
REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Tehnici de diagnostic ale *Encephalitozoon cuniculi* la iepurele domestic (*Oryctolagus cuniculus*)

Doctorand **Anca-Alexandra Doboși**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Dana Liana
Pusta**



I. INTRODUCERE

Divizia Microsporidia este reprezentată de un grup de microorganisme eucariote, unicelulare, obligatoriu intracelulare, formatoare de spori, având ca și gazde atât vertebratele cât și nevertebratele (Han și colab., 2020). Din această categorie face parte și *Encephalitozoon cuniculi*, care reprezintă subiectul principal al acestui studiu.

E. cuniculi este un microorganism eucariot, atât cu caractere de parazit protozoar cât și de fung, descoperit pentru prima dată la iepurele domestic în 1922 (Wright și Craighead, 1922), dar cu transmisibilitate la numeroase alte specii, inclusiv omul, motiv pentru care infecția poate avea potențial zoonotic (Magalhães și colab., 2022). La iepuri, transmiterea infecției are loc atât pe cale orizontală, prin ingerare orală a sporilor și mai rar inhalatorie, cât și pe cale verticală, transplacentar de la mamă la descendenți (Meredith și Richardson, 2015). În mecanismul de protecție al organismului intervin două tipuri de imunitate ca urmare a expunerii la agentul patogen, respectiv imunitatea mediată celular prin intermediul limfocitelor și citokinelor, și imunitatea umorală, prin producerea de anticorpi IgM și IgG (Latney și colab., 2014). Tabloul clinic al bolii la iepuri este descris în principal de simptome neurologice (ataxie, torticolis, nistagmus, crize convulsive), cât și renale (polidipsie, poliurie) și oculare (uveită facoclastică) într-o măsură mai mică, însă majoritatea infecțiilor au caracter asimptomatic (Harcourt-Brown și Holloway, 2003). Tratamentul vizează reducerea încărcăturii sporilor și a inflamației cauzată de microorganism, cu ajutorul fenbendazolului, antiinflamatoarelor și a tratamentului de susținere, dar nici un fel de terapie nu asigură o vindecare completă (Latney și colab., 2014). Din acest motiv, măsurile profilactice sunt de o mare importanță pentru a reduce răspândirea infecției, acestea implică testarea periodică a efectivelor de iepuri, administrarea preventivă a fenbendazolului și dezinfecția riguroasă a adăpostului (Meredith și Richardson, 2015).

Diagnosticul *E. cuniculi* la iepuri nu poate fi realizat în exclusivitate pe baza simptomatologiei clinice, care este nespecifică, astfel că în prezent sunt utilizate metode serologice, tehnici de genetică moleculară și examinări histopatologice pentru identificarea agentului patogen sau a anticorpilor (Latney și colab., 2014). Având în vedere caracterul latent al microorganismului cât și cel zoonotic, este importantă detectarea acestuia la o populație cât mai largă de iepuri pentru stabilirea diagnosticului, cât și pentru conștientizarea medicilor clinicieni și a proprietarilor, dar și pentru adoptarea măsurilor de profilaxie necesare.

Ipoteza de lucru este reprezentată de importanța diagnosticului *Encephalitozoon cuniculi*, realizat prin multiple metode, care este o microsporidie larg răspândită în populațiile de iepuri, de multe ori în stare latentă, și care poate avea risc zoonotic.

Obiectivele cercetării au fost reprezentate de diagnosticul *E. cuniculi* prin mijloace de diagnostic clinic, diagnostic serologic, diagnostic prin tehnici de genetică moleculară, precum și compararea rezultatelor obținute și prezentarea unor studii de caz.

În primul rând, examinarea clinică și realizarea anumitor investigații paraclinice (analize sanguine, examen coproparazitologic, investigații imagistice), în special la iepurii cu simptomatologie specifică encefalitozoonozei, a avut scopul de a evalua atât starea de sănătate a acestora, cât și de a identifica importanța investigațiilor paraclinice în context clinic.

Diagnosticul serologic a reprezentat unul din obiectivele principale ale prezentului studiu, acesta fiind efectuat prin testarea serului sanguin folosind tehnica ELISA pentru detectarea anticorpilor anti-*E. cuniculi* IgG și analizarea rezultatelor obținute.

