

REZUMAT

La nivel mondial, căpușele sunt depășite doar de țânțari în ceea ce privește numărul de patogeni pe care îi pot transmite animalelor și oamenilor, adăpostind o mare varietate de agenți simbioți, comensali și patogeni.

Ixodes ricinus este cea mai răspândită specie din Europa, fiind vectorul mai multor boli de importanță medicală și veterinară, precum boala Lyme, encefalita transmisă de căpușe, febra hemoragică Crimeea-Congo și rickettsioza la om sau anaplasmoza și babesioza la animale. De asemenea, *I. ricinus* este specia dominantă și în România (86,9%), urmată de *Dermacentor marginatus* (9,5%), *Haemaphysalis punctata* (2,6%) și *Dermacentor reticulatus* (0,02%).

Datorită modernizării tehnologiilor de secvențiere de ultimă generație, cercetările privind varietatea bacteriană și virală a căpușelor au crescut considerabil în ultimii ani, dezvăluind o diversitate microbiană neașteptată. Astfel, pe lângă agenții patogeni deja cunoscuți ca fiind vectorizați de căpușe, au fost descrise noi virusuri, aparținând familiilor *Nairoviridae*, *Flaviviridae*, *Phenuiviridae* și *Orthomyxoviridae*. Factorii de mediu, peisagistici și antropogeni, influențează distribuția și abundența căpușelor, având un impact major și asupra dinamicii de transmitere a agenților patogeni. Schimbarile climatice au fost citate ca fiind cauza principală a expansiunii căpușelor și a creșterii numărului de infecții transmise iar numeroase studii au demonstrat importanța temperaturilor asupra densității căpușelor din mediu. La această expansiune, contribuie deopotrivă importul de animale din alte zone, dar și păsările migratoare.

România este una dintre cele mai diverse țări din punct de vedere biogeografic din Europa, fapt care influențează dinamica de răspândire a populațiilor de căpușe, mai ales în partea de sud a țării, ce cuprinde Delta Dunării. Delta Dunării reprezintă principala escală a păsărilor în rutele migratorii spre Africa și înapoi spre Europa, ceea ce conduce la un risc ridicat de introducere de noi agenți patogeni în zonă. În acest areal există aproximativ 30 de tipuri de ecosisteme, care cuprind 2994 specii diferite de floră și 4286 de specii de faună (amfibieni, pești, și reptile), precum și mamifere domestice și sălbatice. Într-un astfel de mediu, căpușele reprezintă „puntea” care duce la transmiterea interspecifică a agenților patogeni, inclusiv omului.

Scopul lucrării „**Cercetări privind portajul și riscul zoonotic al unor agenți infecțioși transmiși de către căpușe**” a fost acela de a obține informații privind noi agenți patogeni transmiși de către diferite specii de căpușe din Sud-Estul României și de a evalua potențialul lor zoonotic pentru sănătatea animală și umană.

Pentru a îndeplini scopul propus, au fost stabilite următoarele **obiective generale**:

- Evaluarea seroprevalenței principalelor infecții bacteriene transmise de către căpușe la animale în Sud-Estul României
- Evaluarea circulației virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo prin tehnici serologice și de biologie moleculară la căpușe și rumegătoare mici
- Identificarea de noi arbovirusuri transmise de căpușe prin tehnici de secvențiere de ultimă generație (NGS) și detectarea anticorpilor împotriva proteinelor virale la animalele expuse, prin tehnici serologice de ultimă generație (LIPS).

Originalitatea acestei teze constă în:

- Utilizarea secvențierii de ultimă generație (NGS), pentru a descrie viromul căpușelor colectate din Sud-Estul României
- Detectarea de noi agenți patogeni virali în căpușe, identificați pentru prima dată în România, inclusiv virusuri noi relevante pentru sănătatea publică
- Evaluarea seropozitivității la animalele expuse folosind tehnica de imunoprecipitare a luciferazei (LIPS)

Prezenta lucrare de doctorat este organizată în conformitate cu normele în vigoare, în două părți principale: **prima parte** descrie „Stadiul actual al cunoașterii”, ce condensează informații actualizate din literatura de specialitate privind principalele specii de căpușe din România și agenții patogeni vectorizați de acestea. De asemenea, sunt descrise metodele de secvențiere utilizate în studii de metagenomică. **A doua parte** prezintă contribuțiile personale, în care sunt descrise metodele de lucru și rezultatele obținute ca urmare a cercetărilor realizate pe parcursul perioadei de studii doctorale, rezumate în 5 capitole.

