



UNIUNEA EUROPEANĂ



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI ȘI
CERCETĂRII
ȘTIINȚIFICE

OIPOSDRU



REZUMAT

Cuvinte cheie: *căpușe nehrănite, agenți patogeni, detecție moleculară, populații microbiene*

În Europa, căpușele sunt considerate drept cei mai importanți vectori prin prisma numărului de infecții transmise la animale și la om. Specia *Ixodes ricinus* deține primul loc din punctul de vedere al abundenței, fiind distribuită pe întreg continentul. Căpușele din cadrul acestei specii sunt capabile să transmită o gamă largă de agenți patogeni, din categoria bacteriilor, virusurilor și a protozoarelor. *Ixodes ricinus* este specia dominantă și în România, reprezentând 86.9% din numărul total de căpușe, ea fiind urmată de *Dermacentor marginatus* (9.5%), *Haemaphysalis punctata* (2.6%) și *Dermacentor reticulatus* (0.02%). Căpușele *Rhipicephalus* spp. pot fi de asemenea întâlnite pe teritoriul României, în regiunile joase din sud-estul țării. *Rhipicephalus sanguineus* și *Rhipicephalus rossicus* sunt două alte specii prezente în România, acestea parazitând câinii și ocazional omul.

În ceea ce privește factorii ce contribuie la expansiunea agenților patogeni transmiși de căpușe, aceștia sunt factori biotici și abiotici complecși ce influențează distribuția și abundența, în special a căpușelor ixodide, având un impact major și asupra dinamicii de transmitere a agenților patogeni. Schimbările climatice au fost invocate ca fiind cauza primară a expansiunii teritoriale a căpușelor și a creșterii numărului de infecții transmise de acestea. De exemplu, emergența virusului encefalitei de căpușă, a babesiozei umane și a anaplasmozei granulocitare în Europa și în America de Nord s-a realizat concomitent cu încălzirea globală. Totuși, aceste modificări ale incidenței și distribuției geografice trebuie corelate cu alte cauze potențiale, cum ar fi conștientizarea autorităților, modificările antropogene, în special fragmentarea habitatelor, urbanizarea, desființarea și înființarea pădurilor, utilizarea sub diverse forme a terenurilor.

România deține o particularitate unică comparativ cu restul țărilor din Europa, având teritoriul divizat în cinci ecoregiuni caracterizate printr-o bogată diversitate a ecosistemelor, a habitatelor și a speciilor de mamifere prezente. În ceea ce privește tipurile de habitat existente în România, conform sistemului de clasificare Palaearctic Habitats, au fost descrise 357 de tipuri încadrate în șapte clase și 24 de subclase. Varietatea speciilor de mamifere din România este reprezentată de cele 112 specii existente; o biodiversitate crescută se observă mai ales în rândul rozătoarelor, cu 32 de specii de rozătoare sălbatice, unele dintre aceste specii fiind anterior descrise drept gazde ale căpușelor ixodide. Ambele componente biotice și abiotice din cadrul unui habitat





UNIUNEA EUROPEANĂ



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI ȘI
CERCETĂRII
ȘTIINȚIFICE

OIPOSDRU



influențează dinamica de răspândire a populațiilor de căpușe. Deoarece tipul de vegetație are efect asupra prezenței și mișcării speciilor gazdă, este de presupus că acestea influențează prezența, densitatea și persistența speciilor de căpușe dar și probabilitatea de a găsi o gazdă. Unele specii de căpușe se asociază cu anumite categorii de habitat și condiții specifice de microclimat caracterizate printr-o serie de variabile cum ar fi: umiditatea, temperatura și ritmul circadian.

Teza de doctorat cu titlul **“Cercetări epidemiologice și etiologice asupra unor boli infecțioase emergente cu transmitere vectorială în zona de est a României”** este structurată în concordanță cu normele în vigoare, în două părți principale: o primă parte, intitulată **„Stadiul actual al cunoașterii”**, ce conține un număr de 44 de pagini și o a doua parte, intitulată **„Contribuții personale”**, ce detaliază rezultatele obținute de-a lungul perioadei de studii doctorale, având un număr de 102 pagini. Pe lângă aceste două părți principale, teza conține un cuprins, o introducere, un rezumat și o listă a surselor bibliografice.

