



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI

FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ

Daniel
Bucur

Digitally signed
by Daniel Bucur
Date: 2016.10.18
09:07:12 +03'00'

DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA BOLI INFECȚIOASE

Doctorand,
Cristian RĂILEANU

TEZĂ DE DOCTORAT

Coordonator științific,
Prof. univ. dr. Gheorghe SAVUȚA

IAȘI
2016





**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND
VETERINARY MEDICINE
“ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DOMAIN VETERINARY MEDICINE
SPECIALIZATION INFECTIOUS DISEASES**

**PhD student,
Cristian RĂILEANU**

DOCTORAL THESIS

**Scientific coordinator,
Prof. Gheorghe SAVUȚA, PhD**

**IAȘI
2016**



Investește în oameni!

Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013

Axa prioritară: **1. „Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”**

Domeniul major de intervenție: **1.5 „Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării”**

Titlul proiectului: **„Programe doctorale și postdoctorale pentru promovarea excelenței în cercetare, dezvoltare și inovare în domeniile prioritare – agronomic și medical veterinar, ale societății bazate pe cunoaștere”**

Beneficiar: **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA**

ID Proiect: **132765**

Cod contract: **POSDRU/159/1.5/S/132765**

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE ȘI ETIOLOGICE ASUPRA UNOR BOLI INFECȚIOASE EMERGENTE CU TRANSMITERE VECTORIALĂ ÎN ZONA DE EST A ROMÂNIEI

Coordonator științific,
Prof. univ. dr. Gheorghe SAVUȚA

Doctorand,
Cristian RĂILEANU

IAȘI
2016





Invest in people!

Project co-financed by European Social Fund, through Sectorial Operational Program Human Resources Development 2007 - 2013

Priority axis: **1. „Vocational education and training in support of economic growth and development of knowledge based society”**

Major field of intervention: **1.5 „Doctoral programs and postdoctoral research support”**

Project title: **„Doctorale and postdoctorale programs to promote excellence in research, development and innovation in the priority areas - agronomic and veterinary medical, of the knowledge-based society”.**

Beneficiary: **UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES and VETERINARY MEDICINE CLUJ-NAPOCA**

ID Project: **132765**

Contract code: **POSDRU/159/1.5/S/132765**

DOCTORAL THESIS

EPIDEMIOLOGICAL AND ETIOLOGICAL RESEARCH REGARDING EMERGING VECTOR-BORNE INFECTIONS IN EASTERN ROMANIA

Scientific coordinator,
Prof. Gheorghe SAVUȚA, PhD

PhD student,
Cristian RĂILEANU

**IAȘI
2016**



CUPRINS

ABREVIERI	13
LISTA TABELELOR.....	15
LISTA FIGURILOR.....	17
INTRODUCERE.....	21
REZUMAT	27

PARTEA I STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I CĂPUȘELE IXODIDAE CU ROL ÎN TRANSMITEREA AGENȚILOR PATOGENI LA ANIMALE ȘI LA OM ÎN ROMÂNIA	51
1.1 Caracteristicile epidemio-climatice ale României.....	52
1.2 Speciile de căpușe Ixodidae cu rol de vector în România.....	53
1.2.1 <i>Ixodes ricinus</i>	54
1.2.2 <i>Haemaphysalis punctata</i>	56
1.2.3 <i>Dermacentor reticulatus</i>	57
1.3 Influența factorilor biotici și abiotici în distribuția și densitatea căpușelor	60
CAPITOLUL II AGENȚI PATOGENI BACTERIENI TRANSMIȘI DE CĂPUȘE.....	62
2.1. <i>Borrelia</i> spp.....	62
2.1.1 Specii patogene transmise de căpușe	62
2.1.2 Transmitere și rezervor natural	64
2.1.3 Stadiul cunoașterii în România	65
2.2 <i>Rickettsia</i> spp.....	65
2.2.1 Specii patogene transmise de căpușe	68
2.2.2 Transmitere și rezervor natural	68

2.2.3 Stadiul cunoașterii în România.....	69
2.3 <i>Bartonella</i> spp.....	72
2.3.1 Specii patogene transmise de căpușe.....	74
2.3.2 Transmitere și rezervor natural	74
2.3.3 Stadiul cunoașterii în România.....	74
2.4 <i>Anaplasma</i> spp.....	75
2.4.1 Specii patogene transmise de căpușe.....	75
2.4.2 Transmitere și rezervor natural	77
2.4.3 Stadiul cunoașterii în România.....	77
2.5 <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	78
2.5.1 Transmitere și rezervor natural	79
2.5.2 Stadiul cunoașterii în România.....	79
2.6 Coinfecții cu agenți patogeni bacterieni în căpușe	79
CAPITOLUL III AGENȚI PATOGENI VIRALI TRANSMIȘI DE CĂPUȘE.....	81
3.1 Virusul encefalitei de căpușă	81
3.1.1 Transmitere și rezervor natural	82
3.1.2 Stadiul cunoașterii în România.....	83
3.2 Virusul febrei hemoragice Crimeea-Congo	85
3.2.1 Transmitere și rezervor natural	85
3.2.2 Stadiul cunoașterii în România.....	86
3.3 Alte arbovirusuri transmise de căpușe	87
CAPITOLUL IV SECVENȚIEREA DE ULTIMĂ GENERAȚIE (NGS) – APLICAȚIE PENTRU EXPLORAREA MICROBIOMEI DIN CĂPUȘE	90
4.1 Tehnologiile de secvențiere actuale.....	90
4.1.1 Tehnologia <i>Illumina</i>	90
4.1.2 Tehnologia <i>Ion Torrent</i>	92
4.1.3 Tehnologia <i>Pacific biosciences</i>	93
4.2 Aplicațiile secvențierii de ultimă generație.....	94

PARTEA A II-A CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL V SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR 96

CAPITOLUL VI INVESTIGAȚII SEROLOGICE ȘI ETIOLOGICE ASUPRA PRINCIPALELOR INFECȚII TRANSMISE DE CĂPUȘE LA ANIMALE 98

6.1 Anchetă seroepidemiologică privind febra hemoragică Crimeea-Congo la rumegătoare mici din sud-estul României 98

6.1.1 Materiale și metode 100

6.1.2 Rezultate și discuții..... 103

6.2 Detecția virusului FHCC în căpușe colectate de pe gazdele testate serologic 105

6.2.1 Materiale și metode 106

6.2.2 Rezultate și discuții..... 107

6.3 Anchetă seroepidemiologică privind Boala Lyme la câini din zona de est a României..... 108

6.3.1 Materiale și metode 109

6.3.2 Rezultate și discuții..... 111

6.3.3 Concluzii parțiale 112

CAPITOLUL VII IDENTIFICAREA AGENȚILOR PATOGENI ÎN CĂPUȘE NEHRĂNITE (QUESTING) PRIN METODE DE BIOLOGIE MOLECULARĂ 114

7.1 Materiale și metode..... 115

7.1.1 Zona luată în studiu 115

7.1.2 Extracția ADN-ului și a ARN-ului 116

7.1.3 Testarea probelor obținute..... 117

7.1.4 Analiza statistică..... 121

7.2 Rezultate obținute 122

7.2.1 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele *Ixodes ricinus* 122

7.2.2 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele *Dermacentor reticulatus*..... 130

7.2.3 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele *Haemaphysalis punctata* 130

7.2.4 Agenți patogeni virali cercetați în căpușele testate 134

7.3 Discuții 134

7.3.1 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele *Ixodes ricinus* 134

7.3.2 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele <i>Dermacentor reticulatus</i>	139
7.3.3 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele <i>Haemaphysalis punctata</i>	140
7.3.4 Agenți patogeni virali cercetați în căpușele testate.....	140
7.4 Concluzii parțiale	141

CAPITOLUL VIII DETECȚIA AGENȚILOR PATOGENI DIN CĂPUȘE PRIN INTERMEDIUL SISTEMULUI *HIGH-THROUGHPUT REAL-TIME PCR* 142

8.1 Materiale și metode	143
8.1.1 Revers-transcripția ARN-ului.....	144
8.1.2 Pre-amplificarea ADN-ului și testarea probelor pentru agenți patogeni selectați.....	144
8.2 Detecția agenților bacterieni și parazitari în probele de ADN	145
8.3 Detecția virusurilor în probele de ADN complementar	150
8.4 Discuții.....	154
8.5 Concluzii parțiale	156

CAPITOLUL IX CARACTERIZAREA COMUNITĂȚILOR MICROBIENE DIN CĂPUȘE PRIN METODA SECVENȚIERII DE ULTIMĂ GENERAȚIE 157

9.1 Profilul metagenomic al comunităților bacteriene asociate căpușelor nehrănite din estul României	158
9.1.1 Obiectivele studiului	158
9.1.2 Materiale și metode.....	158
9.1.3 Rezultate și discuții	159
9.2 Profilul metagenomic al comunităților virale asociate căpușelor nehrănite din estul României	181
9.2.1 Obiectivele studiului	181
9.2.2 Materiale și metode.....	181
9.2.3 Rezultate și discuții	186
9.3 Concluzii parțiale	190

CAPITOLUL X CONCLUZII FINALE 192

BIBLIOGRAFIE..... 198

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS	13
LIST OF TABLES.....	15
LIST OF FIGURES	17
INTRODUCTION	24
ABSTRACT	39

PART I CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CHAPTER I IXODID TICKS INVOLVED IN TRANSMITTING PATHOGENS TO ANIMALS AND HUMANS IN ROMANIA.....	51
1.1 Epidemio-climatic characteristics of Romania	52
1.2 Ixodid tick species with role as vectors in Romania	53
1.2.1 <i>Ixodes ricinus</i>	54
1.2.2 <i>Haemaphysalis punctata</i>	56
1.2.3 <i>Dermacentor reticulatus</i>	57
1.3 Influence of biotic and abiotic factors in the distribution and abundance of ticks	60
CHAPTER II BACTERIAL TICK-BORNE PATHOGENS.....	62
2.1. <i>Borrelia</i> spp.	62
2.1.1 Pathogenic species transmitted by ticks	62
2.1.2 Transmission and natural reservoir.....	64
2.1.3 State of knowledge in Romania	65
2.2 <i>Rickettsia</i> spp.....	65
2.2.1 Pathogenic species transmitted by ticks	68
2.2.2 Transmission and natural reservoir.....	68

2.2.3 State of knowledge in Romania.....	69
2.3 <i>Bartonella</i> spp.....	72
2.3.1 Pathogenic species transmitted by ticks.....	74
2.3.2 Transmission and natural reservoir	74
2.3.3 State of knowledge in Romania.....	74
2.4 <i>Anaplasma</i> spp.....	75
2.4.1 Pathogenic species transmitted by ticks.....	75
2.4.2 Transmission and natural reservoir	77
2.4.3 State of knowledge in Romania.....	77
2.5 <i>Candidatus</i> <i>Neoehrlichia mikurensis</i>	78
2.5.1 Transmission and natural reservoir	79
2.5.2 State of knowledge in Romania.....	79
2.6 Co-infections of bacterial pathogens in ticks	79
CHAPTER III TICK-BORNE VIRUSES	81
3.1 Tick-borne encephalitic virus	81
3.1.1 Transmission and natural reservoir	82
3.1.2 State of knowledge in Romania.....	83
3.2 Crimean-Congo haemorrhagic fever virus	85
3.2.1 Transmission and natural reservoir	85
3.2.2 State of knowledge in Romania.....	86
3.3 Other arboviruses transmitted by ticks	87
CHAPTER IV NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) – EXPLORING THE MICROBIOME OF TICKS	90
4.1 Current sequencing technologies.....	90
4.1.1 <i>Illumina</i> technology	90
4.1.2 <i>Ion Torrent</i> technology	92
4.1.3 <i>Pacific biosciences</i> technology.....	93
4.2 Applications of Next Generation Sequencing	94