Pe lângă aceste două părți principale, lucrarea actuală mai conține mulțumiri, lista abrevierilor, introducere, rezumat, cuprins, lista figurilor, bibliografie și anexe. **Teza conține 29 figuri și 14 tabele, având și 205 surse bibliografice consultate.**

Prima parte se concentrează pe cunoștințele actuale din literatura de specialitate și cuprinde 4 capitole și subcapitolele aferente. **Primul capitol** prezintă principalele specii de căpușe și distribuția lor geografică în România. **Al doilea capitol** descrie cele mai importante boli bacteriene transmise de căpușe precum boala Lyme, anaplasmoza canină și ehrlichioza, prezentând etiologia, epidemiologia, semnele clinice și stadiul actual al cunoașterii în România. Cel de-**al treilea capitol** prezintă agenți patogeni virali ca febra hemoragică Crimeea-Congo, encefalita transmisă de căpușe, dar și flavivirusuri recent identificate, vectorizate de căpușe, urmând aceeași structură ca și în capitolul II. Cel de-**al patrulea capitol** descrie platformele de secvențiere (NGS) existente.

Cea de-a doua parte a tezei, **Contribuții personale**, este structurată în 5 capitole (capitolele V-IX). **Capitolele V și VI** descriu cadrul organizatoric și instituțional în care au fost efectuate cercetările, precum și scopul și obiectivele acesteia. Următoarele 3 capitole prezintă studiile realizate, incluzând descrierea materialului și metodelor utilizate, rezultatele și discuțiile ulterioare, pentru fiecare studiu în parte. Capitolul IX (*Concluzii finale*), concentrează concluziile generale ale lucrării, desprinse în urma supravegheților serologice și analizei meta-transcriptomice efectuate.

Capitolul VII, intitulat "*Cercetări seroepidemiologice și moleculare privind principalii agenți patogeni transmiși de căpușe la animale*", este împărțit în două secțiuni: **prima secțiune** prezintă două studii serologice privind boala Lyme, ehrlichioza și anaplasmoza la câinii domestici și de vânătoare. Scopul studiului "*Investigații serologice privind borrelioza Lyme, anaplasmoza și ehrlichioza la câinii din două județe din sud-estul României*" a fost de a determina seroprevalența anticorpilor IgG împotriva *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* și *E. canis* la câinii domestici din Sud-Estul țării. *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* și *E. canis* se numără printre principalele bacterii care afectează populația canină, fiind un subiect de interes în ultimii ani. Ținând cont de similitudinile dintre factorii de risc ai bolii Lyme la câini și oameni, sistemul de supraveghere serologică a câinilor poate fi o metodă eficientă de stabilire a riscului și a răspândirii bolii. În

studiul de față au fost testați 92 de câini pentru detecția anticorpilor anti-*Borrelia* VIsE, *A. phagocytophilum* și respectiv, *E. canis*. În urma testului ELISA, 14 din cei 92 de câini testați au fost detectați ca fiind seropozitivi, dintre care 6 au prezentat anticorpi anti-*Borrelia* spp. (6,52%), 5 anti-*A. phagocytophilum* (5,43%) și 3 anti-*E. canis* (3,26%). La 4 câini a fost observată co-infecția cu doi agenți patogeni diferiți.

Cel de-al doilea studiu serologic intitulat "*Cercetări seroepidemiologice asupra anaplasmozei la câinii domestici și de vânătoare*" a avut ca scop evaluarea seroprevalenței anticorpilor IgG anti-*A. phagocytophilum* la câini selectați din trei județe: Iași, Sibiu și Tulcea, în perioada 2015-2019. *A. phagocytophilum* este un agent patogen emergent, cu o seroprevalență care variază de la o regiune la alta. Populația analizată a fost alcătuită din 92 de câini domestici și de vânătoare.