Diagnosticul prin tehnici de genetică moleculară a fost cel de-al doilea obiectiv principal. Au fost utilizate tehnicile nested PCR și qPCR pentru detectarea ADN specific *E. cuniculi* pe probe de urină, fecale și organe, urmate de analizarea rezultatelor obținute.

În final s-au realizat studii comparative între rezultatele obținute prin tehnica serologică și metodele de genetică moleculară, pentru a evalua eficacitatea acestora și pentru a identifica cea mai potrivită metodă de diagnostic a microsporidiei.

Un obiectiv secundar al acestui studiu a constat în prezentarea unor studii de caz pentru evidențierea importanței diagnosticului *E. cuniculi* la iepuri, indiferent de statusul lor clinic.

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Capitolul Contribuția personală din teza intitulată “**Tehnici de diagnostic ale *Encephalitozoon cuniculi* la iepurele domestic (*Oryctolagus cuniculus*)**” cuprinde patru studii a căror obiectiv principal a fost de identificare a agentului patogen prin examene clinice și paraclinice, diagnostic serologic (ELISA, IFAT) și diagnostic prin tehnici de genetică moleculară (nested PCR, qPCR). De asemenea, studiile de caz au avut ca obiectiv sublinierea importanței diagnosticării *E. cuniculi*, atât pentru iepurii care prezintă manifestare clinică, în principal cu simptomatologie neurologică, cât și a celor aparent asimptomatici. Proprietarii iepurilor domestici au fost informați cu privire la obiectul studiilor, au semnat un consimțământ scris pentru acordul participării și li s-au comunicat rezultatele obținute.

1. Studiul 1 - Diagnosticul clinic și teste paraclinice

Obiectivul principal al acestui studiu a fost examinarea clinică a iepurilor, precum și realizarea testelor paraclinice, în special la cei cu prezența semnelor clinice specifice encefalitozoonozei. Obiectivul secundar a fost de a evalua statusul clinic al pacienților în concordanță cu testele paraclinice efectuate, pentru a identifica aplicabilitatea acestora, în

special în contextul manifestării acute ale bolii. Un obiectiv final a reprezentat implementarea și analizarea managementului terapeutic în cazurile posibile.

În acest studiu au fost incluși 370 de iepuri domestici (*Oryctolagus cuniculus*) pentru examinarea clinică și investigații paraclinice la unele exemplare selectate. Investigațiile paraclinice au inclus, în unele cazuri, examen biochimic sanguin, examen coproparazitologic, examen CT al capului și examen radiologic.

Concluzii:

1. În urma examinării clinice, din totalul de 370 de iepuri, 8,65% (32/370; IC 95%: 6,19-11,95) din iepuri s-au încadrat în categoria celor cu manifestări specifice encefalitozoonozei, respectiv semne neurologice și renale, în timp ce 91,35% (338/370, IC 95%: 88,05-93,81) au fost asimptomatici, fie ei clinic sănătoși sau cu alte patologii nespecifice.
2. Analiza de biochimie a sângelui a relevat rezultate care coincid cu deshidratare și afectare hepatică/digestivă (hipoproteinemie, hipoalbuminemie, hiperglobulinemie, hipernatremie, BUN scăzut, ALP crescut, GLY crescut), precum și cu afectarea renală (hipercalcemie, hipofosfatemie, hiperkalemie).
3. Prin examenul coproparazitologic au fost identificați paraziți din genurile *Eimeria* spp., *Passalurus* spp. și *Trichostrongylus* spp., iepuri asimptomatici prezentând prevalența mai mare 50,29% (88/175; IC 95%: 42,95-57,61) fără a se găsi o corelație între endoparazitism și predispoziția la infecția cu *E. cuniculi*.
4. Investigațiile imagistice, în special cea de tip CT, s-au dovedit utile pentru evaluarea stării pacientului cu manifestări neurologice acute, cât și pentru diagnostic diferențial (otită medie/internă).
5. Chiar dacă aceste investigații paraclinice nu oferă un diagnostic de certitudine în ceea ce privește identificarea *E. cuniculi*, ele denotă importanță pentru medicul clinician în privința conduitei de management a pacientului.
6. Recomandarea principală, atât în cazul iepurilor simptomatici cât și a celor asimptomatici diagnosticați cu *E. cuniculi*, este inițierea protocolului terapeutic cu fenbendazol în doză de 20 mg/kg/zi oral, timp de 28 de zile, pentru a maximiza șansele de ameliorare a infecției.