PART II PERSONAL CONTRIBUTIONS

CHAPTER V GOAL AND OBJECTIVES	96
CHAPTER VI SEROLOGICAL AND ETIOLOGICAL STUDIES OF MAIN TICK-BORNE INFECTIONS IN ANIMALS	98
6.1 Seroepidemiological survey of Crimean-Congo haemorrhagic fever on small ruminants in Southeastern Romania	98
6.1.1 Material and methods	100
6.1.2 Results and discussions	103
6.2 Detection of CCHF virus in ticks collected from serologic positive hosts	105
6.2.1 Material and methods	106
6.2.2 Results and discussions	107
6.3 Seroepidemiological survey of Lyme disease in dogs from Eastern Romania	108
6.3.1 Material and methods	109
6.3.2 Results and discussions	111
6.3.3 Partial conclusions	112
CHAPTER VII TICK-BORNE PATHOGENS DETECTION IN QUESTING TICKS	114
7.1 Material and methods	115
7.1.1 Study area	115
7.1.2 DNA and RNA extraction	116
7.1.3 Analysis of samples	117
7.1.4 Statistical analysis	121
7.2 Results	122
7.2.1 Tick-borne bacterial pathogens detected in <i>Ixodes ricinus</i> ticks..	122
7.2.2 Tick-borne bacterial pathogens detected in <i>Dermacentor reticulatus</i> ticks.....	130
7.2.3 Tick-borne bacterial pathogens detected in <i>Haemaphysalis punctata</i> ticks.....	130
7.2.4 Viral pathogens surveyed in ticks	134
7.3 Discussion.....	134
7.3.1 Tick-borne bacterial pathogens detected in <i>Ixodes ricinus</i> ticks..	134

7.3.2 Tick-borne bacterial pathogens detected in <i>Dermacentor reticulatus</i> ticks	139
7.3.3 Tick-borne bacterial pathogens detected in <i>Haemaphysalis punctata</i> ticks	140
7.3.4 Viral pathogens surveyed in ticks	140
7.4 Partial conclusions	141

CHAPTER VIII HIGH-THROUGHPUT DETECTION OF TICK-BORNE PATHOGENS.....142

8.1 Material and methods	143
8.1.1 RNA Revers-transcription	144
8.1.2 DNA Pre-amplification and samples analysis for the selected pathogens.....	144
8.2 Detection of bacterial and parasitic agents in DNA samples	145
8.3 Detection of viral agents in cDNA samples	150
8.4 Discussion	154
8.5 Partial conclusions.....	156

CHAPTER IX CHARACTERIZATION OF TICK MICROBIAL COMMUNITIES USING NEXT-GENERATION SEQUENCING 157

9.1 Metagenomic profile of bacterial communities associated with questing ticks in Eastern Romania	158
9.1.1 Objectives	158
9.1.2 Material and methods	158
9.1.3 Results and discussions.....	159
9.2 Metagenomic profile of viral communities associated with questing ticks in Eastern Romania	181
9.2.1 Objectives	181
9.2.2 Material and methods	181
9.2.3 Results and discussions.....	186
9.3 Partial conclusions.....	190

CHAPTER X FINAL CONCLUSIONS 195

REFERENCES.....198

ABREVIERI ABBREVIATIONS

- **ADN** – acid dezoxiribonucleic
- **ADNc** - acid dezoxiribonucleic complementar
- **ARN** – acid ribonucleic
- **ARNm** – acid ribonucleic mesager
- **ARNr** - acid ribonucleic ribozomal
- **ASCII** – American Standard Code for Information Interchange (Codul Standard American pentru Schimbul de Informații)
- **BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool (Instrumentul de căutare pentru Aliniere Locală de bază)
- **bp** – base pairs (perechi de baze)
- **CCHF** – Crimean-Congo hemorrhagic fever (febra hemoragică de Crimeea-Congo)
- **CCHFV**– Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (virusul febrei hemoragice Crimeea-Congo)
- **CNSBT** – Centrul Național de Supraveghere și Control al Bolilor Transmisibile
- **CP** - Crossing point (Prag)
- **dATP** - Deoxyadenosine triphosphate (Deoxiadenozin trifosfat)
- **dCTP** - Deoxycytidine triphosphate (Deoxicitidin trifosfat)
- **dGTP** - Deoxyguanosine triphosphate (Deoxiguanozin trifosfat)
- **dTTP** - Deoxythymidine triphosphate (Deoxitimidina trifosfat)
- **ddNTP** – dideoxynucleotides (dideoxynucleotide)
- **DEBONEL** – Dermacentor Borne Necrosis Erythema Lymphadenopathy (Necroză, eritem și limfadenopatie provocate de Dermacentor)
- **DSP** – Direcția de Sănătate Publică
- **ECM** – eritem cronic migrator
- **EDTA** – Ethylenediaminetetraacetic acid (acid etilendiaminotetraacetic)
- **ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay (testul imunoenzimatic)

- **EMBL-EBI** - European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (Laboratorul european de biologie moleculară – Institutul european de bioinformatică)
- **HGA** – Human Granulocytic Anaplasmosis (anaplasmoza granulocitară umană)
- **HIV** – Human Immunodeficiency Virus (virusul imunodeficienței umane)
- **HME** – Human Monocytic Ehrlichiosis (ehrlichioza monocitară umană)
- **HRP** - Horseradish peroxidase (peroxidază din hrean)
- **HTS** - High-throughput sequencing (secvențiere pe scară largă)
- **IgG** – Imunoglobulina G
- **LAR** – Limfangite asociate rickettsiilor
- **MDA** – Multiple displacement amplification (Amplificare prin deplasare multiplă)
- **MSF** – Mediteranean spotted fever (febra pătată mediteraneană)
- **NCBI** – National Center for Biotechnology Information (Centrul National pentru Informații de Biotehnologie)
- **NGS** – Next generation sequencing (secvențiere de ultimă generație)
- **PCR** – Polymerase chain reaction (reacția de polimerizare în lanț)
- **RFLP** – Restriction fragment length polymorphism (Restricția lungimii fragmentelor cu polimorfism)
- **RT-PCR** – Reverse transcription-polymerase chain reaction (revers transcripție - reacția în lanț a polimerazei)
- **rRT-PCR** – Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (revers transcripție în timp real - reacția în lanț a polimerazei)
- **SFG** – Spotted fever group (grupul febrei pătate)
- **SENLAT** - Scalp eschar and neck lymphadenopathy syndrome (sindromul de escară a scalpului și limfadenopatie cervicală)
- **SFTSV** - Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (Virusul sindromului de trombocitopenie cu febră severă)
- **TBEV** – Tick borne encephalitis virus (virusul encefalitei de căpușă)
- **TIBOLA** – Tick-borne lymphadenopathy (limfadenopatia de căpușă)
- **TMB** - Tetrametilbenzidină
- **WTA** - Whole transcriptome amplification (Amplificarea întregului transcriptom)

LISTA TABELELOR

LIST OF TABLES

Tabel 1.1 Speciile de căpușe Ixodidae prezente în România / Table 1.1 Ixodid ticks found in Romania.....	53
Tabel 2.1 Speciile din complexul <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato / Table 2.1 Species from <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato complex.....	63
Tabel 2.2 Clasificare, vectorii și rezervorul natural al rickettsiilor patogene pentru om / Table 2.2 Classification, vectors and reservoir hosts for human pathogenic <i>Rickettsia</i>	66
Tabel 2.3 Speciile genului <i>Bartonella</i> , rezervorul lor natural, vectorii și infecțiile produse la om / Table 2.3 <i>Bartonella</i> species, reservoir hosts, vectors and human infections.....	73
Tabel 2.4 Speciile de <i>Anaplasma</i> responsabile de producerea infecțiilor cu importanță medicală și veterinară / Table 2.4 <i>Anaplasma</i> species responsible for medically and veterinary significant infections.....	76
Tabel 6.1 Probele recoltate de la oi și capre în perioada iulie-septembrie 2014 / Table 6.1 Serum samples from sheep and goats collected between July and September 2014.....	100
Tabel 6.2 Distribuția probelor pozitive pentru IgG anti-VFHC / Table 6.2 Distribution of positive samples for IgG anti-CCHFV.....	104
Tabel 6.3 Căpușe colectate de la oi și capre testate serologic pentru prezența anticorpilor anti-FHCC / Table 6.3 Ticks collected from sheep and goats surveyed for anti-CCHFV antibodies.....	105
Tabel 6.4 Probe de sânge colectate de la câini / Table 6.4 Blood samples collected from dogs.....	110
Tabel 7.1 Amorse utilizate pentru amplificarea genelor specifice agenților patogeni din căpușe / Table 7.1 Primer sets for DNA amplification and sequencing of pathogens in ticks.....	118
Tabel 7.2 Numărul total de căpușe testate și agenții patogeni identificați / Table 7.2 Total number of questing ticks and identified pathogens according to sampling area.....	123

Tabel 7.3 Speciile <i>Borrelia</i> identificate în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> (%) / Table 7.3 <i>Borrelia</i> species identified in <i>Ixodes ricinus</i> ticks (%).....	125
Tabel 7.4 Asocieri de două și trei specii de <i>Borrelia</i> în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> / Table 7.4 Association of two and three <i>Borrelia</i> species in <i>Ixodes ricinus</i> ticks (%).....	131
Tabel 7.5 Coinfecții în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> / Table 7.5 Co-infections in <i>Ixodes ricinus</i> ticks.....	132
Tabel 8.1 Probe pozitive pentru infecția cu virusul Bourbon / Table 8.1 Positive tested samples for Bourbon virus.....	147
Tabel 8.2 Primeri utilizați în cadrul reacției rRT-PCR pentru detecția virusului Bourbon / Table 8.2 Real-time primers for the detection of Bourbon virus RNA.....	148
Tabel 8.3 Primeri construiți pentru detecția prin <i>nested</i> -PCR a virusului Bourbon / Table 8.3 Designed primers for detection of Bourbon virus by <i>nested</i> -PCR.....	152
Tabel 8.4 Numărul probelor pozitive distribuite pe zona de studiu / Table 8.4 Number of positive samples distributed by sampling area...	152
Tabel 8.5 Infecții multiple în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> / Table 8.5 Multiple pathogen infections in <i>Ixodes ricinus</i> ticks.....	153
Tabel 9.1 Distribuția probelor de ARN în cele trei mixuri analizate prin HTS / Table 9.1 Distribution of RNA samples in pools included in HTS analysis.....	182
Tabel 9.2 Primeri construiți pentru <i>contig</i> -urile ce au prezentat identitate cu agenți virali / Table 9.2 Designed primers for the <i>contig</i> sequences that matched with viral agents.....	185
Tabel 9.3 <i>Contig</i> -urile selectate pentru construcția primerilor incluși în reacția PCR de stabilire a prevalenței în probele de ARN / Table 9.3 <i>Contigs</i> for which specific primers were designed in order to determine their prevalence in RNA samples by PCR	189

LISTA FIGURILOR

LIST OF FIGURES

Figura 1.1 Distribuția geografică a căpușelor nehrănite <i>Ixodes ricinus</i> pe teritoriul României / Figure 1.1 Geographical distribution of <i>Ixodes ricinus</i> questing ticks in Romania.....	54
Figura 1.2 Ciclul de viață al căpușelor <i>Ixodes ricinus</i> / Figure 1.2 <i>Ixodes ricinus</i> life cycle.....	55
Figura 1.3 Distribuția căpușelor nehrănite <i>H. punctata</i> pe teritoriul României / Figure 1.3 Geographical distribution of <i>H. punctata</i> questing ticks in Romania.....	57
Figura 1.4 Distribuția căpușelor nehrănite <i>D. reticulatus</i> pe teritoriul României / Figure 1.4 Geographical distribution of <i>H. punctata</i> questing ticks in Romania.....	58
Figura 1.5 Ciclul biologic al speciei <i>Dermacentor reticulatus</i> / Figure 1.5 <i>Dermacentor reticulatus</i> life cycle.....	59
Figura 2.1 Artropodele vector pentru speciile din genul <i>Rickettsia</i> / Figure 2.1 Arthropod vectors of <i>Rickettsia</i> spp.....	69
Figura 3.1 Rata incidenței anuale a encefalitei de căpușă la 100.000 de locuitori (perioada 2008-2010) / Figure 3.1 TBE average annual incidence rate per 100.000 inhabitants (period 2008-2010)	84
Figura 4.1 Amplificarea în punte a ADN-ului în cadrul platformei <i>Illumina</i> / Figure 4.1 Bridge amplification in <i>Illumina</i> platform.....	91
Figura 4.2 Generarea secvențelor șablon prin PCR în emulsie / Figure 4.2 Generating template sequences by emulsion PCR.....	92
Figura 6.1 Harta distribuției <i>H. marginatum</i> în România / Figure 6.1 Distribution map of <i>H. marginatum</i> in Romania.....	99
Figura 6.2 Localitățile de unde s-au recoltat probele de ser / Figure 6.2 Localities from which serum samples were collected.....	101
Figura 6.3 Zonele de unde au fost recoltare probele de ser / Figure 6.3 Sampling sites in Eastern Romania.....	110
Figura 7.1 Zonele din estul României luate în studiu / Figure 7.1 Studied areas in Eastern Romania.....	116
Figura 7.2 Prevalența <i>Borrelia</i> spp. în căpușele nehrănite <i>I. ricinus</i> / Figure 7.2 DNA prevalence of <i>Borrelia</i> spp. in questing <i>I. ricinus</i> ticks.	124

