



ERIHNP A FROPPANA

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROIECTUL NAȚIONAL DE
REABILITARE SAȘI ÎN
ZARPODURIInstitutul Național de Cercetare Științifică
și Dezvoltare BiologicăInstrumente Științifice
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFPODRE

USAIMV Iași

REZUMAT

Căpușele sunt artropode parazite, obligatoriu hematofage, cu o importanță epidemiologică deosebită la nivel global, atât din punct de vedere medical cât și veterinar. Până în prezent au fost identificate 896 de specii de căpușe, răspândite din zona sub-arctică până la Ecuator. Dintre toate speciile de căpușe, doar 10% au capacitatea de a transmite agenți patogeni sau pot produce afecțiuni cauzate de modul de nutriție: anemie, dermatite și intoxicații (Jongejan și Uilenberg, 2004). Căpușele se hrănesc cu sângele mamiferelor (inclusiv omul), păsărilor și reptilelor și sunt capabile să transmită o mare varietate de virusuri, bacterii și protozoare, ocupând locul întâi din acest punct de vedere, dintre toate artropodele hematofage (Dennis și Piesman, 2005). Din punct de vedere al importanței medicale, se află pe locul doi, fiind precedate doar de țânțari (Sonenshine, 1991). În toată lumea a crescut interesul pentru bolile vectoriale în contextul în care incidența acestora este în continuă creștere (Walker 1998; Telford și Goethert, 2004).

Teza de doctorat cu titlul „**Epidemiologia și diagnosticul unor infecții cu caracter zoonotic transmise de căpușe**” se întinde pe un număr de 213 de pagini și conform normativelor aflate în vigoare este constituită din două părți principale: prima parte, intitulată „**Stadiul actual al cunoașterii**” care cuprinde 59 de pagini și partea a doua, intitulată „**Contribuții personale**” extinsă pe 116 de pagini.

„**Stadiul actual al cunoașterii**” cuprinde patru capitole, în care sunt expuse succint informații din literatura de specialitate cu referire la subiectul tezei de doctorat și care au fost utilizate ulterior pentru interpretarea și compararea datelor obținute în partea de „**Contribuții personale**”.

Primul capitol, intitulat „**Date bibliografice despre căpușele din familia Ixodidae**” este structurat în șase subcapitole și sintetizează informațiile din literatura de specialitate cu privire la clasificarea filogenetică, morfologia și anatomia generală a *Ixodidae*, ciclul de viață, ecologia și comportamentul acestora, speciile de căpușe prezente pe teritoriul României și controlul



URINIA P. BROPTANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROIECTUL NAȚIONAL DE
REABILITARE SANITARE
JANUARIU



Fondul Social European
PERIODA 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDURE



USAMV Iași

populațiilor de căpușe. La ora actuală sunt recunoscute 896 de specii și subspecii de căpușe răspândite în toată lumea (Guglielmone și colab., 2010). În România au fost identificate 27 de specii de căpușe, din care 25 de specii aparținând familiei *Ixodidae* și două specii aparținând familiei *Argasidae* (Coipan și colab., 2011).

Al doilea capitol, intitulat „**Importanța medicală și veterinară a căpușelor**”, tratează rolul de vector al căpușelor și identificarea principalelor specii de căpușe prezente pe teritoriul României și implicate în transmiterea agenților patogeni precum și rolul acestora de rezervor pentru agenții patogeni. Căpușele, pe lângă bolile provocate prin transmiterea de agenți patogeni, pot avea și acțiuni toxice, determinând paralizia gazdei, alergii, anemie, dermatite și intoxicații. În ultimii ani, saliva căpușelor a făcut obiectul unor diferite studii, datorită interesului pentru identificarea și izolarea unor biomolecule care au activitate vasodilatatoare, antiinflamatorie, imunosupresivă și anticoagulantă (Oliveira și colab., 2010).