Prima parte, **„Stadiul actual al cunoașterii”**, este structurată în patru capitole și prezintă informații cu privire la principalele componente implicate în transmiterea vectorială de agenți patogeni, condițiile epidemio-climatice și informații privind speciile de căpușe și agenții bacterieni și virali transmiși de căpușele dure. Ultimul capitol al primei părți prezintă diferite tehnici ale secvențierii de ultimă generație, ce pot fi aplicate pentru identificarea de agenți patogeni în căpușe.

Primul capitol, cu titlul **“Căpușele Ixodidae cu rol în transmiterea agenților patogeni la animale și la om în România”**, începe prin a descrie condițiile epidemio-climatice din România ce pot influența distribuția căpușelor. Sunt de asemenea oferite informații cu privire la diversitatea speciilor de căpușe și sunt descrise pe larg principalele specii de căpușe aflate pe teritoriul României.

România cuprinde o mare diversitate în ceea ce privește speciile de căpușe prezente, tocmai datorită varietății habitatelor și a mării diversității a speciilor gazdă. Hărțile de distribuție existente prezintă specia *Ixodes ricinus* drept cea mai abundentă (86.9%), fiind urmată de *Dermacentor marginatus* (9.5%) și *Haemaphysalis punctata* (2.6%). Totuși, în sudul României există alte două căpușe specifice regiunii, respectiv speciile paleartice termofile *Rhipicephalus bursa* și *Hyalomma marginatum*. *Ixodes ricinus* este asociată cu transmiterea la om a celui mai mare număr de agenți patogeni, fiind și cel mai important vector al agenților zoonotici din România datorită distribuției largi și a hrănirii pe un număr mare de specii gazdă, a parazitării omului și a capacității vectoriale crescute.

Cu referire la agenții patogeni, capitolul II intitulat **“Agenți patogeni bacterieni transmiși de căpușe”**, descrie principalii agenți bacterieni raportați în căpușele din România. Din categoria infecțiilor provocate în urma parazitismului căpușelor, în Europa, boala Lyme deține cel mai mare



număr de infecții. Bacteriile din grupul *Borrelia burgdorferi* sensu lato provoacă anual circa 80.000 de cazuri. Agenții acestui gen au suscitât cel mai mult interesul, ca urmare a implicațiilor majore în probleme de sănătate publică. Alți agenți bacterieni au fost descriși în căpușele și animalele gazdă din România: *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp. și *Candidatus Neohrlichia mikurensis*.

Capitolul III, “**Agenți patogeni virali transmiși de căpușe**”, descrie pe larg doi agenți virali, prin prisma existenței lor pe teritoriul României. În cadrul aceluiași capitol sunt prezentate și alte arbovirusuri ce ar putea face obiect de studiu pentru viitoare cercetări privind agenții virali în căpușele din România.

În cadrul capitolului IV, “**Secvențierea de ultimă generație – aplicație pentru explorarea microbiomei din căpușe**”, sunt descrise metodele de secvențiere utilizate în studii de metagenomică. Sunt de asemenea prezentate aplicațiile secvențierii de ultimă generație. Având în vedere faptul că numeroase studii vizează să identifice agenții patogeni transmiși de căpușe din România, tehnicile de secvențiere de ultimă generație pot oferi o descriere completă a populațiilor microbiene din căpușe.

Partea a doua a tezei, „**Contribuții personale**”, este alcătuită din **cinci capitole**, fiecare capitol prezentând detaliat rezultatele obținute pe durata studiilor de doctorat. Această parte de contribuții proprii se încheie cu un capitol în care sunt enumerate concluziile finale ale cercetărilor.

La momentul actual, în țara noastră infecțiile transmise de căpușe se află încă în evaluare pentru descrierea situației lor epidemiologice. Există o necesitate în ceea ce privește aplicarea unor programe de supraveghere, dat fiind faptul că agenții infecțioși transmiși de căpușe pot fi cu ușurință diseminați pe teritorii întinse.

Scopul lucrării a fost acela de a obține noi informații cu privire la situația epidemiologică a agenților patogeni transmiși de căpușe în zona de est a României. Lucrarea a cuprins o abordare integrată ce a vizat evaluarea riscului infecțiilor vectorizate de căpușe pentru animale și om, fiind în concordanță cu principiile de bază a conceptului *One Health*. Pentru a îndeplini scopul propus, au fost stabilite **trei obiective generale**:

- ***Anchete seroepidemiologice asupra principalelor infecții cu transmitere vectorială la animale și la om*** în zona de studiu (Estul României). În cadrul acestui obiectiv au fost efectuate două anchete seroepidemiologice. Prima anchetă a urmărit identificarea anticorpilor specifici IgG anti-*Borrelia* la câinii aflați în padocuri și a celor din gospodăriile populației. A doua anchetă seroepidemiologică a urmărit detecția anticorpilor specifici virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo în probele de ser recoltate de la rumegătoarele mici.