Figura 7.3 Prevalența speciilor din genul <i>Borrelia</i> în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> / Figure 7.3 Prevalence of <i>Borrelia</i> species in <i>Ixodes ricinus</i> ticks.....	125
Figura 7.4 Prevalența <i>A. phagocytophilum</i> în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> / Figure 7.4 Prevalence of <i>A. phagocytophilum</i> in <i>Ixodes ricinus</i> ticks..	126
Figura 7.5 Prevalența <i>Rickettsia</i> spp. în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> / Figure 7.5 Prevalence of <i>Rickettsia</i> spp. in <i>Ixodes ricinus</i> ticks.....	127
Figura 7.6 Prevalența <i>Bartonella</i> spp. în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> / Figure 7.6 Prevalence of <i>Bartonella</i> spp. in <i>Ixodes ricinus</i> ticks.....	128
Figura 7.7 Prevalența <i>C. N. mikurensis</i> în căpușele <i>Ixodes ricinus</i> / Figure 7.7 Prevalence of <i>C. N. mikurensis</i> in <i>Ixodes ricinus</i> ticks.....	128
Figura 8.1 Sistemul BioMark™ dynamic array (cip 48.48) / Figure 8.1 BioMark™ dynamic array system.....	146
Figura 8.2 Curba de amplificare pentru probele de ADN testate / Figure 8.2 Amplification curve for tested DNA samples	146
Figura 8.3 Detecția virusurilor prin intermediul Sistemului BioMark™ dynamic array (cip 48.48) / Figure 8.3 Viruses detection by BioMark™ dynamic array system.....	151
Figura 8.4 Curba de amplificare pentru probele pozitive de ARN / Figure 8.4 Amplification curve for the positive RNA samples.....	151
Figura 9.1 Proportia citirilor asamblate în secvențe specifice bacteriilor în mixul-1 / Figure 9.1 Assigned sequence reads that matched to bacteria from pool-1.....	159
Figura 9.2 Proportia citirilor asamblate în secvențe specifice bacteriilor în mixul-2 / Figure 9.2 Assigned sequence reads that matched to bacteria from pool-2.....	160
Figura 9.3 Proportia citirilor asamblate în secvențe specifice bacteriilor în mixul-3 / Figure 9.3 Assigned sequence reads that matched to bacteria from pool-3.....	160
Figura 9.4 Încrengăturile bacteriene dominante în mixul-1/ Figure 9.4 Overall dominant bacteria phylum in pool-1.....	161
Figura 9.5 Încrengăturile bacteriene dominante în mixul-2 / Figure 9.5 Overall dominant bacteria phylum in pool-2.....	161
Figura 9.6 Încrengăturile bacteriene dominante în mixul-3 / Figure 9.6 Overall dominant bacteria phylum in pool-3.....	162
Figura 9.7 Numărul de citiri din Mixul-1 ce au corespuns familiilor bacteriene / Figure 9.7 Number of reads in pool-1 corresponding to bacterial families.....	163

Figura 9.8 Numărul de citiri din Mixul-2 ce au corespuns familiilor bacteriene / Figure 9.8 Number of reads in pool-2 corresponding to bacterial families.....	164
Figura 9.9 Numărul de citiri din Mixul-3 ce au corespuns familiilor bacteriene / Figure 9.9 Number of reads in pool-3 corresponding to bacterial families.....	165
Figura 9.10 Numărul de citiri identificate în mixul-1 ce au corespuns genurilor bacteriene/ Figure 9.10 Number of bacterial reads in poo-1...	166
Figura 9.11 Numărul de citiri identificate în mixul-2 ce au corespuns genurilor bacteriene/ Figure 9.11 Number of bacterial reads in pool-2...	166
Figura 9.12 Numărul de citiri ale genurilor bacteriene identificate în mixul-3 / Figure 9.12 Number of bacterial reads in pool-3.....	167
Figura 9.13 Abundența relativă a genurilor bacteriene cu potențial patogen identificate în cele trei mixuri de probe / Figure 9.13 Relative abundance of potential pathogenic bacteria identified in all three pools.....	168
Figura 9.14 Speciile din genul <i>Borrelia</i> identificate în mixul-1 / Figure 9.14 <i>Borrelia</i> species identified in pool-1.....	169
Figura 9.15 Speciile din genul <i>Borrelia</i> identificate în mixul-2 / Figure 9.15 <i>Borrelia</i> species identified in pool-2.....	170
Figura 9.16 Speciile din genul <i>Borrelia</i> identificate în mixul-3 / Figure 9.16 <i>Borrelia</i> species identified in pool-3.....	170
Figura 9.17 Speciile din genul <i>Rickettsia</i> identificate în mixul-1/ Figure 9.17 <i>Rickettsia</i> species identified in pool-1.....	171
Figura 9.18 Speciile din genul <i>Rickettsia</i> identificate în mixul-2/ Figure 9.18 <i>Rickettsia</i> species identified in pool-2.....	172
Figura 9.19 Speciile din genul <i>Rickettsia</i> identificate în mixul-3/ Figure 9.19 <i>Rickettsia</i> species identified in pool-3.....	172
Figura 9.20 Speciile din genul <i>Anaplasma</i> identificate în mixul-1 / Figure 9.20 <i>Anaplasma</i> species identified in pool-1.....	173
Figura 9.21 Speciile din genul <i>Anaplasma</i> identificate în mixul-2 / Figure 9.21 <i>Anaplasma</i> species identified in pool-2.....	174
Figura 9.22 Speciile din genul <i>Anaplasma</i> identificate în mixul-3 / Figure 9.22 <i>Anaplasma</i> species identified in pool-3.....	174
Figura 9.23 Speciile din genul <i>Bartonella</i> identificate în mixul-1 / Figure 9.23 <i>Bartonella</i> species identified in pool-1.....	175
Figura 9.24 Speciile din genul <i>Bartonella</i> identificate în mixul-2 / Figure 9.24 <i>Bartonella</i> species identified in pool-2.....	176

Figura 9.25 Speciile din genul <i>Bartonella</i> identificate în mixul-3 /	
Figure 9.25 <i>Bartonella</i> species identified in pool-3.....	176
Figura 9.26 Speciile din genul <i>Francisella</i> identificate în mixul-1 /	
Figure 9.26 <i>Francisella</i> species identified in pool-1.....	177
Figura 9.27 Speciile din genul <i>Francisella</i> identificate în mixul-2 /	
Figure 9.27 <i>Francisella</i> species identified in pool-2.....	178
Figura 9.28 Speciile din genul <i>Francisella</i> identificate în mixul-3 /	
Figure 9.28 <i>Francisella</i> species identified in pool-3.....	178
Figura 9.29 Speciile din genul <i>Coxiella</i> identificate în mixul-1/ Figure	
9.29 <i>Coxiella</i> species identified in pool-1.....	179
Figura 9.30 Speciile din genul <i>Coxiella</i> identificate în mixul-2/ Figure	
9.30 <i>Coxiella</i> species identified in pool-2.....	180
Figura 9.31 Speciile din genul <i>Coxiella</i> identificate în mixul-3 / Figure	
9.31 <i>Coxiella</i> species identified in pool-3.....	180
Figura 9.32 Numărul de citiri obținute după procesul de filtrare /	
Figure 9.32 Number of reads after filtering process.....	182
Figura 9.33 Atribuirea taxonomică a <i>contig</i> -urilor / Figure 9.33	
Flowchart of the taxonomic assignation of contigs showing a viral	
taxonomic assignment as best hit.....	183
Figura 9.34 <i>Contig</i> -uri atribuite taxonomic virusului South Bay / Figure	
9.34 Mapping results on South Bay virus.....	187
Figura 9.35 <i>Contig</i> -uri atribuite taxonomic virusului Blacklegged tick	
phlebovirus-1 / Figure 9.35 Mapping results on Blacklegged tick	
phlebovirus-1.....	187
Figura 9.36 <i>Contig</i> -uri atribuite taxonomic virusului Blacklegged tick	
phlebovirus-2 / Figure 9.36 Mapping results on Blacklegged tick	
phlebovirus-2.....	188
Figura 9.37 Migrarea ampliconilor obținuți în urma testării pe WTA a	
primerilor construiți / Figure 9.37 Migration of amplicons after testing	
designed primers on WTA.....	189
Figura 9.38 Probe pozitive pentru secvențele atribuite virusului South	
Bay / Figure 9.38 Positive samples for the sequences that matched	
with South Bay virus.....	190

INTRODUCERE

La nivel global, căpușele sunt depășite doar de țânțari în ceea ce privește numărul de boli pe care le pot transmite, fiind responsabile de vectorizarea unei mari varietăți de microorganisme patogene: protozoare, rickettsii, spirochete, virusuri. Căpușele se situează printre cei mai importanți vectori care afectează în egală măsură atât animalele cât și omul.

Incidența bolilor transmise de căpușe la nivel european este în continuă creștere, fiind consecutivă numărului ridicat de mușcături provocate de căpușe. Eforturile depuse pentru descrierea distribuției căpușelor la scară europeană sunt limitate la niveluri naționale și implică doar vectorii majori precum specia *Ixodes ricinus*. Alte specii de căpușe, mai puțin dispuse să se hrănească pe oameni, prezintă uneori o prevalență crescută cu diverși agenți patogeni.

În condițiile actuale, de globalizare intensivă și schimbări climatice majore, sunt imperios necesare studii privind biologia, capacitatea vectorială, comportamentul invazional și ecologia celor mai importanți vectori din domeniul arahnoentomologiei. Activitățile de extindere și mecanizare a agriculturii, utilizarea în exces a îngrășămintelor chimice, modernizarea și mărirea fondului agricol, cu consecințe asupra restrângerii arealului unor animale sălbatice (gazde pentru majoritatea căpușelor), modificările climatice (consecință a încălzirii globale) etc, au un impact profund în ecologia populațiilor de vectori, printr-o creștere a incidenței și cu schimbări în sezonabilitatea bolilor transmise de aceștia.

Prin așezarea geopolitică la granița de est a Uniunii Europene, România deține un rol strategic important și din punct de vedere epidemiologic ca urmare a riscului continuu existent nu doar la nivel național ci pentru întregul continent. La momentul actual, în țara noastră încă se desfășoară acțiuni de evaluare a statutului epidemiologic din punctul de vedere al infecțiilor transmise de căpușe. 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 întregul continent.

Scopul acestei lucrări a vizat obținerea de noi informații cu privire la situația epidemiologică a agenților patogeni transmiși de căpușe în zona de est a României. Lucrarea a vizat o abordare integrată pentru evaluarea riscului infecțiilor vectorizate de căpușe la animale și la om, fiind în concordanță cu principiile de bază ale conceptului *One Health*. Pentru îndeplinirea scopului propus, au fost stabilite trei obiective generale: (i) efectuarea de anchete seroepidemiologice asupra principalelor infecții cu transmitere vectorială la animale și la om în zona de studiu (Estul României), (ii) identificarea prin metode de biologie moleculară a agenților patogeni în căpușele nehrănite și (iii) caracterizarea comunităților microbiene din căpușe prin aplicarea secvențierii de ultimă generație (NGS).

§§§§§

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul Fondului Social European, Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, proiectul POSDRU/159/1.5/S/132765 - Programe doctorale și postdoctorale pentru promovarea excelenței în cercetare, dezvoltare și inovare în domeniile prioritare – agronomic și medical veterinar, ale societății bazate pe cunoaștere.

MULȚUMIRI

Doresc să adresez sincere mulțumiri D-lui Prof. Univ. Dr. Gheorghe Savuța, conducătorul științific, pentru îndrumarea și sprijinul oferit pe întreaga durată a studiilor doctorale și în realizarea acestei teze de doctorat.