Capitolul III, intitulat „**Agenți patogeni transmiși de căpușe**” descrie principalii agenți patogeni transmiși de căpușe. Bacteriile transmise de căpușe fac parte din două grupuri principale, Spirochete și Proteobacteria și din aproximativ 10 genuri: *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Aegyptionella*, *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Bartonella*, *Francisella* și *Coxiella*. În afară de bacterii, căpușele transmit și numeroase virusuri, cei mai importanți fiind virusul encefalitei de căpușe și virusul febrei hemoragice de Crimeea-Congo. De asemenea, căpușele sunt incriminate și în transmiterea paraziților din genurile *Babesia* și *Theileria*. Un rol deosebit de important îl au și coinjecțiile cu diferiți agenți patogeni care pot duce la creșterea severității bolii, la selecție prin creșterea virulenței și la complicarea diagnosticării bolilor și implicit a stabilirii tratamentului (Thomas și colab., 2001; Regev-Yochay și colab., 2004). Căpușele din genul *Ixodes* pot fi infectate simultan cu *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella henselae* și alți agenți patogeni (Goodman și colab., 2005).

În ultimul capitol din prima parte, „**Boli cu caracter zoonotic transmise de căpușe la om și animale, în România**” sunt redate informațiile disponibile pentru România despre bolile transmise de căpușe. Prezența agentului etiologic al bolii Lyme, *B. burgdorferi s.l.*, a fost semnalat pentru prima dată în țara noastră în urmă cu peste 20 de ani (Crăcea și colab., 1988). De atunci, abia în anul 2011 apar primele studii referitoare la prevalența *B. burgdorferi s.l.* în vectorul său, căpușa *Ixodes ricinus* (Coipan și Vladimirescu, 2011). Supravegherea bolii Lyme la om se face începând cu anul 2009, numărul de cazuri crescând exponențial de la un an la altul.



URINIA P. EUROPEANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
FAMILIEI



Fondul Social European
PERIOADA 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDURE



USAIMV Iași

Primele descrieri despre prezența febrei butonoase în România datează din anul 1910, iar primul focar de boală a fost semnalat în anul 1948 în București și Dobrogea (Teodorovici, 1978). Începând cu anul 2000, în România s-a implementat un plan de supraveghere sistematică a febrei butonoase, boala fiind endemică în regiunea de sud-est a țării, cele mai multe cazuri umane fiind înregistrate în București și în Dobrogea. Pentru encefalita de căpușă, supravegherea se realizează doar în județele arondate DSP Cluj, iar numărul de cazuri raportate anual este foarte mic. În ceea ce privește prezența virusului febrei hemoragice de Crimeea-Congo în țara noastră, primele date au fost publicate în anul 2012, în urma unei anchete serologice realizate la ovine din județul Tulcea (Ceianu și colab., 2012).

Partea a doua a tezei, intitulată „**Contribuții personale**” este structurată în cinci capitole, fiecare din ele urmând o structură bine stabilită și se încheie cu prezentarea concluziilor generale.

Deși în Europa s-au realizat multe studii despre prezența și distribuția agenților patogeni transmiși de căpușe, multe chiar și în țările vecine României, în România există puține informații despre agenții patogeni transmiși de căpușe deși principalul vector, căpușa din specia *Ixodes ricinus*, este larg răspândită pe teritoriul țării noastre (Mihalca și colab., 2012). În acest context ne-am propus să efectuăm un studiu cu următoarele obiective generale:

- evaluarea seroprevalenței infecțiilor transmise de căpușe la animalele domestice care servesc drept rezervor pentru agenții patogeni transmiși de căpușe, cu identificarea zonelor de risc pentru sănătatea oamenilor și animalelor;
- colectarea vectorilor – căpușe de pe vegetație și de pe animale din zonele de risc și identificarea agenților patogeni incriminați în producerea infecțiilor cu caracter zoonotic la oameni și animale, prin tehnici de biologie moleculară;
- realizarea profilului metagenomic al microbiomei prezente în căpușe *questing* din specia *Ixodes ricinus* colectate din România, cu ajutorul unei tehnici moderne de secvențiere: secvențiere de ultimă generație (NGS - next generation sequencing).

Capitolul VI, intitulat „**Investigații seroepidemiologice în infecțiile cu caracter zoonotic transmise de căpușe**” este structurat în două subcapitole. Primul subcapitol a avut ca obiectiv realizarea unui *screening* serologic privind prezența anticorpilor anti-virusul encefalitei de căpușă la speciile de animale domestice (bovine, ovine și caprine) care servesc drept gazde și identificarea zonelor endemice pentru virusul encefalitei de căpușă în regiunea de est a României.