- **Identificarea prin metode de biologie moleculară a agenților patogeni în căpușele nehrănite**, a vizat aplicarea tehnicilor de biologie moleculară pentru a identifica cei mai importanți agenți patogeni (bacterii și virusuri) transmiși de căpușe și pentru a stabili rata de asociere a acestor agenți în căpușele nehrănite colectate din trei regiuni distincte din punct de vedere geografic dar și al tipului de habitat din estul României.
- **Caracterizarea comunităților microbiene din căpușe prin aplicarea secvențierii de ultimă generație (NGS)** a urmărit stabilirea componenței comunităților microbiene în căpușele din România, prin aplicarea metodelor de secvențiere de ultimă generație.

În capitolul VI, intitulat “**Investigații seroepidemiologice asupra principalelor infecții transmise de căpușe la animale și la om**” sunt prezentate rezultatele obținute în urma efectuării a două anchete seroepidemiologice pentru detecția animalelor cu anticorpi specifici bolii Lyme și respectiv febrei hemoragice Crimeea-Congo.

Primul subcapitol oferă o descriere pe larg a anchetei seroepidemiologice efectuată la oile și caprele din sud-estul țării pentru detecția anticorpilor specifici anti-**febra hemoragică Crimeea-Congo**. FHCC circulă în natură prin intermediul unui ciclu căpușă - gazda vertebrată - căpușă; în transmiterea virusului intervin căpușe din genul *Hyalomma*, cel mai important reprezentant fiind specia *Hyalomma marginatum*. *H. marginatum*, vectorul principal al virusului FHCC în Europa, este o căpușă cu două gazde.

Prezentul studiu s-a realizat pentru a determina prevalența anticorpilor specifici virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo (VFHCC) la oile și caprele din regiunea Dobrogei și pentru a identifica factorii de risc asociați prezenței infecției la oi și capre.

Regiunea luată în studiu a fost selectată ținând cont de distribuția pe teritoriul țării noastre a principalului vector *H. marginatum* dar și de datele obținute de către Ceianu și colab., 2012, ce au raportat o prevalență de 27.8% probe pozitive serologic la infecția cu virusul FHCC. Testarea s-a efectuat pe probe de ser recoltate de la oi din județul Tulcea.

Pentru efectuarea reacției imunoenzimatică ELISA, inițial au fost recoltate probe de ser din 10 localități din regiunea Dobrogei: 3 localități din județul Tulcea și 7 localități aparținând județului Constanța. În total, au fost testate 90 de probe de ser, dintre care 29 de seruri provenite de la capre și 62 de seruri recoltate de la oi. Probele au fost recoltate în perioada iulie-septembrie 2014, serurile fiind conservate la temperatura de -20°C până în ziua testării. Pentru realizarea reacției s-a utilizat un kit comercial produs de VectorBest – Rusia, Vect-Crimean-CHF-IgG, placa având în godeuri antigen viral FHCC. În urma efectuării testului imunoenzimatic ELISA pe 90 probe de ser dintre care 29 de la caprine și 61 de la ovine, a fost identificată o seropozitivitate de 74.4% (67 probe pozitive), 16 probe de la caprine (16/29; 55%) și 51 probe de la ovine (51/61;

85%). Animalele nu au prezentat semne clinice, rumegătoarele mici fiind considerate rezervor natural de virus, cu manifestări clinice reduse.

Seroprevalența înregistrată în cadrul acestui studiu a fost de 74.4%. Aceasta a avut valori mai mari la ovine (85%) comparativ cu seroprevalența obținută la caprine – 55.1%. Acest studiu reprezintă un semnal de alarmă și impune efectuarea de cercetări mai ample privitor la circulația virusului, situația epidemiologică în cadrul rezervorului reprezentat de animalele de rentă și riscul pentru om.

În urma examinării oilor și caprelor incluse în studiu au fost colectate 74 căpușe adulte *Rhipicephalus spp.* Aceste căpușe au fost testate mai apoi prin rRT-PCR pentru detecția virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo; toate probele analizate **au fost negative** pentru infecția cu acest agent viral.