Mulțumesc în mod special D-nei Dr. Muriel Vayssier-Taussat, USC Bipar, Bartonella et Tiques, Maisons-Alfort, Franța pentru călduroasa găzduire în cadrul echipei coordonată de domnia sa și pentru îndrumarea competentă oferită pe toată durata stagiului.

Mulțumesc D-lui Prof. Dr. Marc Eloit din cadrul Institutului Pasteur, Paris, pentru oportunitatea oferită de a accesa tehnici și metode “state of the art” în realizarea acestei lucrări.

Alese mulțumiri se îndreaptă către Dr. Sara Moutailler, pentru disponibilitatea competentă și permanentă pe parcursul desfășurării activităților de laborator.

Mulțumesc acțiunii COST TD1303 “European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections” (EurNegVec) pentru suportul oferit desfășurării activităților de cercetare.

Adresez mulțumiri membrilor comisiei de îndrumare pentru analiza competentă a rapoartelor de cercetare și pentru recomandările oferite pe durata studiilor doctorale.

Sincere mulțumiri adresez și distinșilor membri ai comisiei de doctorat pentru efortul depus în analizarea tezei de doctorat.

Totodată, mulțumesc atât conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași, cât și a Facultății de Medicină Veterinară pentru condițiile oferite desfășurării studiilor doctorale.

Mulțumesc colegilor de la disciplină alături de care am parcurs cei patru ani de studii doctorale; le mulțumesc pentru crearea unui ambient profesionist și totodată cald de desfășurare a activității.

Nu în ultimul rând, îmi manifest cu drag recunoștința și doresc să mulțumesc familiei mele, pentru suportul moral și susținerea continuă pe parcursul acestor ani de studiu.

INTRODUCTION

Identifying *Borrelia burgdorferi* as the causative agent of Lyme disease in 1981 was a watershed moment in understanding the major impact that tick-borne zoonoses can have on public health in both Europe and USA.

Globally, ticks are exceeded only by mosquitoes in the number of diseases that they can transmit to humans. They are responsible for transmitting a wide variety of pathogenic microorganisms: protozoa, rickettsiae, spirochetes, viruses and are among the most important vectors that can equally affect animals and humans.

The incidence of tick-borne diseases in Europe is steadily growing being consecutive of high number of bites caused by ticks. Efforts to describe Europe-wide distribution of ticks are limited to national levels and involve only major vectors such as *Ixodes ricinus*. Other ticks species, less willing to feed on people, sometimes can own an increased prevalence of pathogens.

In the current of globalization and intensive major climate changes, studies on the biology, vector capability, invasional behavior and ecology of the most important vectors are urgently needed. Activities expansion and mechanization of agriculture, excessive use of chemical fertilizers, modernization and extending agricultural areas with the consequences of restricting habitat of wild animals (hosts for most ticks) and climate change (a consequence of global warming) have a profound impact on ecology of vectors population, by increasing the incidence of diseases and seasonal changes in their transmission.

The geopolitical position of Romania at the eastern border of the EU is strategically important from an epidemiological point of view. It represents a continual risk for emerging disease, not only in Romania, but also as a gateway into Europe. The current epidemiological status of tick-borne pathogens in ticks and/or wildlife in Eastern Romania is still being evaluated. Therefore an in-depth surveillance program is needed, since such pathogens can easily be carried into and throughout Europe.

The goal of this thesis was to obtain new information regarding the epidemiological situation of tick-borne pathogens in Eastern Romania. The study has an integrated approach in accordance with the *One Health* concept

and aims to evaluate the risk of infections transmitted by ticks to animals and humans. In order to accomplish this desideratum, the study owns three main objectives: (i) serological investigation of main tick-borne infections in Eastern Romania, (ii) identification by molecular biology techniques of tick-borne pathogens in questing ticks and (iii) characterization of microbial communities in ticks by means of Next Generation Sequencing techniques.

§§§§§

Financial support for the implementation of doctoral thesis was secured from the European Social Fund, through Sectorial Operational Program Human Resources Development 2007 - 2013, the draft POSDRU/ 159/ 1.5/S/132765 "Doctorale and postdoctorale programs to promote excellence in research, development and innovation in the priority areas - agronomic and veterinary medical, of the knowledge-based society".

ACKNOWLEDGEMENTS

*I want to sincerely thank my scientific coordinator **Prof. Univ. Dr. Gheorghe Savuța**, for his guidance and support throughout my doctoral studies and for the achievement of this thesis.*

*Special thanks to **Dr. Muriel Vayssier-Taussat**, USC BiPar, Bartonella et Tiques, Maisons-Alfort, France for the warm hospitality within the team that she coordinates and for competent guidance provided throughout the internship.*

*I also want to thank **Prof. Dr. Marc Eloït** from Institute Pasteur, Paris, for allowing me to access techniques and methods "state of the art" in carrying out this work.*

*Thoughts of gratitude go to **Dr. Sara Moutailler** for competent and permanent availability throughout the course of laboratory activities.*

I am grateful to the COST Action TD1303 "European Network for Neglected Vectors and Vector-Borne Infections" (EurNegVec) for supporting this work.

I want to thank to the members of guidance committee for the competent analysis of research reports and for the recommendations provided during doctoral studies.

Sincere thanks are directed towards the distinguished doctoral committee members for their courtesy to evaluate my thesis.

I would like to thank to the leadership of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "Ion Ionescu de la Brad" University and the Faculty of Veterinary Medicine for the organizational framework offered during the course of doctoral studies.

I want to thank to my colleagues from the discipline with whom I have spent these four years of doctoral studies. Thank you for creating a warm and also professional work atmosphere.

Last but not least, I express my gratitude and I want to thank my family for continued moral support during these years of study.

REZUMAT

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 Palaeartic 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 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 marii 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 Neoehrlichia 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 imunoenzimatice 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 vânătoare); 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 coinfecțiilor 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 coinfecțiilor în căpușele din Europa are valori cuprinse între 3.2 și 28.8%, acest fapt având implicații medicale importante și reflectă necesitatea identificării coinfecțiilor 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 statistic 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.

Agenti 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, “**Detectția 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 detectia 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. slovaca*, *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 rată 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 Schmallerber). **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 contigurilor 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 constatat 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 clasă 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.

ABSTRACT

In Europe, ticks are the most important vectors for pathogens that cause both human and animal diseases. *Ixodes ricinus* ticks are the most common ticks in Europe, and are broadly distributed across the entire continent. They are capable of transmitting a wide variety of tick-borne zoonotic pathogens, such as viruses, bacteria, and protozoa. *I. ricinus* is also the most common tick species in Romania, representing 86.9% of ticks, followed by *Dermacentor marginatus* (9.5%), *Haemaphysalis punctata* (2.6%), and *Dermacentor reticulatus* (0.02%). *Rhipicephalus* spp. are also present in the southeastern regions at lower levels, and two such species, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus rossicus*, are reported to parasitize dogs and occasionally humans in Romania.

Factors that contributed at the expansion of TBPs are complex abiotic and biotic factors that influence the distribution and abundance of predominantly ixodid ticks, and also have great impact on the transmission dynamics of tick-borne pathogens.

Climate change has been invoked as a primary cause for the expansion of ticks distribution and intensity of tick-borne infections; for instance, the emergence of tick-borne encephalitis, human babesiosis and granulocytic anaplasmosis in North America and Europe occurred simultaneously with warming trends. However these increases in incidence and distribution must be connected with other potential causes such as, the increased awareness of healthcare providers, anthropogenic changes namely habitat fragmentation, urbanization, de- and reforestation, land use changes that were not under a clear impact of climate change.

Romania has a unique particularity in comparison with other European countries that being the separation of territory in five ecoregions represented by a high biodiversity in terms of habitats and variety of mammal species present. In terms of type of habitats found in Romania, there are described 357 types that are categorized in seven classes and 24 subclasses according to the Palaearctic Habitats classification system. Both abiotic and biotic components inside habitats influence the distribution and abundance of tick populations. Because vegetation type influences the presence and movement of host

species, it is also likely to influence the presence, density, or persistence of tick species and the probability of successful host acquisition. Certain ticks associate with a specific microclimate and habitat conditions that are characterized by a serie of variables such as humidity, temperature, and day light hour.

Also, the geopolitical position of Romania at the Eastern border of the EU is strategically important from an epidemiological point of view. It represents a continual risk for emerging disease, not only in Romania, but also as a gateway into Europe.

The doctoral thesis **„Epidemiological and etiological research regarding emerging vector-borne infections in Eastern Romania”** is structured in accordance with current legal criteria into two parts: a first part entitled **„Current state of knowledge”** that comprises 44 pages and a second part **„Personal contributions”** containing 102 pages, that details the results obtained during PhD studies. To these two main parts, thesis also contains a table of content, introduction, abstract and references.

The first part **„Current state of knowledge”** is structured in four chapters that present literature data regarding main components in the field of tick-borne diseases and their status in Romania: epidemio-climatic characteristics, information on tick species, bacterial and viral agents vectorised by ticks. Chapter IV describes different next generation sequencing techniques that can be used in screening of pathogens in ticks.

The first chapter entitled **“Ixodid ticks involved in transmitting pathogens to animals and humans in Romania”** starts by describing the epidemio-climatic conditions in Romania that can influence the distribution of ticks. In this chapter it is also given information on the tick species diversity found in Romania. Contributing factors at the expansion of tick-borne pathogens are complex abiotic and biotic factors that influence the distribution and abundance of predominantly ixodid ticks, and also have great impact on the transmission dynamics of tick-borne pathogens.

Habitat variety and the host diversity result for relatively high tick species diversity in Romania, in comparison with neighboring countries. Distribution maps and host spectrum showed that the most widespread ticks in Romania are *Ixodes ricinus* (86.9%), *Dermacentor marginatus* (9.5%) and *Haemaphysalis punctata* (2.6%). However, in southern Romania, thermophilic Palearctic species like *Rhipicephalus bursa* and *Hyalomma marginatum* are also common. *I. ricinus* is the most important zoonoses vector tick in Romania; this argument is supported by its abundance and wide host specificity, high frequency in humans and significant vectorial capacity.

In terms of pathogens occurrence, chapter II „**Bacterial tick-borne pathogens**” describes the main bacterial agents that are already detected in ticks from Romania. *Borrelia burgdorferi* sensu lato raised the most interest of the tick-borne pathogens due to its great implications in medical health. Studies revealed a mean prevalence of *B. burgdorferi* s.l in *I. ricinus* ticks at a lower level comparing with the European average. Other pathogens such as *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp. and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* were also detected in ticks and animal hosts from Romania.

In chapter III, “**Tick-borne viruses**”, two viral agents are described due to their occurrence in Romania. Also, other arboviruses are detailed taking into account the low number of studies that focused on the detection of viruses in ticks.

The chapter IV entitled “**Next generation sequencing – exploring the microbiome of ticks**”, describes the sequencing techniques used for the description of microbial populations in different organisms. There are also presented the applications of Next generation sequencing. As the current situation of tick-borne pathogens in Romania is still being evaluated, next generation techniques could be applied for the description of tick microbiome.

The second part of the thesis „**Personal contributions**”, contains **five chapters**, each chapter presents in detail, by following a specific structure, the results obtained for the proposed objectives. This part ends with a final chapter in which the final conclusions are shown.

The current epidemiological status of tick-borne pathogens in ticks and/or wildlife in Eastern Romania is still being evaluated. Therefore an in-depth surveillance program is needed, since such pathogens can easily be carried into and throughout Europe.

The goal of this thesis was to obtain new information regarding the epidemiological situation of tick-borne pathogens in Eastern Romania. The study had an integrated approach in accordance with the *One Health* concept and aimed to evaluate the risk of infections transmitted by ticks to animals and humans. In order to accomplish this desideratum, the study had **three main objectives**:

- **serological investigation of main tick-borne infections in Eastern Romania**
- **Identification by molecular biology techniques of tick-borne pathogens in questing ticks**
- **characterization of ticks microbial communities by means of Next Generation Sequencing**

In chapter VI „Seroepidemiological surveys of main tick-borne infections in animals and humans”, are shown results obtained after performing seroepidemiological surveys of two main tick-borne infections in animals and humans - Lyme disease in dogs and Crimean-Congo haemorrhagic fever in small ruminants (sheep and goats).