2. Studiul 2 - Diagnosticul serologic al *Encephalitozoon cuniculi*

Obiectivul principal al acestui studiu a fost diagnosticul prin tehnica de serologie calitativă ELISA a prezenței anticorpilor IgG specifici anti-*E. cuniculi* la iepuri care provin din regiunea de Nord-Vest a României și analiza rezultatelor obținute în relație cu anumiți parametri caracteristici diferitelor grupuri de iepuri incluși în studiu (vârstă, sex, anotimp de recoltare a probelor, sistem de creștere, status clinic, status vaccinal și județ de proveniență).

În acest studiu au fost incluși 351 de iepuri domestici. Materialele necesare studiului au fost împărțite în materiale pentru recoltarea probelor de sânge și exprimarea serului, materiale pentru prelucrarea serologică ELISA (kit Medicago, Uppsala, Suedia) și

aparatura pentru citirea rezultatelor (cititor de absorbantă Bio-Rad PR2100 Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, SUA).

Concluzii:

1. Prevalența totală obținută cu ajutorul tehnicii serologice ELISA la iepuri din Nord-Vestul României a fost de 43,02% (151/351, IC 95%: 37,94-48,25).
2. Diferențe semnificative statistic au fost obținute în relație cu vârsta, anotimpul de recoltare a probelor, BCS, statusul clinic și județul de proveniență.
3. Tehnica ELISA a fost opțiunea aleasă datorită fezabilității acesteia pentru prelucrarea unui număr crescut de probe.
4. La categoria de vârstă adultă a fost obținută o prevalență semnificativ mai crescută 48,23% (136/282, IC 95%: 42,46-54,04) față de tineret 21,74% (15/69, IC 95%: 13,64-32,82).
5. În anotimpurile primăvara și toamna au rezultat cele mai mari procente, respectiv 65,57% (40/61, IC 95%: 53,05-76,25) și 45,27% (67/148, IC 95%: 37,47-53,31).
6. Indivizii cu prezența simptomelor specifice encefalitozoonozei au dovedit o prevalență semnificativ mai crescută (61,29%, IC 95%: 43,82-76,27) față de cei asimptomatici (41,25%, IC 95%: 35,99-46,72).
7. Scorurile corporale de 2/5 (55,56%; 5/9, IC 95%: 26,67-81,12) și 4/5 (45,24%; 19/42, IC 95%: 31,22-60,05) au relevat cea mai mare seropozitivitate.
8. În județele de proveniență Alba, Cluj și Bistrița-Năsăud au rezultat pozitivități crescute și apropiate, respectiv 51,52% (34/66, IC 95%: 39,71-63,15), 47,95% (82/171, IC 95%: 40,59-55,40) și 46,94% (23/49, IC 95%: 33,70-60,62).
9. Diagnosticul serologic prin metoda IFAT a oferit o pozitivitate de 53,85% (7/13, IC 95%: 29,14-76,79), majoritatea acestor rezultate (12/13) fiind comparativ identice celor obținute prin metoda ELISA.
10. Se recomandă aplicarea metodei serologice ELISA pentru testarea unor efective mai mari în scop de screening și pentru analiza necesității instituirii măsurilor de tratament și profilaxie necesare.

3. Studiul 3 - Diagnosticul prin tehnica nested PCR al *Encephalitozoon cuniculi*

Obiectivul acestui studiu a fost diagnosticul prin tehnica de genetică moleculară nested PCR a prezenței ADN-ului *E. cuniculi* din probe de excreții și țesuturi, provenite atât de la iepuri de companie și de carne din regiunea de Nord-Vest a României, cât și de la iepuri sălbatici din județul Satu-Mare. Obiectivul secundar a fost compararea a trei protocoale de lucru diferite, folosind primerii MSP1_for și MSP2A_rev pentru primul PCR și primerii MSP3_for și MSP4A_rev pentru al doilea PCR (Katzwinkel-Wladarsch și colab., 1996), primerii P2 și M2 pentru primul PCR și primerii Ence_549_forward și Ence_549_reverse pentru al doilea PCR (Csokai și colab., 2009), respectiv primerii MK5 și MK6 pentru primul PCR și primerii K4 și K3 pentru al doilea PCR (Kimura și colab., 2013). Al treilea obiectiv al studiului este reprezentat de compararea rezultatelor nested PCR

obținute din excreții și țesuturi provenite de la diferite grupuri de iepuri, în relație cu anumiți parametri (vârstă, sex, anotimp de recoltare a probelor, sistem de creștere, status clinic, status vaccinal și județ de proveniență), pentru a observa prevalența în funcție de tipul de material biologic testat.