Al doilea subcapitol detaliază rezultatele obținute în urma testării serologice a câinilor din padocuri și gospodării pentru anticorpii specifici anti-**boala Lyme**. Boala Lyme este o infecție multisistemică cauzată de diferite specii bacteriene ale complexului *Borrelia burgdorferi* transmise de căpușele genului *Ixodes*. Genospeciile detectate frecvent la animale și om în Europa sunt *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* și *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Acești agenți sunt transmiși de diferite specii ale genului *Ixodes*, vectorul principal al infecției fiind specia *Ixodes ricinus*. Anchetele serologice efectuate la câini pentru detecția anticorpilor specifici anti-*Borrelia* oferă perspective încurajatoare în identificarea zonelor potențiale de risc pentru om. Luând în considerare similitudinile dintre factorii de risc ai bolii Lyme la câine și om, sistemul de supraveghere a câinilor poate fi o metodă eficientă de stabilire a riscului și a răspândirii geografice a bolii. Scopul acestui studiu a constat în stabilirea prevalenței anticorpilor specifici anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. în probele de ser colectate de la câini din patru județe situate în estul României. Odată cu stabilirea prevalenței, am urmărit identificarea unei posibile asocieri între cazurile existente la om și situația epidemiologică la câini. În cadrul zonei luate în studiu, au fost diagnosticate cazuri de boală Lyme la om. În urma reacției ELISA, din cele 90 de probe testate a rezultat o singură probă pozitivă (1.1%), aparținând unei femele în vârstă de patru ani din județul Tulcea.

Prevalența anticorpilor anti-*Borrelia burgdorferi* complex obținută în prezentul studiu este scăzută comparativ cu alte studii efectuate în România. Pentru a determina zonele endemice de boală Lyme, este indicată efectuarea anchetelor serologice în cadrul categoriilor expuse atacului căpușelor (ex. câini de vânatoare); aceste categorii expuse pot îndeplini rolul de santinelă sau seroindicatori de noi focare.

Capitolul VII, intitulat “**Identificarea prin metode de biologie moleculară a agenților patogeni în căpușe nehrănite (*questing*)**”, a avut ca obiectiv identificarea celor mai importanți agenți patogeni transmiși de căpușe (bacterii și virusuri) și descrierea prevalenței coinfectiilor în căpușele nehrănite colectate din trei zone distincte atât geografic cât și din punct de vedere al tipului de habitat.

În România au fost efectuate numeroase studii cu privire la prevalența agenților patogeni în căpușe colectate de pe vegetație și gazde. Majoritatea acestor studii s-au axat pe identificarea unui singur agent sau a unui număr limitat de agenți patogeni în căpușe. Prevalența coinfectiilor în căpușele din Europa are valori cuprinse între 3.2 și 28.8%, acest fapt având implicații medicale importante și reflectă necesitatea identificării coinfectiilor în căpușele din România.

Doar căpușele adulte și nimfele au făcut obiectul acestui studiu. S-a colectat un număr total de 557 căpușe (zona 1 n=67; zona 2=315; zona 3=175). Identificarea stadiilor de dezvoltare și a speciilor s-a realizat prin intermediul cheilor de identificare taxonomică.

Agenti patogeni identificați în căpușele *Ixodes ricinus*

Căpușele *I. ricinus* au reprezentat 95.9% (534/557) din căpușele colectate din zonele de studiu, dintre care 77 au fost adulți și 457 nimfe. În cadrul acestui studiu, rata de infecție globală cu unul sau mai mulți agenți patogeni a avut o valoare de 47.9% (256/534). Rata de infecție nu a prezentat diferențe statistice semnificative între căpușele adulte (50.6%; 39/64) și nimfe (47.4%; 217/457).