The first serosurvey focused on the detection of **Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHF) antibodies** in small ruminants. CCHF is a widespread zoonotic disease caused by a tick-borne virus (Nairovirus) of the Bunyaviridae family. Small ruminants with CCHF undergo a mild infection, sometimes with transient viraemia. Serum samples to test for CCHFV antibodies were collected from 90 small ruminants in various sites in Tulcea and Constanța Counties. All serum samples were tested for the presence of specific IgG antibodies against CCHFV by a commercial ELISA kit (Vectorbest, Novosibirsk, Russia), slightly modified. The serological examination of serum samples for anti - CCHFV infection evidenced **CCHF IgG antibodies in the blood of 16 out of 29 goats (55%) and in 51 out of 61 (85%) sheep**. These results suggest that the CCHF virus may be widespread in traditionally reared small ruminant livestock in Tulcea and Constanța Counties. CCHF infected animals also represent a potential threat to abattoir workers and to public health.

Sheep and goats included in the study were parasitized by ticks belonging to ***Rhipicephalus* spp.** These ticks were collected and tested by rRT-PCR for the identification of CCHF virus; all ticks turned out to be **negative** for this viral agent.

Second subchapter presents the results obtained after surveying dog sera for **Lyme disease** antibodies. Lyme disease is a vector-borne infection caused by spirochetes from *Borrelia burgdorferi* complex transmitted by ticks. In Europe, the most common genospecies isolated from animals and humans are: *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Pathogens are transmitted by various species of genus *Ixodes*. In Europe, *Ixodes ricinus* is the most important vector. Dogs are susceptible to tick infestation due to their interactions with the specific habitats of arthropods and so the risk of Lyme disease transmission is high. Many authors have proposed dogs to fulfill the role of "sentinels" making it possible the identification of risk areas for Lyme disease.

The purpose of this study was to determine the seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* s.l. in dog sera collected from four counties of Romania. Dog sera were analyzed using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (IgG Canine Lyme Borrelia - ELISA, NOVATEC, Germany). A total of 90 serum samples were tested. Following the

immunoassay, one sample (1.11%) was positive for *Borrelia burgdorferi* IgG antibodies from the 90 tested samples. The seroprevalence registered in this study was lower than in previous studies conducted in Romania. The fact that most of the samples were collected from dogs kept in animal shelters may be an explanation for the low seroprevalence.

In chapter VII “Tick-borne pathogens detection in questing ticks”, the goal was to identify most important pathogens involved in causing human infections and to determine the coinfection rates in questing ticks collected from one urban region dedicated for recreational activities and two forested areas in Eastern Romania.

In Europe, ticks are the most important vectors of pathogens that cause both human and animal diseases. So far, around 60 bacteria, 30 parasites and 100 viruses are registered as potential tick-borne pathogens and the list continues to expand. Numerous studies have indicated the role of ticks in the transmission of pathogens that have implications in human health, and their medical importance has long since been acknowledged. Also, several reports indicated ticks capacity to harbor two or more pathogens and transmit them simultaneously causing multiple infections, events that are not rare in humans. In Romania however, most surveys of ticks have concentrated on the identification of a limited number of bacterial and parasitic tick-transmitted pathogens with low concern for the identification of coinfections and detection of viruses in questing ticks.

The objective of our study was to identify the most important tick-borne pathogens in questing ticks collected from forested and urban areas and evaluate their coinfection rates in Eastern Romania as a gateway into Europe. We analyzed 557 questing adult or nymph hard ticks belonging to three species (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis punctata*).

Briefly, DNA samples were assessed by PCR and quantitative PCR to determine the infection rates of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* spp. and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. We also screened RNA samples by RT-qPCR to identify the infection with tick-borne encephalitis virus and Eyach virus. The global prevalence of ticks infected with one or more pathogens was 45.9%.

Tick-borne pathogens detected in *Ixodes ricinus*

***Ixodes ricinus* ticks represented 95.9% (534/557)** from the collected ticks with 77 adult ticks and 457 nymphs. The overall prevalence of infection with one or more of the tested pathogens registered a value of 47.9% (256/534).

***Borrelia* spp. DNA was identified in 164 (30.7%) *I. ricinus* ticks.** Overall, *Borrelia* spp. infection rates were not significantly different in adult

(32.4%; 25/77) and nymphal (30.6%; 139/457) *I. ricinus* ticks. Nested PCR performed on *Borrelia* spp. positive samples, targeting *IGS 16S-23S* gene, revealed 20 positive samples. The remaining 144 *Borrelia* spp.-positive samples that tested negative by nested PCR were included in a real time PCR reaction, where 113 *Borrelia* spp.-positive *I. ricinus* ticks had specific sequences for one or more *Borrelia* species. The mean infection rate, over all ticks tested, was 14.7% for *B. garinii* (14.2% of the adults and 14.8% of the nymphs), 8.8% for *B. afzelii* (6.4% of the adults and 9.1% of the nymphs), 4.8% for *B. valaisiana* (3.8% of the adults and 5% of the nymphs), 4.8% for *B. lusitaniae* (3.8% of the adults and 5% of the nymphs), 1.1% for *B. spielmanii* (1.2% of the adults and 1% of the nymphs), 0.9% for *B. miyamotoi* (1.2% of the adults and 0.8% of the nymphs), 0.3% for *B. burgdorferi sensu stricto* (0.4% of the nymphs) and 0.1% for *B. bissetti* (0.2% of the nymphs).

***Anaplasma phagocytophilum* was detected in 7/534 ticks (1.3%) *I. ricinus* nymphs**, no adult tick testing positive. To date, no reported cases of human *A. phagocytophilum* infection in Romania exist but there are many studies indicating circulation of *A. phagocytophilum* in Romanian territory.

Tick-borne rickettsioses are recognized emerging diseases present in Europe and consequently in Romania, that cause a wide range of clinical manifestations. Previous research in Romania focused on the identification of *Rickettsia* spp. in ticks collected from different hosts and no study reported prevalence of spotted fever group (SFG) *Rickettsia* in questing ticks. ***Rickettsia* spp. In this study, DNA was observed in 78/534 (14.6%) *I. ricinus* ticks.** There were no differences in the prevalence of infection between adults and nymphs. DNA was detected in 12/77 adults (15.5%) and in 66/457 nymphs (14.4%).

***Bartonella* spp. DNA was detected in 22 *I. ricinus* adults or nymphs (22/534, 4.1%).** *Bartonella* spp. infected 7.7% (6/77) adult and 3.5% (16/457) nymphal *I. ricinus* ticks. One positive sample was successfully sequenced and matched *B. henselae*, a pathogen responsible for cat-scratch disease, one of the most common zoonosis acquired from domestic animals in industrialized countries. Competence of *I. ricinus* for this bacterium has been demonstrated under laboratory conditions, and human infections with *B. henselae* following tick bites have also been reported. ***Candidatus N. mikurensis* DNA was found in 29/534 (5.4%) ticks**, all of which were *I. ricinus* nymphs, resulting in a prevalence of 6.3% (29/457). Global prevalence was similar to other European studies with values between 3.5% and 7%. *C. N. mikurensis* was recently identified in Romania, in a tick collected from a patient. Another recent study has established *C. N. mikurensis* prevalence in unfed *I. ricinus* ticks from center

and north part of the country. The infection rate reported in our study is in accordance with this previous study.

TBEv was detected in 10 RNA samples via specific rRT-PCR, but could not be confirmed by nested PCR. Given the fact that there are limited data on TBEV infection on ticks, it is necessary to evaluate the patterns and distribution of TBEV infection in Ixodid ticks.

There are several published **cases of humans being infected with multiple tick-borne pathogens**; this is somewhat expected, as many ticks harboring two or more infectious agents can transmit them simultaneously. This phenomenon may occur frequently in *I. ricinus* ticks, as they feed on a large variety of host species which act as reservoirs for multiple pathogens

Co-infections were identified only in *I. ricinus* ticks (96/534; 17.9%), which accounted for 37.5% (96/256) of infected ticks. Co-infection prevalence was 15.5% (12/77) in adults and 18.3% (84/457) in nymphs. **Regarding associations between the *Borrelia burgdorferi* s.l. group** (comprising *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. bissetti*), 57 *I. ricinus* ticks were positive for association with two species and 8 ticks were infected by three different *Borrelia* species. Most frequent dual *Borrelia* specie association was between *B. garinii* and *B. afzelii* (30/57; 52.6% *I. ricinus* ticks) followed by *B. garinii/B. lusitaniae* (18/57; 31.5% ticks). Association of three *Borrelia* species was found in eight *I. ricinus* ticks, half of them being infected with *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. valaisiana*.

Co-infections of *Borrelia* species with other tick-borne pathogens or between the other surveyed agents occurred in 8.2% *I. ricinus* ticks (44/534; 6.4% of adult stages and 8.5% of nymphs) distributed in ticks from all three sampling areas. Dual co-infection between a *Borrelia* specie and other pathogen occurred in 22 *I. ricinus* ticks (22/534; 4.1%); nine ticks had co-infections between *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. and other seven ticks tested positive for *Borrelia* spp. and *C.N. mikurensis*. We detected co-infection of two pathogens without *Borrelia* species in five ticks (5/534; 0.9%).

These results raise further questions about whether these agents can be co-transmitted to humans (or animals), their incidence, the effect of co-infection on symptom severity, the efficacy of treatments against multiple infection, and the development of new diagnostic tests better adapted to screening for multiple tick-borne diseases.

Our findings confirm that ticks are important pathogen vectors in both forested and urbanized areas. We have generated detailed data on the

occurrence of zoonotic pathogens, representing solid foundation for further studies examining the risk of human tick-borne diseases.

Tick-borne pathogens detected in *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus is a tick specie considered to be the second most reported after *I. ricinus* in central Europe. In Romania however, questing *D. reticulatus* ticks prevalence was estimated at 0.02%. *D. reticulatus* ticks were found only in sampling area 2, four adult females (4/557; 0.7%) being obtained after dragging. Molecular testing for all tick-borne pathogens included in this study, revealed one positive *D. reticulatus* tick for *Rickettsia* spp. The *gltA* sequence obtained from the *Rickettsia*-positive *D. reticulatus* female shared 99% similarity to ***Rickettsia raoultii*** (GenBank accession no. KJ663737.1).

Tick-borne pathogens detected in *H. punctata*

H. punctata ticks represented 3.4% from the total ticks collected, with a total of 19 ticks (three adults and 16 nymphs). There is limited information regarding identification of tick-borne pathogens in *H. punctata* tick species from Romania, no pathogen being so far successfully identified. After testing for the selected pathogens, three nymphs were infected with a single different tick-borne pathogen (3/19; 15.7%). *Borrelia* spp. DNA was identified in one *H. punctata* nymph (1/19; 0.6%). The positive *Borrelia* spp. PCR product was successfully sequenced and showed 94% identity to ***B. miyamotoi*** sequences (GenBank accession no. CP010308.1). *Rickettsia* spp. DNA was detected in one *H. punctata* nymph (1/19; 0.6%). Valid sequence was unable to be generated for the single *H. punctata* PCR product.

Bartonella spp. DNA was observed in a single *H. punctata* nymph (1/19, 0.6%) 2. Among the 19 *H. punctata* ticks analyzed, there were no positive samples for more than one pathogen.

Chapter VIII entitled **“High-throughput detection of tick-borne pathogens”**, includes a study that analyzed 144 *Borrelia* spp.-positive samples by high-throughput real-time PCR using **BioMark real-time PCR system (Fluidigm, USA)**. Also, 34 RNA pools obtained by mixing 557 RNA samples were tested for 24 viral agents vectorized by ixodid ticks.

After testing the 144 samples for 39 bacteria and parasites, 15 bacterial agents (*Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma marginale*, *A. platys*, *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. canis*, *Rickettsia conorii*, *R. slovaca*, *R. masilliae*, *R. aeschlimannii*, *Bartonella quintana*, *Coxiella burnetii*) and 9 parasites (*Babesia divergens*, *B. canis*, *B. bovis*, *B. caballi*, *B. bigemina*, *B. major*, *B. ovis*, *Theileria equi*, *T. annulata*) were not identified. **There were identified seven genospecies from *Borrelia burgdorferi* s.l. group**, *B. garinii* being the most abundant specie (79/144; 54.8%) followed by

B. afzelii (46/144; 31.9%). *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* were detected in 26 tick samples (26/144; 18%).