Acest studiu a prezentat o prevalență globală de 14,13% (13 din 92 de câini testați au fost identificați ca fiind seropozitivi). Cea mai mare seroprevalență a fost înregistrată la câinii de vânătoare din județul Sibiu (58,8%), care deseori nu primesc niciun tratament antiparazitar împotriva căpușelor.

A doua secțiune prezintă două cercetări bazate pe tehnici serologice și moleculare asupra virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo (FHCC). Primul studiu s-a bazat pe detectarea FHCC în căpușele *Dermacentor* și *Rhipicephalus* sp., colectate din județul Tulcea, regiune unde studii anterioare au indicat prezența anticorpilor IgG împotriva FHCC la rumegătoarele mici. Principalul vector al CCHFV este *Hyalomma marginatum*, dar virusul a fost detectat în peste 30 de specii de căpușe, inclusiv *Dermacentor* și *Rhipicephalus* sp. Aproximativ 127 de căpușe au fost colectate în anul 2019, din cinci locații din județul Tulcea. Căpușele au fost testate prin Real-Time RT-PCR pentru detectarea ARN-ului viral pentru cele șase genotipuri ale virusului FHCC. În niciunul dintre cele 5 situri de colectare nu s-a înregistrat rezultate pozitive. Chiar dacă speciile de căpușe analizate în acest studiu pot transmite FHCC, faptul că vectorul principal (*H. marginatum*) nu a fost testat, poate explica rezultatele negative.

FHCC circulă în natură prin intermediul unui ciclu căpușă - gazda vertebrată - căpușă, astfel că pentru a avea o imagine de ansamblu asupra circulației FHCC în România a fost determinată seroprevalența la gazdele vertebrate, fiind colectate seruri de la 250 de ovine și caprine din aceeași regiune, ca și în studiul anterior.

Detectarea anticorpilor anti-FHCC a fost realizată prin tehnica ELISA, utilizând kitul ID Screen CCHF Double Antigen Multispecies (IDvet, Grabels, Franța). Seroprevalența globală la animalele testate a fost de 37,7%. Seroprevalența obținută la ovine a fost de 29.8% și de 57.7% la caprine. Căpușele și probele de ser au fost, de asemenea, analizate prin RT-qPCR vizând detectarea virusului FHCC, toate probele fiind însă negative. În România nu au fost înregistrate cazuri FHCC la om, până în momentul actual. O primă ipoteză pentru seropozitivitatea obținută în rândul rumegătoarelor ar fi faptul că în regiune circulă o tulpină FHCC nepatogenă pentru om, din moment ce animalele sunt în mod obișnuit asimptomatice. De asemenea, trebuie luată în considerare existența unui alt virus apropiat de FHCC, care poate genera reacții serologice de încrucișare.

Capitolul VIII, "*Caracterizarea viromului căpușelor prin tehnica secvențierii de ultimă generație*", este partea cea mai detaliată și originală a tezei. Acest capitol prezintă potențialul

secvențierii de ultimă generație pentru studiile metagenomice care au ca scop descrierea microbiomului unor organisme diverse.

În prima parte a subcapitolului intitulat "*Noi virusuri relevante pentru sănătatea publică identificate în căpușele din România*" sunt descrise rezultatele în urma secvențierii utilizând platforma Illumina NextSeq500, a peste 500 de căpușe adulte aparținând unor specii diferite, colectate din Estul României. În țara noastră, majoritatea studiilor s-au axat pe identificarea agenților bacterieni transmiși de căpușe, cu o mică preocupare pentru agenții virali.

Scopul acestei cercetări a fost acela de a descrie viromul căpușelor *Rhipicephalus*, *Dermacentor* și *Haemaphysalis* sp., colectate din zone relativ neexplorate din România, pentru a spori cunoștințele privind diversitatea virusurilor în Europa de Est, incluzând virusuri noi, care pot avea relevanță pentru sănătatea umană și animală. Studiul de față cuprinde o descriere generală a compoziției virusurilor ARN și ADN, ce diferă în funcție de specia de căpușe, urmată de o analiză detaliată a celor mai importante familii virale detectate.