În acest studiu au fost incluși 242 de iepuri, iar materialele necesare au fost împărțite în materiale pentru recoltarea probelor de excreții (urină, fecale) și organe (creier, cristalin, rinichi, vezică urinară, ficat, pulmon, miocard, splină), materiale pentru prelucrarea probelor în vederea extracțiilor ADN (kiturile Maxwell® RSC Genomic DNA Kit, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, E.Z.N.A. Stool DNA Kit, ADN ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System, DNeasy® Blood & Tissue Kit) și amplificărilor ulterioare, precum și aparatura pentru prelucrarea moleculară (extractor automat de ADN Maxwell® RSC Instrument, Thermal Cycler Bio-Rad T100 și transiluminatorul UV Cleaver).

Concluzii:

1. Nested PCR este o metodă larg utilizată pentru diagnosticul *E. cuniculi* din diferite tipuri de probe, precum urină, fecale și organe, protocolul descris de Katzwinkel-Wladarsch și colab. (1996), fiind aplicat cu rezultate concludente în acest studiu. (Fig. 18).

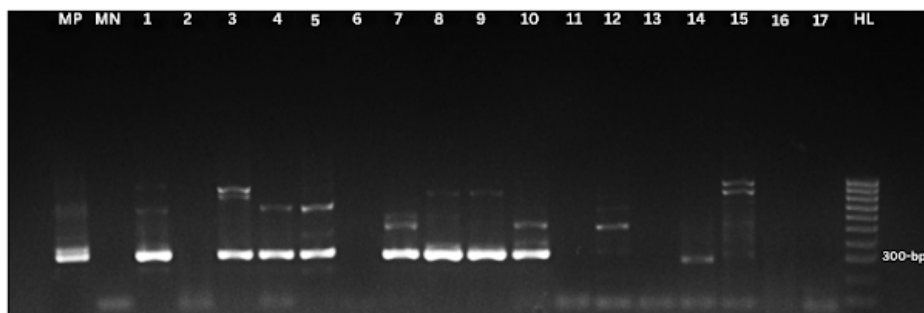


Fig. 18. Electroforeză în gel de agar 1.5%. Pozitivitate exprimată pentru probele 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 prin prezența benzii la nivelul 300-bp. MP - martor pozitiv, MN - martor negativ, HL - HyperLadder™. (Original)

2. Prevalența totală a nested PCR din toate tipurile de probe obținute de la 242 de iepuri a fost de 45,45% (110/242; IC 95%: 39,30-51,75).
3. Prevalența *E. cuniculi* prin nested PCR:
 - din probele de urină a fost de 27,27% (15/55, IC 95%: 17,28-40,23), cu diferențe semnificative în corelație cu sistemul de creștere și BCS;
 - din fecale a fost de 37,50% (72/192, IC 95%: 30,96-44,53), cu diferențe semnificative în funcție de vârstă, sex, anotimp, sistem de creștere, BCS, status clinic și județul de proveniență;
 - din organe a fost de 61,54% (32/52, IC 95%: 47,02-74,70), cu diferențe semnificative în funcție de sex, anotimp, sistemul de creștere, statusul clinic

și județul de proveniență.

4. Metoda nested PCR aplicată pe diferite tipuri de organe a identificat o pozitivitate de 30,56% (11/36, IC 95%: 18,00-46,86) pentru vezica urinară, aceasta reprezentând prima semnalare a testării acestui organ într-un studiu de specialitate.
5. Studiul de față a identificat, pentru prima dată în țara noastră, prezența *E. cuniculi* în organe provenite de la iepuri europeni sălbatici, demonstrând astfel și fauna sălbatică poate fi un potențial rezervor al acestui patogen.
6. În ansamblu, pozitivitatea tuturor probelor luate în lucru s-a dovedit relevantă pentru iepurii care se încadrează în categoriile: tineret, asimptomatici, crescuți în sistem gospodăresc.