URINIA P. EUROPEANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROIECTUL DE BUCURĂRI DE
PREVENIREA ȘI TRATAREA
ZARPOZITIVII



Fondul Social European
PERIODA 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDURE



USAMV Iași

Investigațiile s-au realizat pe un număr de 180 de probe de ser plasmatic, recoltate în perioada 2010-2011 de la trei specii de animale domestice (bovine, ovine și caprine) din șase județe din estul României (Bacău, Botoșani, Galați, Iași, Suceava și Vrancea). Probele au fost analizate cu testul imunoenzimatic EIA TBEV Ig - test imunoenzimatic de competiție pentru detecția tuturor tipurilor de anticorpi pentru virusul encefalitei de căpușă din serul uman și animal, produs de Test-Line Ltd. Clinical Diagnostics, Republica Cehă. Din cele 180 de probe analizate, 3.33% (6/180) au fost pozitive pentru virusul encefalitei de căpușă. Seroprevalența a fost similară în cele șase județe ($p=0.51$). În funcție de specia de animale testată, din cele 180 de probe analizate, seropozitivitatea virusului encefalitei de căpușă a fost de 5.79% (4/69) la caprine, 2.19% (2/91) la bovine și de 0% (20/20) la ovine (Cojocaru și colab., 2011). Investigațiile realizate au pus în evidență existența unor posibile focare în regiunea de est a României, regiune considerată până în prezent indemă de encefalita de căpușă. Rezultatele obținute sunt importante, deoarece consumarea laptelui neprelucrat termic de la vaci, capre și oi poate fi asociat cu riscul de îmbolnăvire cu encefalita de căpușă.

Al doilea subcapitol a avut ca obiectiv realizarea unei anchete seroepidemiologice la câine, principalul rezervor pentru *R. conorii*, utilizându-se teste serologice disponibile la momentul actual pentru supravegherea febrei butonoase la câini și identificarea zonelor de risc pentru populația umană. Investigațiile s-au realizat în perioada 2010-2011 pe un număr de 92 de probe de sânge recoltate de la câini din adăposturi (Tulcea și Brăila) și din gospodăriile populației (Brăila). Pentru detecția anticorpilor IgG anti-*Rickettsia conorii* din serul de câine s-a utilizat kit-ul ELISA *Rickettsia conorii* Canine IgG, produs de Euroclone Spa - Life Sciences Division, Italy.

În urma testării serologice, 43.48% (40/92) din câinii analizați au prezentat anticorpii IgG anti-*Rickettsia conorii*. Cea mai mare seroprevalență a fost înregistrată în județul Buzău, respectiv 47.5% (19/40). Prevalența ridicată (43.48%) pentru anticorpii IgG anti-*Rickettsia conorii* găsită în acest studiu indică faptul că animalele au fost intens expuse infecției cu *Rickettsia conorii* și este mai mare decât seroprevalența găsită în Sardinia (26.1%), (Segura-Porta și colab., 1998) sau Portugalia (38.5%), (Levin și colab., 2012) dar mai mică decât cea raportată în Israel (81%), (Harrus și colab., 2007). Studiul de față reprezintă prima anchetă serologică realizată în România privind prezența anticorpilor anti-*Rickettsia conorii* în populația canină (Cojocaru și Savuța, 2013). Aceste rezultate sugerează că examenele serologice realizate la câini ar putea fi un indicator util și sensibil în identificarea zonelor de risc pentru febra butonoasă.



URINPAF-BROPTANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROIECTUL DE BUCURĂRI DE
PE ÎNCALECĂRI SAU ÎNCE
JAMPĂRII



Fondul Social European
PERIODA 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDRE



USAIMV Iași

Capitolul VII, intitulat „**Identificarea bacteriilor din complexul *Borrelia burgdorferi s.l.* în căpușe colectate de pe vegetație (căpușe *questing* sau căpușe nehrănite) din specia *Ixodes ricinus*”** a avut ca obiectiv estimarea prevalenței *B. burgdorferi s.l.* într-o populație de căpușe *I. ricinus* colectate de pe vegetație dintr-o zonă în care se realizează activități recreaționale în aer liber (picnic, culegerea ciupercilor, vânatoare) și stabilirea riscului potențial în a contracta boala (borrelioza) Lyme. Căpușele analizate au fost colectate din Luncani (46°36'32"N, 26°45'45"E), localitate situată în județul Bacău. Extracția ADN-ului s-a realizat prin metoda lizei alcaline cu hidroxid de amoniu. Identificarea *Borrelia burgdorferi s.l.* s-a realizat prin tehnica PCR iar punerea în evidență a genospeciilor de *Borrelia* implicate, a fost făcută prin tehnica RFLP. Din totalul de 202 căpușe investigate prin tehnica PCR, un procent de 2.5% (5/202) din căpușe au fost pozitive pentru *Borrelia burgdorferi s.l.* Din cele 2.5% probe pozitive, cu ajutorul tehnicii RFLP au fost identificate două specii de borrelii: *Borrelia garinii* (0.99%; 2/202) și *Borrelia afzelii* (1.49%; 3/202).

În capitolului VIII - „**Identificarea agenților patogeni transmiși de căpușe din specia *Ixodes ricinus* colectate de pe vegetație (căpușe *questing* sau căpușe nehrănite) și de pe animale (căpușe hrănite)**” s-a investigat prezența agenților patogeni din genurile *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, *Anaplasma* spp. și *Babesia* spp., în căpușe din specia *Ixodes ricinus* colectate din zona de est a României. În perioada aprilie-septembrie 2011 au fost colectate un total de 530 de căpușe, din care 38.11% (202/530) au fost colectate de pe diferite specii de animale iar 61.89% (328/530) au fost colectate de pe vegetație. ADN-ul a fost extras utilizând *kit*-ul Genomic DNA from Tissue (Macherey-Nagel). Identificarea agenților patogeni s-a realizat prin tehnica PCR iar punerea în evidență a speciilor s-a realizat prin secvențierea prin metoda Sanger a probelor care au prezentat un răspuns pozitiv și compararea secvențelor de interes cu secvențele de nucleotide prezente în GenBank.

Detecția ADN-ului agenților patogeni în căpușe *I. ricinus* colectate de pe animale (căpușe hrănite)

Un total de 202 căpușe hrănite, din specia *Ixodes ricinus* au fost colectate de pe diferite specii de animale din 4 județe din estul României: Galați, Bacău, Iași și Neamț. Dintre acestea, 19.81% (40/202) au fost colectate de pe capre, 65.35% (132/202) au fost colectate de pe căprioare, 10.89% (22/202) au fost colectate de pe câini, 0.99% (2/202) de pe pisici și 2.97% (6/202) de pe vaci. Din cele 202 căpușe identificate inițial taxonomic pe baza cheilor specifice de identificare, în urma testării PCR, 86.63% (175/202) din căpușe au prezent un fragment



UNIONA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE
PROIECTUL NAȚIONAL DE
REHABILITARE SANITARE
JANUARIU



Fondul Social European
2007-2013



Instituțiile Științifice
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDURE



USAMV Iași

amplificabil de 320 bp aparținând lui *Ixodes ricinus*. Din cele 175 de căpușe, 0.6% (1/175) au fost pozitive pentru *Borrelia burgdorferi s.l.*, 17.1% (30/175) au fost pozitive pentru *Rickettsia* spp., 5.14% (9/175) au fost pozitive pentru *Bartonella* spp., 4% (7/175) au fost pozitive pentru *Francisella tularensis*, 24% (42/175) au fost pozitive pentru *Anaplasma* spp. și 0.6% (1/175) pentru *Babesia* spp. Un procent de 50.86% (89/175) din căpușele analizate au fost infectate cu cel puțin un agent patogen.

Detecția ADN-ului *Borrelia* spp. Din cele 175 de probe analizate prin PCR, numai o femelă adultă (0.6%; 1/175) colectată de pe căprioare din județul Bacău, a prezentat un fragment amplificat de 226 bp al spațiului genic 23S-5S al *B. burgdorferi s.l.* În urma analizei în GenBank, fragmentul amplificat a prezentat un maxim de identitate de 99% cu *Serratia proteamaculus*.