Virusurile ARN au fost reprezentate de 29 de familii virale, unele familii virale fiind limitate la o singură specie de căpușă (*Mononegavirales*), în timp ce altele au fost identificate în toate cele 3 specii analizate (spre exemplu, *Riboviria*, *Picornavirales*, ssRNA+ și *Flaviviridae*), sau detectate doar în căpușele nehrănite (*Luteoviridae*, *Tombusviridae* și *Marnaviridae*).

Printre comunitățile virale identificate, au fost detectate virusuri ce aparțin familiilor *Flaviviridae*, *Phenuiviridae* și *Nairoviridae*. Spre exemplu, Jingmen tick virus (JMTV) aparține familiei *Flaviviridae*, fiind identificat în căpușele colectate de pe ovine și caprine din județul Tulcea, indicând faptul că rumegătoarele joacă un rol major în ciclul acestui virus.

Un alt virus identificat a fost Tacheng tick virus 2 (TaTV2) (familia *Phenuiviridae*), plasat din punct de vedere filogenetic într-un grup cu alte izolate provenite de la căpușe și de la oameni din China, astfel că TaTV2 prezintă o importanță deosebită pentru sănătatea umană și animală. Patogenitatea acestui virus pentru oameni și animale a fost confirmată ulterior, TaTV2 fiind detectat la pacienții mușcați de căpușe și la mai multe specii de vertebrate, precum și în căpușele *H. asiaticum*. Mai mult decât atât, au fost identificate și alte virusuri a căror patogenitate nu se cunoaște încă (Bole tick tick virus 4, Nayun tick nairovirus), fiind necesare studii suplimentare pentru a determina infectivitatea lor pentru vertebrate.

Scopul celui de-al doilea subcapitol intitulat "*Identificarea unui nou Quaranjavirus și a altor familii virale în căpușele Ixodidae din Delta Dunării*", a fost acela de a identifica virusuri asociate căpușelor *Rhipicephalus sanguineus* colectate de pe rumegătoare mici din județul Tulcea, prin tehnica secvențierii de ultimă generație. *Quaranjavirusurile* sunt transmise în majoritatea lor de căpușele argaside, dar studii recente au identificat noi secvențe aparținând acestui gen viral și în căpușele dure-ixodide, cunoscându-se puține date despre patogenitatea acestora.

În prezenta cercetare au fost detectate trei familii virale: *Phenuiviridae* (41%), *Chuviridae* (36%) și *Orthomyxoviridae* (22%). În familia *Orthomyxoviridae*, au fost detectate secvențe virale ce aparțin unui nou quaranjavirus, denumit Cataloi tick quaranjavirus (CTQV). Acest virus a fost situat din punct de vedere filogenetic, într-un grup aparent limitat la căpușele ixodide, diferit de quaranjavirusurile transmise de căpușele argaside. Capacitatea de replicare a quaranjavirusurilor asociate căpușelor ixodide, rămâne de elucidat.

Scopul celui de-al treilea subcapitol a fost de a determina dacă CTQV ar putea constitui un nou arbovirus transmis de căpușe. În acest sens, serurile provenite de la rumegătoare mici

expuse la mușcături de căpușe din regiunea Deltei Dunării au fost analizate cu ajutorul testului LIPS pentru a evalua prezența anticorpilor împotriva CTQV. S-a observat o creștere semnificativă a raportului semnal/zgomot pentru serurile de ovine colectate în Slava Cercheză sau Somova în 2019 și pentru serurile de caprine colectate fie în Cataloi în 2019, fie în Slava Rusă în 2020. Pentru a determina dacă aceste seruri pot fi considerate pozitive, am definit o valoare de prag de pozitivitate ca fiind media raportului semnal-zgomot al serurilor franceze neexpuse + 3 deviații standard. Doar 8 seruri de ovine colectate în Slava Cercheză în 2019 au depășit acest prag. Pentru a confirma dacă aceste probe sunt pozitive, sunt necesare teste serologice mai specifice, cum ar fi seroneutralizarea, dar acestea necesită izolarea virusului.

Ultimul capitol (**capitolul IX**), sintetizează toate concluziile cercetării și creează o viziune generală asupra tezei. Cercetarile efectuate au confirmat persistența unor agenți patogeni bacterieni și virali cunoscuți în zona studiată. Pe lângă aceștia, au fost identificați noi agenți patogeni descriși pentru prima dată în România, cu risc pentru sănătatea publică.