4. Studiul 4 - Diagnosticul prin tehnica Real-Time PCR al *Encephalitozoon cuniculi*

Obiectivul principal al acestui studiu a fost diagnosticul prin tehnica de genetică moleculară Real-Time PCR sau qPCR a prezenței ADN-ului *E. cuniculi* din probe de excreții și organe provenite de la iepuri domestici. Obiectivul secundar al acestui studiu a reprezentat compararea rezultatelor qPCR obținute din probe de excreții și organe cu alte studii, pentru a evalua eficacitatea acestei metode pentru diferitele tipuri de materiale biologice.

În acest studiu au fost incluși 31 de iepuri domestici de companie și de carne. Materialele necesare au constatat în materiale necesare recoltării probelor de excreții (urină, fecale) și organe (creier, cristalin, rinichi, vezică urinară, ficat, pulmon, miocard, splină), materiale necesare prelucrării probelor în vederea reacțiilor PCR (kiturile de extracție ADN Maxwell® RSC Genomic DNA Kit, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, E.Z.N.A. Stool DNA Kit, ADN ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System, DNeasy® Blood & Tissue Kit) și aparatura (Azure Cielo™ Real-Time PCR System) pentru realizarea diagnosticului molecular:

Concluzii:

1. Prevalența totală obținută prin qPCR din toate tipurile de probe testate (n=122), reprezentând probe de organe, urină și fecale, provenite de la 31 de iepuri, a fost 48,39% (15/31, 95% CI: 31,97-65,16).
2. Rezultatele qPCR obținute din probe de urină și fecale, provenite de la 10 iepuri, au fost pozitive în 4, respectiv două cazuri.
3. Pozitivitatea prin qPCR la nivelul organelor, provenite de la 26 de iepuri, a fost de 53,85 % (14/26, IC 95%: 35,46-71,24).
4. Identificarea *E. cuniculi* în probe recoltate de la nivelul vezicii urinare prin metoda qPCR reprezintă prima raportare în literatura de specialitate, fiind obținută o pozitivitate de 35,29% (6/17; IC 95%: 17,31-58,70).
5. Se recomandă analiza prin tehnica qPCR a unor eșantioane mai mari de probe pentru aplicarea analizei statistice.

5. Studiul 5 - Evaluarea comparativă a diagnosticului serologic (ELISA) și a celui prin tehnici de genetică moleculară (nested PCR, qPCR) al *Encephalitozoon cuniculi*

Obiectivul principal al acestui studiu a fost compararea rezultatelor obținute prin metodele de diagnostic serologic și prin tehnici de genetică moleculară pentru identificarea *E. cuniculi*, precum și corelarea acestora cu datele clinice ale iepurilor incluși. Obiectivul secundar a fost de a evalua eficacitatea metodelor efectuate și de a identifica principalii factori de risc implicați în expunerea la microorganism, dar și corelarea utilității metodelor de diagnostic în contextul clinic al pacienților.

În acest studiu a fost inclus un număr total de 381 iepuri, dintre care 378 domestici și 3 europeni sălbatici. Dintre aceștia, la 351 de iepuri s-a realizat recoltarea sângelui și ulterior diagnosticul serologic, respectiv la 242 s-au recoltat fie urină, fecale sau organe pentru diagnosticul prin tehnici de genetică moleculară. Toate materialele necesare studiilor anterioare au fost utilizate pentru îndeplinirea obiectivelor.

Concluzii:

1. Analiza comparativă a diagnosticelor serologic prin metoda ELISA a determinat obținerea unei seroprevalențe totale de 58,96% (125/212, IC 95%: 52,24-65,37), respectiv o pozitivitate de 43,40% (92/212, IC 95%: 36,90-50,13) prin nested PCR la probele de urină, fecale sau organe.
2. Diferențe semnificative între pozitivitatea metodelor ELISA și nested PCR s-au identificat în ceea ce privește vârsta și statusul clinic al iepurilor.
3. Seropozitivitatea a fost mai crescută în cazul indivizilor adulți (69,57%, 112/212) și a celor simptomatici (70,83%, 17/212), în timp ce diagnosticul molecular a demonstrat pozitivitatea mai mare la tineret (60,78%, 31/212) și la cei asimptomatici (44,68%, 84/212).
4. Comparativ cu metoda nested PCR considerată golden standard, metoda ELISA a prezentat o sensibilitate de 58,7%, respectiv specificitate de 40,83%.
5. Prin evaluarea factorilor de risc în funcție de rezultatele diagnosticelor ELISA (n=351) și nested PCR (n=242) s-au identificat vârsta și anotimpul de recoltare a probelor cu semnificație statistică raportată la seropozitivitate.
6. Comparația între metodele nested PCR și qPCR din probe de urină, fecale sau organe a demonstrat o prevalență de 54,84% (17/31) respectiv 48,39% (15/31), fără diferențe semnificative în funcție de grupurile de iepuri analizate.
7. Analiza comparativă a metodelor moleculare nested PCR și qPCR a relevat pozitivitate în favoarea primei tehnici, dar eșantionul redus de probe sugerează necesitatea efectuării unor studii suplimentare.
8. Comparativ cu metoda nested PCR ca și golden standard, sensibilitatea și specificitatea metodei qPCR a fost de 58,8% respectiv 64,3%.
9. Prin testarea nested PCR atât a urinei cât și a vezicii urinare s-a constatat obținerea unor rezultate similare (13/20), dar mai multe studii care să certifice sensibilitatea acestor tipuri de probe sunt esențiale.