DNA samples also tested positive for the infection with *Anaplasma phagocytophilum* and *C. N. mikurensis* at a low infection rate (1.3%; 2/144 and 2.7%; 4/144 respectively). For *Rickettsia* spp., 60 samples tested positive (60/144; 41.6%), BioMark real-time PCR system being able to identify only one specie - *Rickettsia helvetica* with a prevalence of **11.8%** (17/144). Ticks showed specific sequences for parasitic agents as well. There were detected **three species from Babesia genus**: *B. microti*, *B. vogeli* and *B. EU1*; these species had a prevalence of 0.6% (1/144), 1.3% (2/144) and 2% (3/144) respectively.

Multiple pathogen infections were identified in 90 samples (62.5%) being noticed **43 different associations of pathogens**; 23 (23/144; 15.9%) ticks had association of two *Borrelia burgdorferi* s.l genospecies, most frequent being the one between *B. garinii* and *B. afzelii* (11/144; 7.6%) followed by *B. garinii* and *B. lusitaniae* in nine ticks.

After testing the 34 pools for **24 viral agents**, **one pool was positive for the infection with West Nile virus and another pool had infection with Bourbon virus** (*Orthomyxoviridae*). Further detection methods performed for the confirmation of Bourbon virus infection (rRT-PCR and nested-PCR) did not show positive samples.

The BioMark real-time PCR system as a surveillance method represents a major improvement in epidemiological studies, able to facilitate comprehensive testing of tick-borne pathogens, and which can also be customized to monitor emerging diseases.

Chapter IX „**Characterization of tick microbial communities using Next-Generation Sequencing**”, shows the potential of Next-Generation Sequencing as a tool for metagenomic studies that aim to describe ticks microbiome.

In the first part of this chapter are described the results after screening three pools of tick sample for the presence of **viruses** by Next Generation Sequencing (NGS) on the Illumina NextSeq platform. Worldwide, ticks are responsible for transmitting the highest number of pathogens compared to any other arthropod. Identification of bacterial tick-transmitted pathogens was the spotlight for most surveys carried out in Romania, with less concern for the viral agents vectorized by ticks.

The objective of the study was to characterize the virome of questing ticks from Eastern Romania as a gateway into Europe, by using high-throughput sequencing (HTS). The study included 557 questing adult or nymph ticks (534

Ixodes ricinus, 4 *Dermacentor reticulatus* and 19 *Haemaphysalis punctata*) randomly distributed in three pools, collected from three distinct areas in Eastern Romania.

Analysis of HTS data uncovered sequences with similarity to viruses that associate to vertebrates, arthropods and plants. The number of total viral reads obtained after the assembly step was 21 368 211, 32 337 393 and 29 676 963 respectively for each pool. Subsequently, assembled viral contigs generated from each pool totaled 436 956, 1 052 524 and 272 492 contigs. Taxonomic assignation of contigs considered as distant to known vertebrate viruses, **revealed homology to viral agents of *Bunyaviridae* family**, each pool recording a number of 58, 243 and 11 contigs. Among them, contigs mapped to recently described viruses from *Nairovirus* genus- **South Bay virus**, and from *Phlebovirus* genus namely **blacklegged tick phlebovirus-1** and **blacklegged tick phlebovirus-2**. Prevalence of viral sequences in ticks was screened by PCR from cDNA of individual ticks, using specific primers for the sequences found by HTS. South Bay virus-like cDNA was detected in three *Ixodes ricinus* (one nymph, a female and a male) with a global prevalence of 0.5%, while no ticks were positive for *Phlebovirus*-like sequences. Two sequences South Bay virus-like were validated and proved to be highly homogeneous (99% identity), originating from ticks collected at the same site (male and female). After establishing the prevalence and distribution of South Bay virus-like in ticks, the following step will be the attempt to isolate this new viral agent by intracerebral inoculation of type I interferon receptor knock-out mice.

In the second part of this chapter it is described the **metagenomic profile of bacterial communities** associated with questing ticks in Romania revealed after applying Next Generation Sequencing on the Illumina NextSeq platform.

Total number of reads for bacterial agents was 606.368 for pool-1, 480.101 for pool -2 and 1.216.785 for pool -3; reads were assembled to contigs that matched to a high number of bacterial families, some with species known to be transmitted by ticks. **There were detected potential pathogenic bacterial genera that have a wide distribution in Europe: *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Francisella*, *Ehrlichia* and also recently identified pathogenic agents - *Candidatus* *Neoehrlichia mikurensis* and *Orientia* sp. *Rickettsia* genus had the highest number of reads in all three pools (72.333 in pool-1, 47.541 in pool -2 and 354.511 in pool -3) followed by *Francisella* and *Borrelia*.**

High-throughput sequencing technologies provide a complete picture of the bacterial communities present within questing ticks under natural conditions.

This study demonstrates a novel detection strategy for the microbiomes of arthropod vectors in the context of epidemiological and ecological studies. Although further research is required to investigate the functional and the ecological implications of the bacterial communities associated with ticks, this work represents an initial effort in data acquisition and an innovative analysis towards the characterization of the tick microbiome including disease-causing bacteria under natural condition.

PARTEA I
- STADIUL CUNOAȘTERII -

PART I
-CURRENT STATE OF KNOWLEDGE-

CAPITOLUL I

CĂPUȘELE IXODIDAE CU ROL ÎN TRANSMITEREA AGENȚILOR PATOGENI LA ANIMALE ȘI LA OM ÎN ROMÂNIA

CHAPTER I

IXODID TICKS INVOLVED IN TRANSMITTING PATHOGENS TO ANIMALS AND HUMANS IN ROMANIA

Vectorii biologici ai infecțiilor umane și animale sunt în principal specii de artropode capabile să transmită agenți infecțioși la om dar și la alte gazde [Savuța, 2007]. Căpușele sunt cei mai importanți vectori din Europa, cauzând infecții atât la om cât și la animale. Căpușele *Ixodes ricinus* reprezintă specia cea mai comună din Europa, fiind distribuită pe întreg continentul. Acestea sunt capabile de transmiterea unei varietăți largi de agenți patogeni (virusuri, bacterii, protozoare). *I. ricinus* reprezintă specia dominantă și pentru România (aprox. 86%), fiind urmată de *Dermacentor marginatus* (9.5%), *Haemaphysalis punctata* (2.6%) și *Dermacentor reticulatus* (0.02%) [Mihalca și colab., 2012a].

Dintre infecțiile provocate în urma parazitismului căpușelor, boala Lyme este cea mai des întâlnită în Europa. Bacteriile din grupul *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) provoacă anual circa 85.000 de cazuri [Subramanian și colab., 2012].

Prin așezarea geopolitică la granița de est a Uniunii Europene, România deține un rol strategic important și din punct de vedere epidemiologic. Căpușele reprezintă un risc continuu pentru România și pentru întreg continentul. La momentul actual, în țara noastră, încă se desfășoară acțiuni de evaluare a statutului epidemiologic din punctul de vedere al infecțiilor transmise de căpușe. În acest context, se impune aplicarea unor programe de supraveghere, dat fiind faptul că agenții infecțioși transmiși de căpușe pot fi cu ușurință diseminați pe teritorii extinse.

1.1 CARACTERISTICILE EPIDEMIO-CLIMATICE ALE ROMÂNIEI

România deține o particularitate unică comparativ cu restul țărilor din Europa, având teritoriul divizat în cinci ecoregiuni caracterizate printr-o bogată diversitate a habitatelor și a speciilor de mamifere prezente [Mihalca și colab., 2012a]. 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 [Doniță și colab., 2005]. Varietatea speciilor de mamifere din România este reprezentată de cele 112 specii descrise. 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 [Mihalca și colab., 2012b].

Păsările migratoare reprezintă de asemenea o altă componentă cu rol important în distribuția căpușelor în interiorul unui continent dar și între continente. Acestea reprezintă, de altfel, rezervor natural pentru numeroși agenți patogeni transmiși de căpușe cât și o sursă de infecție pentru acestea. Păsările migratoare au numeroase opriri pe traseul lor pe durata căroră au parte de hrană, odihnă și de asemenea pot prelua căpușe sau le pot elimina. În acest mod se realizează o extindere a arealului de distribuție a agenților patogeni [Olsen și colab., 1995]. Delta Dunării reprezintă un important punct de oprire pentru păsările migratoare ce se deplasează în Africa sau nordul Eurasiei. Anual, milioane de păsări din 300 de specii diferite au ca punct de oprire Delta Dunării [Sándor și colab., 2014]. Această zonă cuprinde o mare varietate de specii de căpușe, fiind de asemenea identificați numeroși agenți patogeni pentru animale și om (*Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*) [Sándor și colab., 2014, Mărcuțan și colab., 2016].

România cuprinde o mare diversitate în ceea ce privește speciile de căpușe prezente tocmai datorită varietății habitatului și a diversității speciilor gazdă. Hărțile de distribuție existente încadrează 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 specii comune regiunii, respectiv speciile Paleartice termofile *Rhipicephalus bursa* și *Hyalomma marginatum*. *Ixodes ricinus* este asociat cu transmiterea la om a celui mai mare număr de agenți patogeni, fiind și cel mai important vector al agenților zoonotici din România [Mihalca și colab., 2012c]. Un aspect important din punct de vedere epidemiologic este reprezentat și de procentul ridicat al populației din mediul rural. Astfel, aproape jumătate din populația țării locuiește și muncește în zone rurale, menținând un contact strâns cu natura,

ceea ce creează un risc de expunere la atacul căpușelor [Mihalca și colab., 2012c].

1.2 SPECIILE DE CĂPUȘE IXODIDAE CU ROL DE VECTOR ÎN ROMÂNIA

Căpușele sunt artropode cu importanță deosebită din punct de vedere medical, mai ales din pricina capacității lor vectoriale. Căpușele dure sunt cunoscute pentru transmiterea agenților infecțioși la animale și la om și reprezintă categoria de artropode capabilă să vectorizeze cea mai largă varietate de agenți patogeni, cu afectarea omului, a animalelor de companie și a celor de rentă [Pfaffle și colab., 2013]. Căpușele fac parte din încrengătura Arthropoda, clasa Arachnida, subclasa Acari, supraordinul Parasitiformes, ordinul Ixodida. Există trei familii de căpușe: Ixodidae sau căpușele dure, Argasidae sau căpușele moi și Nuttalliellidae.

În România sunt descrise 27 specii de căpușe, dintre care 25 aparțin familiei Ixodidae (Tabel 1.1) și 2 familiei Argasidae (*Argas persicus* și *Argas reflexus*) [Coipan și colab., 2011]. Specia dominantă este *Ixodes ricinus* (86.9%), urmată de *Dermacentor marginatus* (9.5%) și *Haemaphysalis punctata* (2.6%) [Mihalca și colab., 2012c].

Tabel 1.1/Table 1.1

Speciile de căpușe Ixodidae prezente în România

Ixodid ticks found in Romania [Feider, 1965; Coipan și colab., 2011; Mihalca și colab., 2012a].

<i>Dermacentor</i>	<i>Haemaphysalis</i>	<i>Hyalomma</i>	<i>Ixodes</i>	<i>Rhipicephalus</i>
<i>D. marginatus</i>	<i>H. concinna</i>	<i>H. aegyptium</i>	<i>I. apronophorus</i>	<i>R. annulatus</i>
<i>D. reticulatus</i>	<i>H. inermis</i>	<i>H. scupense</i>	<i>I. arboricola</i>	<i>R. bursa</i>
	<i>H. parva</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>I. crenulatus</i>	<i>R. rossicus</i>
	<i>H. punctata</i>		<i>I. hexagonus</i>	<i>R. sanguineus</i>
	<i>H. sulcata</i>		<i>I. laguri</i>	
			<i>I. redikorzevi</i>	
			<i>I. ricinus</i>	
			<i>I. rugicollis</i>	
			<i>I. simplex</i>	
			<i>I. trianguliceps</i>	
			<i>I. vespertilionis</i>	

1.2.1 *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus reprezintă specia dominantă de pe continentul european [Reis și colab., 2011] și este de asemenea specia cel mai des întâlnită în zonele împădurite din România (Figura 1.1) [Mihalca și colab., 2012a]. Este cunoscut faptul că această căpușă prezintă o arie foarte largă în ceea ce privește diversitatea gazdelor, fiind capabilă să paraziteze un număr de peste 300 de specii [Mihalca și colab., 2013]. În plus, căpușele *I. ricinus* pot îndeplini sarcina de vector pentru numeroși agenți patogeni de origine bacteriană, virală sau parazitară cu importanță pentru sănătatea umană. Principalii reprezentanți din această categorie sunt: virusul encefalitei de căpușă - subtipul vestic european (TBEv-Eur), responsabil de producerea encefalitei de căpușă și spirochetele din complexul *B. burgdorferi* s.l., agentul bolii Lyme la om [Rizzoli și colab., 2014].