***Borrelia* spp. a fost identificată în 164 (30.7%) de căpușe *I. ricinus*.** Valorile prevalenței nu au înregistrat diferențe între stadiile de dezvoltare, căpușele adulte fiind pozitive într-un procent de 32.4% (25/77), respectiv 30.6% (139/457) rata de infecție a nimfelor. Probele pozitive la infecția cu *Borrelia* spp. au fost incluse într-o reacție *nested*-PCR, scopul fiind amplificarea genei *IGS 16S-23S*. În urma acestui test au fost obținute 20 de probe pozitive. În urma reacției *nested*-PCR, 144 de probe pozitive pentru *Borrelia* spp. nu au fost identificate la nivel de specie. Aceste probe au fost mai apoi incluse într-o reacție de PCR în timp real cu scopul de a identifica șapte specii diferite ale genului *Borrelia*. În urma reacției au rezultat 113 probe pozitive pentru una sau mai multe specii ale genului *Borrelia*. Gena *rpoB* specifică speciei *B. burgdorferi sensu stricto* a fost detectată în două nimfe. *B. garinii rpoB* a fost identificată în 79 căpușe *I. ricinus*; 46 de căpușe au fost pozitive pentru infecția cu *B. afzelii*. *B. valaisiana ospA* a fost găsită în 26 de căpușe. De asemenea, 26 de căpușe au fost pozitive pentru *B. lusitaniae rpoB*. *Borrelia spielmanii* a fost identificată în șase căpușe iar o nimfă a fost pozitivă pentru infecția cu *B. bissetti*.

Anaplasma phagocytophilum* a fost identificată în 7/534 (1.3%) căpușe *I. ricinus, aflate în stadiul de nimfă. În România nu există până în prezent îmbolnăviri semnalate la om însă numeroase studii au demonstrat circulația *A. phagocytophilum* pe teritoriul țării.

Speciile genului *Rickettsia* determină infecții emergente, prezente în Europa și implicit în România, ce pot provoca o gamă largă de manifestări clinice. Cercetările anterioare din România au semnalat prezența speciilor *Rickettsia* în căpușe colectate de pe diverse gazde, până în prezent nefiind efectuate studii care să descrie prevalența *Rickettsia* spp. în căpușele nehrănite.

Rickettsia* spp. a fost observată în 78/534 (14.6%) de căpușe *I. ricinus. Nu au existat diferențe în ceea ce privește prevalența *Rickettsia* spp. la căpușele adulte și cele aflate în stadiul de nimfă. Secvența de ADN specifică acestui gen a fost identificată în 12/77 adulți (15.5%) și în 66/457 (14.4%) nimfe.

***Bartonella* spp. a fost identificată în 22 de căpușe *I. ricinus* (22/534; 4.1%)**. Căpușele adulte au prezentat o rată a infecției de 7.7% (6/77) în timp ce 3.5% (16/457) nimfe au prezentat produși de amplificare specifici genului *Bartonella*. Secvențierea a determinat încadrarea unei singure secvențe cu identitate 100% ca fiind *B. henselae* (nr de acces Genbank: HG965802.1). Competența *I. ricinus* de a transmite *B. henselae* a fost demonstrată în condiții de laborator și de asemenea au fost identificate infecții umane ca urmare a mușcăturii căpușelor.

Secvențe specifice speciei *C. N. mikurensis* au fost identificate în 29 de căpușe *I. ricinus* (29/534; 5.4%), toate aflate în stadiul de nimfă. La momentul actual, există un volum redus de informații legat de circulația *C. N. mikurensis* pe teritoriul României. Acest lucru ar trebui să reprezinte un semnal de alarmă având în vedere faptul că este vorba despre un important agent patogen.

Virusul encefalitei de căpușă a fost detectat în 10 probe de ARN, în urma testării prin rRT-PCR însă nu au putut fi apoi confirmate în cadrul reacției *nested-PCR*.

Există numeroase publicații ce prezintă persoane infectate concomitent cu mai mulți agenți patogeni transmiși de căpușe. Acest fenomen este de așteptat, având în vedere faptul că numeroase căpușe pot fi infectate cu doi sau mai mulți agenți patogeni pe care-i pot transmite simultan. De asemenea, **coinfecțiile** pot fi detectate mai frecvent în căpușele *I. ricinus* având în vedere gama largă de specii gazdă pe care se pot regăsi. Cu toate că asocieri ale agenților patogeni pot avea un impact major asupra diagnosticului și a tratamentului bolilor transmise de căpușe, foarte puține studii din România s-au adresat determinării prevalenței coinfecțiilor în căpușe.

Căpușele *I. ricinus* au fost pozitive pentru asocierea mai multor specii ale genului *Borrelia*. Astfel, 57 de indivizi au fost pozitivi pentru infecția cu **două specii de spirochete** iar opt căpușe au prezentat secvențe specifice pentru **trei specii** de *Borrelia* diferite. Cea mai frecventă

asociere a fost cea dintre *B. garinii* și *B. afzelii* (30/57; 52.6% căpușe *I. ricinus*) urmată de *B. garinii/B. lusitaniae* (18/57; 31.5% căpușe).