10. Analiza comparativă a tuturor diagnosticilor efectuate pentru 6 iepuri a dovedit qPCR de la nivelul organelor metoda cu pozitivitate maximă, ceea ce sugerează că prezintă cea mai mare eficacitate.

6. Studiul 6 - Studii de caz

În cadrul acestui capitol a fost realizată o prezentare a anumitor cazuri de iepuri cu sau fără manifestare clinică specifică encefalitozoonozei în relație cu rezultatele diagnosticilor efectuate. Cele 4 tipologii de cazuri selectate pentru a fi prezentate au fost: caz pozitiv cu simptomatologie prezentă, în vederea stabilirii diagnosticului de certitudine; caz pozitiv cu absența simptomelor specifice, în vederea screening-ului infecției; caz negativ cu simptomatologie specifică prezentă, în vederea stabilirii diagnosticului diferențial; caz negativ cu absența semnelor clinice, în vederea screening-ului infecției.

III. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Scopul cercetărilor proprii a fost realizarea unui studiu complet în ceea ce privește *Encephalitozoon cuniculi* la iepuri domestici și sălbatici din regiunea de Nord-Vest a României, mai exact prin identificarea agentului patogen folosind metode serologice și de genetică moleculară, urmate de compararea acestor rezultate și identificarea eficacității metodelor efectuate. Acestea au generat următoarele concluzii:

1. Studiul clinic al iepurilor a identificat o prevalență de 8,40% (32/381; IC 95%: 6,01-11,62) de pacienți cu simptomatologie specifică encefalitozoonozei, manifestată preponderent prin semne de tip neurologic (ataxie, torticolis, nistagmus, crize convulsive cu/fără rostogoliri), dar și renale (incontinență urinară, polidipsie, poliurie, anorexie). Investigațiile paraclinice efectuate nu au oferit informații semnificative asupra diagnosticului direct al *E. cuniculi*, însă acestea rămân o unealtă utilă în contextul evaluării bolii acute și pentru excluderea unor diagnostice diferențiale.
2. Identificarea *E. cuniculi* a fost realizată prin metode serologice și tehnici de genetică moleculară.
3. Diagnosticul serologic realizat prin metoda ELISA a condus la obținerea următoarelor rezultate:
 - 3.1. O prevalență totală de 43,02% (151/351, IC 95%: 37,94-48,25) la iepurii domestici, diferențe semnificative statistic fiind identificate în ceea ce privește variabilele de vârstă, anotimpul de recoltare a probelor, scorul corporal, statusul clinic și județul de proveniență.
 - 3.2. Pe baza acestor rezultate, iepurii adulți, în anotimpurile de primăvară și toamnă, cu scor corporal în afara limitei normale și cu simptome specifice bolii ar fi mai predispuși să prezinte seropozitivitate.
 - 3.3. Metoda serologică ELISA a demonstrat o bună fezabilitate pentru testarea unei populații largi de iepuri ca și metodă calitativă, iar rezultatele comparative