Detecția ADN-ului *Rickettsia* spp. Din cele 175 de probe analizate prin PCR, 30 (17.1%; 30/175) au prezentat un fragment amplificat de 380 bp al genei *gltA* aparținând *Rickettsia* spp., generând o rată a prevalenței de 19.04% la femele, 3.33% la masculi și 26.3% la nimfe. Un număr de 18 fragmente PCR au fost secvențiate cu succes, generând 18 secvențe de nucleotide, din care 9 au fost găsite ca fiind înrudite cu *Rickettsia monacensis* cu 99-100% nucleotide similare iar celelalte 9 secvențe cu *Rickettsia helvetica* cu 98-100% nucleotide similare. Cele două specii de rickettsii au fost identificate în trei județe din cele patru luate în studiu și anume în: Galați (11.1%), Bacău (11.5%) și Neamț (33.3%).

Detecția ADN-ului *Bartonella* sp. Din cele 175 de probe analizate prin PCR, nouă căpușe (5.14%) au prezentat un fragment amplificat de 356 bp al genei *gltA* a *Bartonella* sp. Toate probele au fost secvențiate cu succes. Două secvențe au prezentat o similaritate de 98-99% cu *Bartonella* sp. izolată din sângele șoarecilor din specia *Apodemus sylvaticus*, în Staffordshire, Marea Britanie. Altă secvență a fost găsită ca fiind înrudită în proporție de 98% cu *Bartonella* sp. izolată de la lilieci, în Kenya. Restul de șase secvențe au fost similare în proporție de 84-85% cu *Acinetobacter* sp., un microorganism care trăiește în sol și contribuie la procesele de mineralizare.

Detecția ADN-ului *Francisella tularensis*. Din cele 175 de probe analizate prin PCR, șapte probe au fost pozitive, generând o prevalență totală de 4%. Toate căpușele care au prezentat un răspuns pozitiv au fost femele. Probele au fost secvențiate cu succes. În urma analizei în GenBank, toate cele șapte probe au fost găsite ca fiind înrudite cu *Francisella tularensis*.



URINIA P. EUROPEANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE
PROIECTUL NAȚIONAL DE
PREVENIRE ȘI TRATARE
A PARAZITELOR



Fondul Social European
2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDURE



USAIMV Iași

Detecția ADN-ului *Anaplasma spp.* Din cele 175 de căpușe analizate prin PCR, 42 de căpușe au fost pozitive și toate au fost femele. Din cei 42 de ampliconi, 41 au fost secvențiați cu succes, iar comparația secvențelor în GenBank a evidențiat o secvență înrudită cu *Ehrlichia muris* cu o similaritate de 99% a nucleotidelor și alte două secvențe înrudite cu *Anaplasma phagocytophilum* cu 99-100% nucleotide similare. Restul de 38 de secvențe au fost găsite ca fiind înrudite cu un simbiot, aparținând familiei *Anaplasmataceae*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* cu 99-100% nucleotide similare.

Detecția ADN-ului *Babesia/Theileria spp.* Din cele 175 de probe analizate prin PCR, numai o nimfă (0.6%) colectată de pe căprioare a prezentat un fragment amplificat de 359 bp a genei 18S rARN a *Babesia/Theileria spp.* Proba a fost secvențiată cu succes și a fost găsită ca fiind înrudită cu *Babesia sp.* EU1.

Detecția ADN-ului agenților patogeni în căpușe *I. ricinus* colectate de pe vegetație (căpușe *questing* sau căpușe nehrănite)

Un total de 328 de căpușe nehrănite (58 femele, 160 masculi și 114 nimfe) au fost colectate de pe vegetație prin metoda drapelului din cinci județe din estul României: Bacău, Iași, Galați, Neamț și Suceava. Femelele au fost analizate individual iar masculii și nimfele au fost analizate în *pool*-uri de 5 și respectiv 10 căpușe. În total au fost analizate 99 de probe, din care 58 de femele, 29 de *pool*-uri cu masculi și 12 *pool*-uri cu nimfe. Toate cele 99 de probe au fost pozitive pentru *I. ricinus*.

Detecția ADN-ului *Rickettsia spp.* *Rickettsia spp.* a fost identificată în 10.1% (10/99) din probele analizate. Numai căpușele adulte au fost găsite ca fiind infectate. O proporție de 10.34% (6/58) din femele și 13.79% (4/29) din *pool*-urile cu masculi au fost pozitivi. Probele au fost secvențiate cu succes, generând 10 secvențe de nucleotide, din care cinci secvențe au fost înrudite cu *Rickettsia monacensis*, cu 99-100% nucleotide similare și cinci secvențe au fost înrudite cu *Rickettsia helvetica*, cu 99-100% nucleotide similare.