Căpușele *I. ricinus* au înregistrat **coinfecții ale speciilor de *Borrelia* cu alți agenți patogeni** testați în cadrul aceluiași studiu. Acestea au fost detectate în 8.2% căpușe *I. ricinus* (44/534; 6.4% în stadiul adult și 8.5% din nimfe) din toate cele trei zone luate în studiu. În ceea ce privește coinfecțiile dintre doi agenți patogeni, respectiv o specie *Borrelia* și alt gen bacterian, acestea au fost identificate în 22 căpușe *I. ricinus*.

Rezultatele din acest studiu ridică semne de întrebare referitor la posibilitatea de co-transmitere a acestor agenți la om, incidența acestora, efectul coinfecțiilor asupra severității simptomelor, eficacitatea tratamentelor împotriva infecțiilor multiple și dezvoltarea unor noi metode de diagnostic.

Agenți patogeni identificați în căpușele *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus reprezintă specia clasată pe locul secund din punctul de vedere al abundenței în Europa centrală. Totuși, până acum, în România prevalența căpușelor nehrănite *D. reticulatus* a fost estimată la 0.02%. În urma colectării prin metoda drapelului, s-a identificat un număr de patru femele *D. reticulatus* (4/557; 0.7%). Căpușele au fost testate pentru toți agenții patogeni luați în studiu, obținându-se o probă pozitivă la infecția cu *Rickettsia* spp. În urma secvențierii produsului amplificat, a fost obținută o identitate de 99% cu *Rickettsia raoultii* (nr. acces în GenBank KJ663737.1).

Agenți patogeni identificați în căpușele *Haemaphysalis punctata*

Specia *H. punctata* reprezintă 3.4% din numărul total de căpușe colectate, fiind obținuți 19 indivizi (trei adulți și 16 nimfe). Au fost detectate trei nimfe pozitive (3/19; 15.7%), fiecare cu un agent patogen diferit, din cei incluși în cadrul acestui studiu. ADN-ul specific *Borrelia* spp. a fost identificat la o nimfă. Produsul PCR a fost secvențiat cu succes, secvența având o identitate de 94% cu *Borrelia miyamotoi*. *Rickettsia* spp. a fost diagnosticată într-o nimfă; secvențierea nu a oferit o secvență validă pentru produsul PCR obținut. ADN-ul *Bartonella* spp. a fost observat de asemenea într-o nimfă *H. punctata* iar secvențierea nu a permis încadrarea produsului PCR. În țara noastră există un număr limitat de informații privind prevalența agenților patogeni în căpușele *H. punctata*, nefiind raportate căpușe infectate. Rezultatele noastre oferă informații privind rolul ipotetic de vectori pentru agenți patogeni importanți al căpușelor nehrănite *H. punctata*.

Capitolul VIII intitulat, “**Detectia agenților patogeni din căpușe prin intermediul sistemului *High-throughput real-time PCR***”, include un studiu în cadrul căruia au fost analizate 144 de probe pozitive la infecția cu *Borrelia* spp. Probele au fost testate prin **sistemul BioMark real-time PCR system (Fluidigm, USA)** pentru a identifica speciile din cadrul genului *Borrelia*

dar și pentru detecția altor agenți patogeni. De asemenea, 34 de amestecuri au fost testate pentru 24 de agenți virali vectorizați prin intermediul căpușelor ixodide.

În cadrul sistemului BioMark™ au fost testate 144 de probe pozitive pentru infecția cu *Borrelia* spp. Aceste probe au fost analizate pentru 39 agenți bacterieni și parazitari vectorizați de căpușele dure. În urma testării nu au fost obținute probe pozitive pentru 15 agenți bacterieni (*Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma marginale*, *A. platys*, *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. canis*, *Rickettsia conorii*, *R. slovacca*, *R. masilliae*, *R. aeschlimannii*, *Bartonella quintana*, *Coxiella burnetii*) și 9 agenți parazitari (*Babesia divergens*, *B. canis*, *B. bovis*, *B. caballi*, *B. bigemina*, *B. major*, *B. ovis*, *Theileria equi*, *T. annulata*).

Au fost identificate șapte genospecii din grupul *Borrelia burgdorferi* s.l., *B. garinii* fiind specia dominantă în căpușele testate (79/144; 54.8%) urmată de *B. afzelii* (46/144; 31.9%). *B. valaisiana* și *B. lusitaniae* au fost identificate în 26 (26/144; 18%) de probe distribuite în toate cele trei zone luate în studiu.