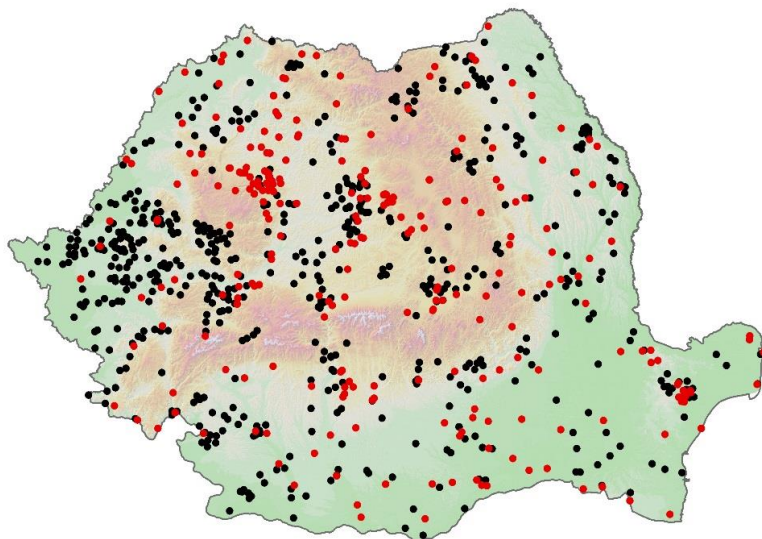


Figura 1.1 Distribuția geografică a căpușelor nehrănite *Ixodes ricinus* pe teritoriul României

● Zonele cunoscute înainte de 2012; ● Zone adăugate de Mihalca și colab., 2012

Figure 1.1 Geographical distribution of *Ixodes ricinus* questing ticks in Romania

● Sites known before 2012; ● Sites added by Mihalca et al., 2012
[Mihalca și colab., 2012a]

Cicluul de viață al căpușelor Ixodidae prezintă patru stadii: ou, larvă, nimfă și adult. Fiecare stadiu este separat de hrănirea cu sânge pe o gazdă, care poate dura mai multe zile, fiind apoi urmată de procesul de năpârlire. Acuplarea

se realizează pe gazdă, în cazul majorității speciilor de Ixodidae. Din ouă iau naștere larve hexapode, la ecloziune acestea sunt umflate și moi, după care, în decurs de câteva zile devin dure prin pierderea apei și prin eliminarea metaboliților acumulați în timpul embriogenezei; larvele încep apoi căutarea primei gazde pentru a se hrăni. După ce s-au hrănit timp de câteva zile, se desprind de pe gazdă și cad pe sol pentru a digera sângele îngurgitat și pentru a năpârli. Această perioadă poate dura între 2-8 săptămâni, în funcție de condițiile de mediu (Figura 1.2).

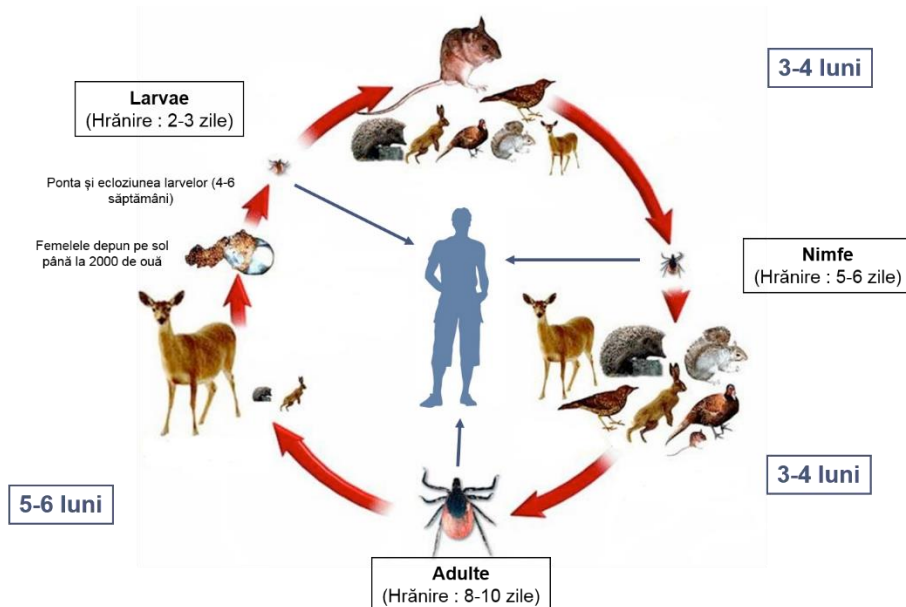


Figura 1.2 Ciclul de viață al căpușelor *Ixodes ricinus*
Figure 1.2 *Ixodes ricinus* life cycle [după Parola și colab., 2001b]

Larvele nu se deplasează decât foarte puțin pe orizontală și rămân grupate, sub formă de cuiburi, în așteptarea gazdelor. Dispersia lor depinde în principal de gazda pe care sunt atașate, fiind mult mai eficientă dacă gazdele sunt păsări sau animale mari. După năpârlire, larvele se transformă în nimfe octapode, având demisiuni de aproximativ 1 mm. Acestea pornesc în căutarea unei noi gazde, pentru a se hrăni din nou cu sânge. Nimfa, după ce s-a hrănit complet, măsoară aproximativ 2 mm. După hrănire, căpușele se detașează de pe gazdă și cad pe sol, având loc cea de-a doua năpârlire (Figura 1.2).

După a doua năpârlire, nimfele se transformă în căpușe adulte ce prezintă dimorfism sexual pronunțat (femele / masculi). Femelele *I. ricinus* ajung la dimensiuni de 3-3.6 mm iar masculii 2.4-2.8 mm. Femelele se pot hrăni timp

de mai multe zile (7-13 zile la *I. ricinus*). Masculii sunt frecvent găsiți cu hipostomul introdus în porul genital al femelei, după ce în prealabil și-au extras un spermatofor din propriul por genital depunându-l apoi în porul genital al partenerelor [Cojocaru, 2014]. Frecvent, femelele de *I. ricinus* aleg o strategie de reproducere prin acceptarea a 2 sau 3 genitori diferiți. Această paternitate multiplă crește diversitatea genetică precum și șansele de dispersie a ouălor [Hasle și colab., 2008]. După acuplare, femela trebuie să se hrănească pentru ultima oară, ajungând la dimensiunile unui bob de mazăre. Această ultimă masă îi va permite să depună aproximativ 2.000 de ouă, în funcție și de cantitatea de sânge ingerată, înainte să se usuce și să moară (Figura 1.2).

Referitor la gazdele parazitare, există numeroase specii de animale pe care căpușele se pot hrăni, ciclul de viață al speciei *I. ricinus* evidențiind acest aspect (Figura 1.2). În ceea ce privește modul de infecție a căpușelor cu agenți patogeni, există 3 variante: prin hrănirea cu sângele unui animal infectat, prin co-hrănire sau prin transmitere transovariană (verticală). Așadar, în orice stadiu evolutiv, căpușele pot fi infectate cu unul sau mai mulți agenți patogeni. În cursul dezvoltării transstadiale, căpușele *I. ricinus* se pot hrăni pe un număr de aproximativ 300 de specii, reprezentate de păsări, mamifere mari și mici. Larvele se hrănesc în mod curent pe mamifere mici și păsări de talie mică (90%). Stadiul de nimfă al speciei *I. ricinus* reprezintă cel mai primejdios stadiu pentru sănătatea omului, datorită dimensiunii reduse, a antropofiliei pronunțate, abundenței și a capacității acesteia de a rămâne atașată de om o perioadă mai îndelungată [Vassalo și colab., 2000]. Toți acești factori solicită noi studii privind abundența și rata de infecție a nimfelor *I. ricinus*, din perspectiva sănătății umane. Căpușele adulte se hrănesc de preferință pe gazdele de talie mare [Parola și colab., 2001b].

1.2.2 *Haemaphysalis punctata*

Specia *H. punctata* cuprinde căpușe de dimensiuni mici, fiind identificate în aproape toate țările din Europa. Mai mult, numeroase studii au descris parazitismul acestei specii la om. În ceea ce privește capacitatea de vector, căpușele *H. punctata* sunt considerate vectori competenți pentru virusul febrei hemoragice Crimeea-Congo și virusul encefalitei de căpușă [Estrada-Pena și colab., 1999]. În România, aceasta reprezintă aproximativ 2% din totalul speciilor de căpușe având o distribuție geografică predominantă în zona de sud-vest a țării (Figura 1.3). În ceea ce privește speciile gazdă, principalele specii parazitare de *H. punctata* sunt rumegătoarele domestice și sălbatice, însă au fost descrise ca gazde și carnivorele, aricii, rozătoarele și păsările. În România,

gazdele cel mai frecvent parazitare sunt mamiferele domestice [Mihalca și colab., 2012a].

În țara noastră există un număr limitat de informații privind prevalența agenților patogeni în căpușele *H. punctata*, până în prezent nefiind raportate căpușe infectate [Briciu și colab., 2014].

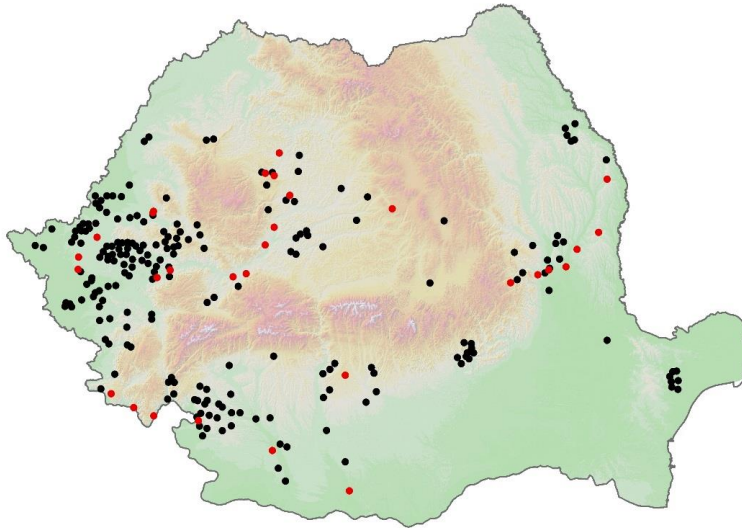


Figura 1.3 Distribuția căpușelor nehrănite *H. punctata* pe teritoriul României

● Zonele cunoscute înainte de 2012; ● Zone adăugate de Mihalca și colab., 2012

Figure 1.3 Geographical distribution of *H. punctata* questing ticks in Romania

● Sites known before 2012; ● Sites added by Mihalca et al., 2012
[Mihalca și colab., 2012a]

1.2.3 *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus reprezintă specia clasată pe locul secund din punctul de vedere al abundenței în Europa centrală [Rubel și colab., 2016]. Stadiile imature parazitează mamiferele mici ce trăiesc în vizuini iar căpușele adulte se hrănesc pe mamifere mari. Rareori atacă oameni, dar poate menține și distribui agenți patogeni către gazde–rezervor natural [Mierzejewska și colab., 2015]. Această specie are o importanță deosebită în domeniul veterinar și cel uman, datorită capacității de a transmite o mare varietate de microorganisme patogene. Reprezintă vectorul principal pentru *Babesia canis*

dar poate vectoriza și agenți bacterieni precum specii ale genului *Rickettsia* și *Coxiella burnetii* iar din categoria virusurilor, *D. reticulatus* poate fi implicat în transmiterea virusului encefalitei de căpușă. Totuși, sunt necesare investigații suplimentare pentru a determina rolul speciei *D. reticulatus* în menținerea și transmiterea acestor agenți patogeni.