Detecția ADN-ului *Francisella spp.* ADN-ul *Francisella spp.* a fost amplificat de la trei (3.03%) femele colectate din județul Bacău. Toate probele au fost secvențiate cu succes și au fost identificate ca fiind înrudite cu *Francisella tularensis*.

Detecția ADN-ului *Anaplasma spp.* Din 99 de probe analizate, șase probe (6.06%) au fost pozitive. Cei șase ampliconi au fost secvențiați cu succes iar secvențele au fost identificate ca fiind înrudite cu *Candidatus Midichloria mitochondrii*.



URINPAF-BROPTANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROIECTUL DE SOCIALIZARE ȘI
PREVENIREA BOLII SIDA
SARS-COV-2



Fondul Social European
2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDURE



USAIMV Iași

Cercetările noastre extind aria de distribuție geografică a agenților patogeni transmiși de căpușe în România și sprijină afirmația că acestea sunt vectori importanți pentru microorganismele patogene din pădurile suburbane. Am arătat că în aria de studiu (podiușul Moldovei), căpușele din specia *I. ricinus* colectate de pe vegetație și de pe animale sunt infectate cu *Anaplasma phagocytophylum*, *Ehrlichia muris*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis*, *Francisella tularensis*, *Bartonella* spp. și *Babesia* sp. EU1 (Păduraru și colab., 2012).

În urma cercetărilor întreprinse, au fost înregistrate în GenBank un număr de opt secvențe de nucleotide: trei secvențe pentru *Rickettsia helvetica* (gena *gltA*), (nr. de acces în GenBank: **JX040636**, **JX040637**, **JX040638**), trei secvențe pentru *Rickettsia monacensis* (gena *gltA*), (nr. de acces în GenBank: **JX003686**, **JX040639**, **JX040640**), o secvență pentru *Ehrlichia muris* (gena 16S rARN), (nr. de acces în GenBank: **JX040641**) și o secvență pentru *Babesia* sp. EU1 (gena 18S rARN), (nr. de acces în GenBank: **JX040642**).

Capitolul IX „Cercetări privind microbioma prezentă în căpușe *questing* din specia *Ixodes ricinus* colectate din România, cu ajutorul secvențierii de ultimă generație (NGS)” este alcătuit din patru subcapitole. Au fost analizate un total de 544 de căpușe *questing* colectate din patru județe din partea de est a României (Bacău, Galați, Suceava și Iași). Locurile de colectare au avut altitudini cuprinse între 26 și 388 m. Cele 544 de căpușe au fost împărțite în 36 de *pool*-uri (18 *pool*-uri cu femele și 18 *pool*-uri cu nimfe) în funcție de locul recoltării și de stadiul de dezvoltare.

În primul subcapitol, „Identificarea virusului encefalitei de căpușă în căpușe *questing* din specia *Ixodes ricinus*” s-a urmărit detecția virusului encefalitei de căpușă prin amplificarea unui fragment de 68 bp al regiunii 3 non-codante prin real-time RT-PCR, după protocolul elaborat de Schwaiger și Cassinotti (2003). Din cele 544 de căpușe *I. ricinus* (441 femele și 103 nimfe) analizate prin real time RT-PCR pentru detecția virusului encefalitei de căpușă, nu s-a obținut nici un răspuns pozitiv. În Europa, prevalența infecției cu TBE în căpușe variază între 0.1% și 5% (Oehme și colab., 2002; Randolph, 2001) însă aceste valori sunt supuse fluctuațiilor anuale. Bormane și colab. (2004), în urma unui studiu realizat în anul 1995, au identificat în căpușele adulte colectate de pe vegetație o prevalență a virusului encefalitei de căpușă de 26.6% iar în anul 2002, în aceeași regiune, prevalența virusului encefalitei de căpușă a fost de doar 5%.