În probele de ADN au fost identificate *Anaplasma phagocytophilum* și *C. N. mikurensis* cu o prevalență scăzută (1.3%; 2/144 respectiv 2.7%; 4/144). În ceea ce privește genul *Rickettsia*, 60 de probe au oferit un semnal pozitiv (60/144; 41.6%), sistemul BioMark™ identificând o singură specie din cadrul genului – ***Rickettsia helvetica* cu o prevalență de 11.8%**. Căpușele au fost de asemenea pozitive la infecția cu agenți patogeni parazitari, fiind identificate **trei specii diferite ale genului *Babesia*** – *B. microti*, *B. vogeli* și *B. EU1*. Cele trei specii au înregistrat o rata a infecției de 0.6% (1/144), 1.3% (2/144) și respectiv 2%. Infecțiile multiple cu agenți patogeni au fost identificate în 90 de probe din cele 144 testate (62.5%). **Au fost observate 43 de asocieri diferite între agenții patogeni analizați în căpușele nehrănite**; 23 (23/144; 15.9%) de probe au prezentat asocierea a două genospecii din grupul *Borrelia burgdorferi* s.l., cea mai frecventă asociere fiind între *B. garinii* și *B. afzelii* (11/144; 7.6%), urmată de *B. garinii* și *B. lusitaniae* cu nouă probe pozitive.

Cele 34 de amestecuri (formate în urma asocierii a 557 probe de ARN) de ADN complementar au fost testate prin PCR în timp real microfluid în cadrul sistemului BioMark real-time PCR (Fluidigm, USA), **pentru 24 agenți virali** transmiși de căpușe. Probele provenite de la căpușele nehrănite au fost negative pentru 22 agenți virali (virusul encefalitei de căpușă - TBE european, virusul TBEV tipul far Eastern, virusul TBE tipul Siberian, virusul Langat, virusul Louping ill, virusul Deer tick, virusul Powassan, virusul Meaban, virusul Kyasanur, virusul Omsk, virusul pestei porcine africane, virusul Thogoto, virusul Heartland, virusul Dhori, virusul Kemerovo, virusul Colorado, virusul Eyach, virusul febrei hemoragice Crimeea-Congo, virusul Dugbe, virusul Nairobi, virusul Uukuniemi, virusul Schmallenber).

În urma testării au fost obținute două probe pozitive pentru doi agenți virali diferiți.

Astfel, o probă (amestecul nr. 5) a fost pozitivă pentru virusul West Nile, proba fiind obținută prin adăugarea a 1 μ l din 18 probe de ARN din zona 1. Amestecul nr. 12, obținut din 16 probe de ARN din zona 2 a fost pozitiv pentru infecția cu **virusul Bourbon** din familia *Orthomyxoviridae*. Acest virus a fost prima dată izolat în 2014, de la un pacient din Statele Unite ale Americii. În studiul nostru, rRT-PCR nu a indicat probe pozitive pentru virusul Bourbon iar în urma *nested*-PCR au fost obținuți doi produși PCR însă secvențierea nu a permis obținerea unor secvențe valide.

Acest studiu demonstrează utilitatea unei metode rapide de detecție ce permite testarea pe scară largă a unui număr mare de agenți patogeni transmiși de căpușe. De asemenea, există posibilitatea de adaptare a sistemului pentru îndeplinirea cerințelor regionale de screening a infecțiilor vectoriale.

Capitolul IX, “**Caracterizarea comunităților microbiene din căpușe prin aplicarea secvențierii de ultimă generație**”, evidențiază potențialul secvențierii de ultimă generație (NGS) în cadrul studiilor de descriere a populațiilor microbiene din diverse organisme.

În cadrul primei părți din capitolul IX s-a urmărit caracterizarea populațiilor virale din căpușele colectate de pe vegetație în zona de est a României utilizând tehnologia secvențierii pe scară largă (HTS) pe platforma Illumina NextSeq.

