capitol al celei de-a doua părți (2.3) evaluează diversitatea *Babesia* spp. la felidele sălbatice din România. Hemoparaziții din genul *Babesia* afectează o gamă largă de animale domestice și sălbatice. Babesioza felină este considerată endemică în Africa de Sud, în timp ce cunoștințele despre infecția cu *Babesia* spp. la felide în Europa sunt limitate. Folosind probe de la 51 felide sălbatice, 44 *Felis silvestris* și 7 *Lynx lynx*, studiul și-a propus să determine prezența și diversitatea genetică a *Babesia* spp. la felidele sălbatice din România prin analiza 18S ADNr și a doi markeri mitocondriali, citocrom *b* și citocrom *c* oxidază subunitatea I. Prin analiza 18S ADNr, ADN de *Babesia* spp. a fost detectat la 20 de felide sălbatice europene. Toate secvențele au prezentat o similaritate de 100% cu *B. canis* în urma analizei BLAST. În schimb, analizele genelor mitocondriale au relevat prezența a două *Babesia* spp., *B. pisicii* n. sp., pe care o descriem în cadrul acestei lucrări, și *B. canis*. Compararea pe perechi a ambelor gene mitocondriale ale *B. pisicii* n. sp. a arătat o distanță genetică de cel puțin 10,3% față de cea mai apropiată specie, *B. rossi*. Analizele filogenetice ale genelor mitocondriale au relevat faptul că *B. pisicii* n. sp. este înrudită cu așa-numitele „specii mari” de *Babesia* asociate canidelor, formând o subcladă separată într-o poziție adiacentă speciei *B. rossi*.

Capitolul patru al celei de-a doua părți (2.4) raportează prezența hemoparaziților la pisicile domestice din România. Hemoparaziții Încrengăturii Apicomplexa sunt protozoare care afectează o varietate de specii de animale domestice

și sălbatice, dar și oamenii. Scopul studiului a fost de a evalua apariția *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp. și *Hepatozoon* spp. la pisicile domestice din România prin utilizarea instrumentelor moleculare. Probele de sânge de la 371 de pisici domestice au fost inițial examinate pentru prezența piroplasmelor. Toate probele care au produs o bandă vizibilă în urma migrării în gel de agaroză au fost testate ulterior prin teste specifice care vizează 18S ADNr al *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp. și *Hepatozoon* spp. Mai mult, teste de tip nested PCR care vizează genele mitocondriale ale *Babesia* spp. au fost utilizate pentru testare tuturor probelor pozitive pentru 18S ADNr al *Babesia* spp. Din numărul total de probe prelevate, 19,4% au fost pozitive la testul PCR care vizează piroplasmemele. În plus, *Babesia* spp. au fost identificate la 15,1% dintre pisici, în timp ce 0,5% au fost pozitive pentru *Hepatozoon* spp. Analizele moleculare au confirmat prezența *B. canis*. Toate probele au fost negative pentru *Cytauxzoon* spp. Ratele ridicate de infecție ale pisicilor domestice cu *Babesia* spp. și nevoia de diferențiere a speciilor, evidențiază importanța utilizării genelor mitocondriale ca ținte genetice ale protocoalelor moleculare.

Ultimul capitol al celei de-a doua părți (2.5) oferă date despre agenții patogeni transmiși prin vectori la pisicile domestice și sălbatice din România. Scopul studiului a fost de a evalua prezența și distribuția speciilor de *Rickettsia* din grupul febrei pătate, *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis* și *D. repens* la felidele domestice și sălbatice. Un total de 421 de probe de sânge și țesuturi de la pisici domestice (n=371), pisici sălbatice (n=34) și râși eurasiatici (n=6) au fost analizate folosind metode moleculare. Din numărul total de pisici domestice, 21,3% au fost pozitive în urma testelor PCR pentru agenți patogeni transmiși prin vectori. Astfel, 0,8% au fost infectate cu *Bartonella* spp. (*B. henselae* în cazul a două pisici și *B. clarridgeiae* la o pisică), 1,1% cu *E. canis* și 19,4% cu *A. phagocytophilum*. *A. phagocytophilum* a fost singurul agent patogen detectat la felidele sălbatice cu o rată de infecție de 50%. În consecință, prezența bacteriilor transmise prin intermediul vectorilor a fost identificată în rândul felidelor domestice și sălbatice prin intermediul testelor PCR, prezentând o prevalență variată.

Bibliografie:

1. ALVARADO-RYBAK, M., SOLANO-GALLEGO, L., MILLÁN, J., 2016. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasites & Vectors*, 9, 1–19.
2. CHOMEL, B.B., SUN, B., 2011. Zoonoses in the bedroom. *Emerging infectious diseases* 17, 167.
3. ESTRADA-PEÑA, A., AYLLÓN, N., DE LA FUENTE, J., 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in physiology* 3, 64.

4. JAENSON, T.G., JAENSON, D.G., EISEN, L., PETERSSON, E., LINDGREN, E., 2012. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasites & Vectors* 5, 1-8.
5. MURARIU, D., 2010. Systematic list of the Romanian vertebrate fauna. *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa"* 53, 377-411
6. OTRANTO, D., CANTACESSI, C., PFEFFER, M., DANTAS-TORRES, F., BRIANTI, E., DEPLAZES, P., GENCHI, C., GUBERTI, V., CAPELLI, G., 2015. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe: Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Veterinary parasitology* 213, 12-23.
7. SUNQUIST, M.E., SUNQUIST, F.C., 2009. Family Felidae (cats). In: WILSON, R.A., MITTERMAIER, R.A. (Eds) *Handbook of the Mammals of the World*, pp. 54-168.