Al doilea subcapitol, „Identificarea agenților bacterieni și parazitari transmiși de căpușe *questing* din specia *Ixodes ricinus*” a urmărit identificarea agenților patogeni *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, *Anaplasma* spp. și *Babesia* spp. în



URINPAF-BROFFANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROIECTUL NAȚIONAL DE
RECONSTRUCȚIE A SĂNĂȚII
PUBLICE



Fondul Social European
PERIODA 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDURE



USAMV Iași

cele 544 de căpușe luate spre analiză. În urma analizei PCR, nici o probă nu a prezentat un răspuns pozitiv pentru agenții patogeni din genurile *Borrelia* spp., *Bartonella* spp., *Francisella tularensis* și *Babesia* spp.

Detecția ADN-ului *Anaplasma* spp. În 58.33% (21/36) din *pool*-urile de căpușe analizate s-a identificat un produs de amplificare. În funcție de stadiul de dezvoltare al căpușelor, prevalența a fost de 16.7% (6/18) pentru nimfe și de 41.7% (15/18) pentru femele. Probele au fost secvențiate cu succes, generând 21 de secvențe de nucleotide. Din cele 21 de secvențe, 16 au fost găsite ca fiind înrudite cu *Candidatus Midichloria mitochondri* (similitudine de 99-100%), un simbiont al căpușelor, patru secvențe au fost găsite ca fiind înrudite cu *Wolbachia* sp. (similitudine 99-100%) iar ultima secvență cu „*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”.

Detecția ADN-ului *Rickettsia* spp. Din 36 de *pool*-uri de căpușe analizate prin PCR, 19 au prezentat un fragment de 380 bp ale genei *gltA* aparținând SFG *Rickettsia* spp. Din cele 19 *pool*-uri care au prezentat un răspuns pozitiv, șase *pool*-uri au fost cu nimfe, generând o prevalență de 16.7% iar 13 au fost *pool*-uri cu femele, prevalența fiind de 36.1%. Toate probele au fost secvențiate cu succes, 16 secvențe fiind înrudite cu *Rickettsia helvetica*, cu 99-100% nucleotide similare iar trei secvențe înrudite cu *Rickettsia monacensis*, cu 99-100% nucleotide similare.

Ultimul subcapitol, intitulat „**Profilul metagenomic al microbiomei prezente în căpușe *questing* din specia *Ixodes ricinus*”** este divizat în două părți. În prima parte, cele 36 de *pool*-uri realizate inițial au fost reorganizate în 20 de *pool*-uri (10 *pool*-uri cu nimfe și 10 *pool*-uri cu femele), care au fost inoculate la 20 de șoareci imunodeprimați. După trei zile de la inoculare, de la șoareci s-a recoltat sânge pe EDTA, recuperându-se atât plasma cât și leucocitele. După extracția acizilor nucleici din plasmă și din leucocite, aceștia au fost amestecați, obținându-se un sigur *pool* de acizi nucleici extrași din plasmă și un singur *pool* de acizi nucleici extrași din leucocite. În cea de-a doua etapă, toate cele 36 de *pool*-uri de căpușe au fost amestecate într-un *pool* unic. Probele au fost analizate cu ajutorul secvențierii de ultimă generație (NGS).

Analiza rezultatelor obținute în urma secvențierii de ultimă generație a plasmelor și a leucocitelor recoltate de la șoareci

În urma secvențierii de ultimă generație s-au obținut 274.452.408 de citiri pentru plasmă și 281.285.878 de citiri pentru leucocite. După analiza bioinformatică a citirilor, care presupune



ERDF-PAF-BRODIPANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROIECTUL DE ÎNCĂLZIRE ȘI
REHABILITARE SAȘIETICE
JALP/01/01/11



Fondul Social European
PERIODA 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE

OPFONDRE



USAIMV Iași

îndepărtarea citirilor în duplicat, a secvențelor care fac parte din genomul gazdei, a adaptatorilor necesari în procesul de secvențiere precum și a altor etape de filtrare, din citirile inițiale au mai rămas 40.215.193 de citiri pentru plasmă și 38.081 citiri pentru leucocite. Citirile au fost asamblate în *contig*-uri rezultând 1.450.530 de *contig*-uri pentru plasmă și 38.081 de *contig*-uri pentru leucocite. După compararea *contig*-urilor cu secvențele de nucleotide existente în GenBank, 32.001 de *contig*-uri obținute din plasmă și 2.019 de *contig*-uri obținute din leucocite au putut fi identificate.