- prin metoda cantitativă IFAT au arătat o corelație bună a rezultatelor.
4. Diagnosticul prin tehnici de genetică moleculară a urmărit identificarea ADN-ului specific *E. cuniculi* prin tehnici PCR (nested PCR și qPCR), pe probe de urină, fecale sau organe, provenite atât de la iepuri domestici cât și sălbatici, cu obținerea următoarelor rezultate:
 - 4.1. Prin nested PCR a fost identificată o prevalență totală de 45,45% (110/242; IC 95%: 39,30-51,75). Între diferitele tipuri de probe testate, cea mai mare prevalență a rezultat în cazul organelor 61,54% (32/52, IC 95%: 47,02-74,70), datorită faptului că eliminarea sporilor parazitari prin urină și fecale este intermitentă și astfel, probabilitatea este mult mai mică de a se detecta ADN specific din acestea.
 - 4.2. Nested PCR a oferit rezultate concludente în cazul protocolului de lucru descris de Katzwinkel-Wladarsch și colab. (1996), cu folosirea primerilor MSP1_for și MSP2A_rev pentru primul PCR, respectiv primerii MSP3_for și MSP4A_rev pentru al doilea PCR.
 - 4.3. Prin nested PCR s-a identificat *E. cuniculi* cu relevanță statistică semnificativă pentru următoarele grupe: tineret, asimptomatici, din sistemul de creștere gospodăresc și în anotimpurile vară și iarnă. Aceste rezultate subliniază importanța acestui tip de diagnostic, care poate identifica ADN-ul specific chiar și în cazul stării de latență, fără ca animalul infectat să prezinte manifestare clinică, cât și pentru evidențierea stării de infecție în cazul iepurilor destinați consumului de carne și a posibilelor riscuri zoonotice aferente.
 - 4.4. Tehnica qPCR a relevat o prevalență totală de 48,39% (15/31, 95% CI: 31,97-65,16), similară celei obținute prin nested PCR, însă fără posibilitatea realizării unei analize statistice datorită eșantionului redus de probe.
 - 4.5. Prin ambele tehnici de genetică moleculară utilizate am obținut, și raportat pentru prima dată, pozitivitate în cazul testării vezicii urinare, respectiv 30,56% (11/36, IC 95%: 18,00-46,86) prin nested PCR și 35,29% (6/17; IC 95%: 17,31-58,70) prin qPCR. Aceste rezultate oferă o nouă abordare asupra modalităților de diagnostic a *E. cuniculi* din acest țesut.
 5. Evaluarea comparativă a rezultatelor metodei serologice cu cele de genetică moleculară a demonstrat următoarele:
 - 5.1. Metoda ELISA a oferit o seroprevalență mai crescută (58,96%, 125/212) față de pozitivitatea prin nested PCR (43,40%, 92/212). Prima metodă a arătat prevalență semnificativ mai mare pentru iepurii adulți și simptomatici, în timp ce cel de-al doilea tip de diagnostic a arătat pozitivitate relevantă pentru indivizii tineri și asimptomatici. Aceste rezultate nu declară o metodă mai sensibilă decât cealaltă, ci demonstrează aplicabilitatea fiecăreia în funcție de disponibilitatea probelor care pot fi testate, cât și dependența de stadiul infecției, în concordanță cu evoluția clinică a pacientului.

- 5.2. În relație cu seropozitivitatea, iepurii cu vârsta de peste 4 luni s-au dovedit a fi de 4,5 ori mai predispuși să prezinte un rezultat pozitiv decât tineretul, iar în ceea ce privește anotimpul probele recoltate iarna au prezentat șanse semnificativ mai mici de pozitivitate față de cele recoltate primăvara. Comparativ, prin nested PCR probele recoltate vara au prezentat șanse semnificativ mai mari decât cele recoltate primăvara pentru rezultate pozitive. Acestea ne arată încă o dată caracterul divers de identificare al *E. cuniculi* în funcție de tipul de tehnică efectuat și de tipul de probe.
- 5.3. Prin compararea rezultatelor nested PCR și qPCR s-a observat prevalența de 54,84% (17/31) respectiv 48,39% (15/31), cu favoarea pozitivității în cazul primei tehnici.
- 5.4. Comparativ cu metoda nested PCR considerată golden standard, sensibilitatea și specificitatea au fost ușor mai înalte pentru qPCR față de ELISA, însă ambele metode rămân utile.
6. Studiile de caz au evidențiat importanța diagnosticului *E. cuniculi* atât în context clinic al unei infecții acute, simptomatice, în contextul diagnosticului diferențial, cât și pentru iepurii aparent asimptomatici, în scop de screening.