La nivel global, căpușele sunt responsabile pentru transmiterea celei mai mari varietăți de agenți patogeni comparativ cu alte artropode. În România, majoritatea studiilor s-au axat pe identificarea agenților bacterieni transmiși de căpușe, cu o mică preocupare pentru agenții virali vectorizați de căpușe. Datele obținute în urma secvențierii au identificat secvențe similare virusurilor ce se asociază vertebratelor, artropodelor și plantelor. Numărul total al citirilor virale, obținut după etapa de asamblare, a fost de 21 368 211 pentru mixul-1, 32 337 393 pentru mixul-2 și respectiv 29 676 963 pentru mixul-3. Consecutiv, *contig*-urile virale asamblate ce au fost generate pentru fiecare mix au totalizat : 436 956 *contig*-uri în mixul-1, 1 052 524 *contig*-uri în mixul-2 și 272 492 *contig*-uri în mixul-3. Atribuirea taxonomică a secvențelor a reliefat **prezența contig-urilor similare agenților virali din familia *Bunyaviridae***; fiecare mix de probe a avut un număr de 58, 243 și respectiv 11 *contig*-uri. Printre aceste secvențe, unele *contig*-uri au prezentat identitate cu virusuri recent descrise din genul *Nairovirus* – **virusul South Bay** și din genul *Phlebovirus* - **Blacklegged tick phlebovirus-1** și **Blacklegged tick phlebovirus-2**. Având în vedere faptul că un mare număr de *contig*-uri obținute în urma analizei HTS a fost atribuit virusurilor din genul *Nairovirus* și, respectiv *Phlebovirus*, am continuat cercetările pentru a reuși izolarea de agenți virali. **Majoritatea secvențelor au avut o identitate cuprinsă între 70 și 80%, acest aspect indicând posibili noi agenți virali.** Primul pas în caracterizarea acestor agenți virali

a constat în stabilirea prevalenței lor în căpușele nehrănite. ADN-ul complementar similar virusului South Bay a fost detectat în trei căpușe *Ixodes ricinus* (o femelă, un mascul și o nimfă), prevalența generală având o valoare de 0.5%. În urma secvențierii, doar două secvențe au fost valide, provenind de la căpușe colectate din același punct (o femelă și un mascul *I. ricinus*). Secvențele ce au prezentat omologie virusurilor din genul *Phlebovirus* nu au fost detectate în urma analizei prin PCR.

Rezultatele obținute în urma HTS s-au caracterizat printr-o **predominare a secvențelor similare virusurilor din familia *Bunyaviridae***. Numeroase virusuri din cadrul acestei familii au fost recent descrise, la momentul actual existând clasați peste 350 de agenți virali.

În cea de-a doua parte din acest capitol a fost descris profilul metagenomic al comunităților bacteriene asociate căpușelor nehrănite din România. Numărul total de citiri pentru agenții bacterieni în cele trei mixuri a fost 606.368 în mixul-1, 480.101 în mixul-2 și 1.216.785 în mixul-3; citirile au fost distribuite unui număr mare de familii bacteriene, unele conținând specii patogene vectorizate de căpușe. **Au fost identificate genuri bacteriene cu o largă distribuție în Europa: *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Francisella*, *Ehrlichia* dar și agenți patogeni recent identificați în căpușe – *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* și *Orientia* sp.** Alți autori au identificat și descris anterior aceste bacterii în căpușele Ixodide. Genul *Rickettsia* ce aparține clasei *Alphaproteobacteria*, a reprezentat taxonul bacterian dominant în cadrul celor trei mixuri, cu un număr de citiri de 72.333 în mixul-1, 47.541 în mixul-2 și respectiv 354.511 în mixul-3. **Genul *Rickettsia* alături de genul *Borrelia* cuprinde numeroase specii patogene ce sunt vectorizate de către căpușele Ixodidae.** Pe locul secund în ceea ce privește numărul de citiri s-a clasat genul *Francisella* fiind urmat de genul *Borrelia*. În urma analizei datelor obținute prin NGS, au fost detectați numeroși alți agenți bacterieni, recunoscuți drept endosimbionți ai căpușelor (ex. *Wolbachia*, *Rickettsiella*, *Coxiella*) dar și agenți care au reprezentat probabil microbiota de contaminare de pe suprafața căpușelor, fiind în mod obișnuit asociați mediului înconjurător și solului (ex. *Bacillus*, *Methylobacterium*).

Metagenomica asigură fundația pentru noi studii de detecție a agenților patogeni, în scopul evaluării impactului agenților transmiși de căpușe pentru sănătatea publică. De asemenea, aceasta vine în ajutorul anchetelor epidemiologice și a programelor de gestionare a bolilor cu risc zoonotic, inclusiv a celor transmise de căpușe.