Identificarea bacteriilor. În plasma și leucocitele recoltate de la șoarecii inoculați cu trituratul de căpușe au fost identificate 30 de genuri de bacterii. Cele mai multe genuri de bacterii au fost din Încrengătura *Proteobacteria*, urmată de *Actinobacteria*, *Firmicutes* și altele. S-au detectat microorganisme din sol și apă: *Bacillus* spp., *Frankia* spp., *Clostridium* spp., *Streptomyces* spp.etc. precum și bacterii cunoscute ca fiind patogene pentru animale: *Bordetella* spp., *Burkholderia* spp., *Mycobacterium* spp., *Rhodococcus* spp.

Printre bacteriile patogene pentru care căpușele sunt cunoscute ca fiind vectori biologici au fost identificate bacterii din genurile: *Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Orientia*, *Rickettsia*, *Francisella* și *Bartonella*. Cu câteva excepții, marea majoritate a bacteriilor au fost identificate doar în eșantionul de plasmă.

Identificarea paraziților. Secvențe de nucleotide aparținând paraziților transmiși de căpușe au fost identificate numai în plasmă. În total s-au găsit cinci *contig*-uri aparținând genului *Babesia* și 12 *contig*-uri aparținând genului *Theileria*.

În a doua parte din ultimul subcapitol, cele 36 de *pool*-uri de căpușe au fost reorganizate într-un singur *pool*, care a fost în continuare analizat cu ajutorul secvențierii de ultimă generație (NGS).

Analiza rezultatelor obținute în urma secvențierii de ultimă generație a *pool*-ului de căpușe

În urma secvențierii de ultimă generație a *pool*-ului de căpușe s-au obținut 135.538.902 de citiri brute. După analiza bioinformatică a citirilor au mai rămas 7.149.453 de citiri. Acestea au fost asamblate în *contig*-uri rezultând 97.960 dar au rămas și 2.022.130 de citiri neasamblate. După compararea celor 97.960 de *contig*-uri cu secvențele de nucleotide existente în GenBank, 272 de *contig*-uri au fost asociate cu virusuri, 5.733 de *contig*-uri cu bacterii iar 4.908 cu paraziți.



URINIA P. BROTTANA



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE,
PROIECTUL NAȚIONAL DE
RECONSTRUCȚIE SANITARE
JANUARIU



Fondul Social European
2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NATIONALE
OFIPIEDURE



USAMV Iași

Identificarea bacteriilor. După analiza în GenBank a celor 5.733 de *contig*-uri au fost identificate 37 de genuri de bacterii. Ca și în cazul bacteriilor identificate în plasmă și leucocite, cele mai multe fac parte din încregătura *Proteobacteria*, urmată de încregăturile *Actinobacteria*, *Firmicutes* și altele. Dintre bacteriile patogene transmise de căpușe, s-au găsit secvențe de regiuni codante aparținând genurilor *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Orientia*, *Rickettsia*, *Francisella*, *Borrelia*, *Bartonella* și *Coxiella*. Alte microorganisme detectate în *pool*-ul de căpușe au fost bacterii din sol și apă: *Magnetospirillum*, *Sorangium*, *Bacillus*, *Frankia*, *Clostridium* și *Streptomyces*. În plus, s-au identificat și bacterii patogene pentru animale: *Bartonella*, *Brucella*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Mycobacterium* și *Rhodococcus*.

Identificarea virusurilor. Compararea secvențelor de nucleotide în GenBank a relevat 137 de *contig*-uri aparținând familiilor *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* și *Rhabdoviridae*. Cele mai multe *contig*-uri, în număr de 102, aparțin familiei *Bunyaviridae* iar dintre acestea, 61 de *contig*-uri aparțin genului *Nairovirus*, trei *contig*-uri genului *Orthobunyavirus* iar alte 38 de *contig*-uri aparțin genului *Phlebovirus*.

Identificarea paraziților. După compararea în GenBank a *contig*-urilor obținute prin secvențierea de ultimă generație și asamblarea citirilor, 430 de *contig*-uri au fost găsite ca fiind similare în procente de omologie diferite cu șase genuri de paraziți: *Babesia*, *Theileria*, *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Neospora* și *Toxoplasma*.