Recomandări:

1. În vederea diagnosticului *E. cuniculi* ante-mortem recomandăm metodele serologice de detectare a anticorpilor specifici, recoltarea sângelui fiind rapidă și facilă, iar identificarea expunerii la agentul patogen prezentând succes.
2. În scop de screening al populațiilor largi de iepuri recomandăm diagnosticul serologic prin metoda ELISA, acesta reprezentând o tehnică fezabilă unui eșantion larg de probe și o unealtă utilă în controlul răspândirii *E. cuniculi*.
3. În cazul diagnosticului post-mortem *E. cuniculi* recomandăm testarea organelor de predilecție, respectiv creier, cristalini, rinichi și vezică urinară, prin metoda nested PCR, care a demonstrat rezultate semnificative și de precizie chiar și în lipsa semnelor clinice ante-mortem.
4. De asemenea, în cazul probelor de urină sau fecale pot să apară rezultate fals negative datorită eliminării sporadice a sporilor patogeni, de aceea determinările care folosesc aceste probe nu sunt recomandate.

IV. ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

1. Teza de față raportează pentru prima dată în literatura de specialitate prevalența *E. cuniculi* în regiunea de Nord-Vest a României, fiind un studiu complet de diagnostic (investigații clinice, paraclinice, serologice - ELISA și IFAT - și tehnici de genetică moleculară nested PCR și qPCR), realizat la iepuri domestici.
2. În studiul de față s-a realizat, pentru prima dată, și identificarea *E. cuniculi* în organe provenite de la iepuri sălbatici, prin tehnici de genetică moleculară.
3. Studiul actual a vizat testarea pentru identificarea *E. cuniculi* prin tehnici de genetică moleculară la nivelul vezicii urinare și a raportat pentru prima oară în literatura de specialitate obținerea pozitivității prin nested PCR și qPCR.
4. Pozitivitatea ridicată atât în rândul iepurilor asimptomatici, cât și la cei crescuți în sistem gospodăresc și de companie, sunt rezultate importante, și de avut în vedere, în special în contextul caracterului zoonotic al *E. cuniculi*.
5. Analiza rezultatelor diagnosticului *E. cuniculi* în funcție de anotimpul în care probele au fost recoltate a oferit rezultate importante, primăvara și toamna prezentând o pozitivitate semnificativ crescută pentru anticorpii IgG anti-*E. cuniculi* prin metoda ELISA și vara prin metoda nested PCR, pentru identificarea ADN specific *E. cuniculi*.
6. O contribuție inovativă este reprezentată de aplicabilitatea practică a metodelor de diagnostic *E. cuniculi* prezentate în această teză, prin tehnici serologice și de genetică moleculară în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară, Departamentul de Genetică și Eredopatologie din cadrul FMV - USAMV Cluj-Napoca și asigurarea de servicii economice către proprietari și crescătorii de iepuri.
7. Rezultatele acestui studiu contribuie la creșterea gradului de conștientizare în rândul proprietarilor cu privire la riscul infecției cu *E. cuniculi* în rândul populațiilor de iepuri din România și subliniază importanța implementării măsurilor de prevenție menite să limiteze răspândirea agentului patogen atât la alte animale, cât și la oameni.

Bibliografie selectivă

1. Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A., & Künzel, F. (2009). Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 163(1-2), 18-26.
2. Han, B., Takvorian, P. M., & Weiss, L. M. (2020). Invasion of host cells by microsporidia. *Frontiers in microbiology*, 11, 172.
3. Harcourt-Brown, F. M., & Holloway, H. K. R. (2003). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Veterinary Record*, 152(14), 427-431.
4. Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Heise, W., Löscher, T., & Rinder, H. (1996). Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine & International Health*, 1(3), 373-378.
5. Kimura, M., Aoki, M., Ichikawa-Seki, M., Matsuo, K., Yagita, K., & Itagaki, T. (2013). Detection and genotype of *Encephalitozoon cuniculi* DNA from urine and feces of pet rabbits in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(8), 1017-1020.

6. Latney, L. T. V., Bradley, C. W., & Wyre, N. R. (2014). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Veterinary medicine: research and reports*, 169-180.
7. Meredith, A. L., & Richardson, J. (2015). Neurological diseases of rabbits and rodents. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24(1), 21-33.
8. Wright, J. H., & Craighead, E. M. (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. *The Journal of Experimental Medicine*, 36(1), 135.