Dermacentor reticulatus este o specie ditrofică: stadiile imature sunt endofile, locuind în vizuinele gazdelor (rozătoare, insectivore, iepuri) iar adulții sunt exofili, așteptându-și gazdele în habitate deschise, în zona de luncă cu arbuști sau pajiști de la marginea pădurilor. Habitatul favorit al speciei *D. reticulatus* se află în apropierea luncilor periodic inundate, de-a lungul albiilor râurilor [Mierzejewska și colab., 2016].

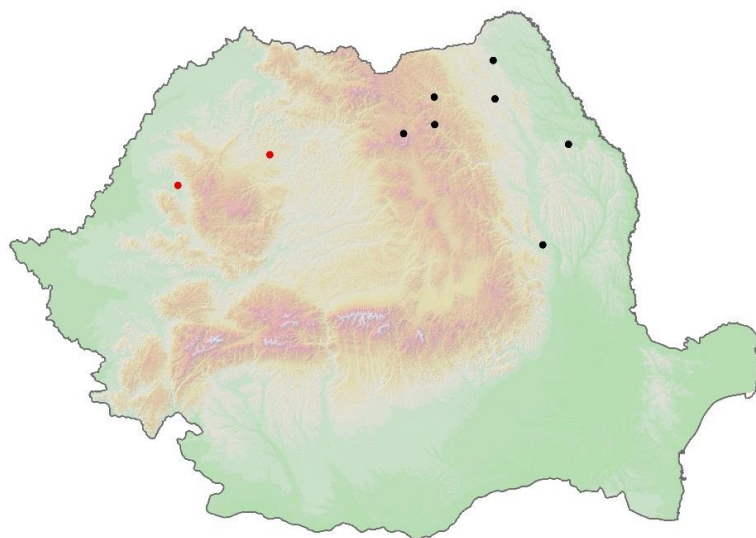


Figura 1.4 Distribuția căpușelor nehrănite *D. reticulatus* pe teritoriul României

● Zonele cunoscute înainte de 2012; ● Zone adăugate de Mihalca și colab., 2012

Figure 1.4 Geographical distribution of *H. punctata* questing ticks in Romania

● Sites known before 2012; ● Sites added by Mihalca et al., 2012
[Mihalca și colab., 2012a]

Aria de distribuție a acestei specii urmează un proces de expansiune pe latitudine și altitudine la nivel european, în special în Germania, Polonia, Ungaria și Slovacia. În România, prevalența căpușelor nehrănite *D. reticulatus* a fost estimată la 0.02%, studiile recent efectuate nereușind să confirme această expansiune (Figura 1.4) [Mihalca și colab., 2012a].

Ciclul biologic al speciei *D. reticulatus* se află încă sub semnul întrebării, acest lucru fiind datorat comportamentului ascuns manifestat de larve și nimfe. Deși necesită trei gazde pentru a completa ciclul biologic (Figura 1.5), larvele și nimfele *D. reticulatus* au un comportament nidicol în timp ce adulții sunt exofili. Aceste caracteristici se transpun printr-o lipsă a stadiilor imature ca urmare a colectării prin metoda drapelului. În schimb, adulții sunt ușor de colectat prin această metodă, în locurile unde au o densitate mare. În zonele de climă temperată ale Europei, larvele se pot găsi pe gazde (mamifere mici) în lunile mai și iunie, având abundența maximă în iunie și iulie. *D. reticulatus* prezintă o rată de dezvoltare mult mai rapidă comparativ cu cea a speciei *I. ricinus*, având însă și o rată scăzută a mortalității. Larvele hrănite năpârlesc și devin nimfe în mai puțin de o lună iar în condiții naturale întreaga generație este completă în doar câteva luni.

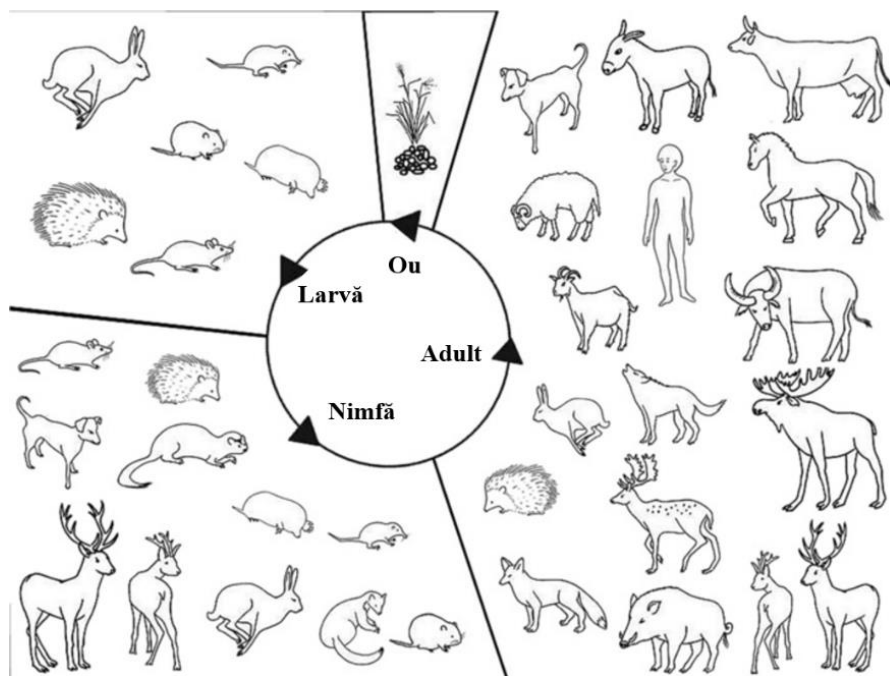


Figura 1.5 Ciclul biologic al speciei *Dermacentor reticulatus*

Figure 1.5 *Dermacentor reticulatus* life cycle

[după Foldvari si colab., 2016]

Adulții sunt activi începând cu luna martie cu un vârf în aprilie prezentând o abundență scăzută pe durata verii și înregistrând un alt vârf al activității în septembrie-octombrie. În timpul iernii, căpușele se află în diapauză, stare caracterizată printr-o activitate metabolică redusă, mediată

neurohormonal. Adulții *D. reticulatus* revin la starea activă relativ devreme, după diapauza de iarnă, acest aspect asociindu-se cu rezistența lor la temperaturi scăzute. Adulții preferă să se hrănească pe mamifere de dimensiuni medii și mari și au tendința de a se hrăni sub formă de grupuri, producând astfel leziuni vizibile macroscopic (Figura 1.5).

1.3 INFLUENȚA FACTORILOR BIOTICI ȘI ABIOTICI ÎN DISTRIBUȚIA ȘI DENSITATEA CĂPUȘELOR

Expansiunea bolilor transmise de căpușe se realizează datorită contribuției unor factori biotici și abiotici complecși, ce influențează distribuția și abundența căpușelor ixodide predominante și care, au un impact major în dinamica agenților patogeni transmiși de această categorie de artropode [Medlock și colab., 2013]. Schimbările climatice sunt considerate o cauză primară pentru expansiunea geografică a căpușelor și intensitatea infecțiilor cauzate de acestea. Spre exemplu, emergența encefalitei de căpușă, a babesiozei umane și a anaplasmozei granulocitare în America de Nord și în Europa s-a realizat concomitent cu tendința de încălzire globală. Cu toate acestea, creșterea incidenței și a distribuției trebuie corelată și cu alte cauze potențiale, cum ar fi: modificările antropogene (fragmentarea habitatelor, urbanizarea, defrișările și înființarea de păduri, utilizarea diferită a terenurilor), ce nu s-au regăsit sub un impact evident al schimbărilor climatice.

Ambele componente (biotică și abiotică), din cadrul habitatelor influențează distribuția populațiilor de căpușe. Deoarece tipul de vegetație are influență asupra prezenței și a mișcării speciilor-gazdă, este de așteptat ca acestea să intervină și în prezența, densitatea sau persistența speciilor de căpușe și în probabilitatea de a găsi o gazdă. Anumite căpușe sunt asociate unui microclimat specific și unor anumite condiții de habitat ce sunt caracterizate printr-o serie de variabile, cum ar fi umiditatea, temperatura și durata zilei lumină. Referitor la rata de infecție a căpușelor cu agenți patogeni, există studii ce prezintă corelarea acestora cu densitatea și susceptibilitatea celor mai importante gazde ale căpușelor, rata lor de infecție, durata infecției și statusul imun al acestor gazde [Speck și colab., 2013, Trout Fryxell și colab., 2015].

Gazdele susceptibile se pot comporta ca niște factori de dispersie ai agenților patogeni, în special păsările migratoare, ce pot fi responsabile de introducerea de noi agenți patogeni în zone cunoscute anterior drept indemne. Păsările pot traversa bariere ce ar opri în mod normal mamiferele (munți, deșert, oceane, garduri), se pot deplasa mai rapid și au un potențial mai mare de dispersie a căpușelor comparativ cu mamiferele și reptilele [Hasle, 2013]. În

2008, Ogden și colab. au studiat influența migrării nordice a păsărilor migratoare în expansiunea bolii Lyme și a anaplasmozei granulocitare umane (HGA) în aceeași direcție. Aceștia au observat prezența căpușelor pe aceste păsări; în urma testării căpușelor, au identificat diferite genospecii de *Borrelia*, unele implicate în producerea bolii la om [Ogden și colab., 2008].

CAPITOLUL II

AGENȚI PATOGENI BACTERIENI TRANSMIȘI DE CĂPUȘE

CHAPTER II

BACTERIAL TICK-BORNE PATHOGENS

2.1. *BORRELIA* spp.

Speciile genului *Borrelia* sunt spirochete adaptate la transmiterea prin artropode [Perianu, 2011a]. Spirochetele sunt microorganisme filiforme, cu dimensiuni de 15-30/0,2-0,3 μm , prevăzute cu 5-8 spirale, cu amplitudinea de 1,2-2,8 μm și prezintă mobilitate accentuată, mișcările având caracterul unor lovituri de bici. Cilindrul protoplasmic, format dintr-un strat de peptidoglicani, este înconjurat de o membrană externă fragilă. Circuitul *Borrelia* spp. în natură se desfășoară între căpușe și o mare varietate de vertebrate (diferite specii de mamifere, păsări și unele reptile) [Piesman și colab., 2004].

2.1.1 Specii patogene transmise de căpușe

De la momentul descoperirii *B. burgdorferi* în 1982, au urmat numeroase identificări a izolatelor din genul *Borrelia* de la variate specii de vertebrate, inclusiv de la om. Până de curând, la nivel mondial, doar trei specii au fost considerate drept agenți ai bolii Lyme: *B. burgdorferi* s.s. (America de Nord și Europa), *B. afzelii* și *B. garinii* (Europa și Asia). În momentul actual însă, este recunoscută și implicarea altor specii din complexul *B. burgdorferi* s.l. (Tabel 2.1). Spirochetele genului *Borrelia* sunt transmise gazdelor de către căpușele ixodide, stadiul de nimfă fiind, se pare, cel mai important. A fost sugerat faptul că speciile *Borrelia* pot avea un tropism diferit, cauzând manifestări clinice distincte [Rudenko și colab., 2011]. *Borrelia garinii* a fost frecvent identificată la pacienți cu manifestări de neuroborrelioză, această corelație fiind realizată în cadrul studiilor de serotipizare a izolatelor efectuate în Europa.

Tabel 2.1/Table 2.1

Speciile din complexul *Borrelia burgdorferi* sensu lato
Species from *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex
 [Rudenko și colab., 2011, <http://www.eucalb.com/>]

Specii <i>Borrelia</i>	Vectorul	Gazda/Rezervor natural	Distribuția geografică
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Rozătoare	Asia, Europa
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>	Păsări	SUA
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	Iepuri	SUA
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Rozătoare	Europa
<i>B. bissettii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. minor</i>	Rozătoare	Europa, SUA
<i>B. burgdorferi</i> Sensu stricto	<i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	Rozătoare, păsări, șopârle, mamifere mari	Europa, SUA
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus</i> , <i>I. jellisonii</i> , <i>I. spinipalpis</i>	șobolan Kangaroo, căprioară	SUA
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	Rozătoare, păsări	SUA
<i>B. chilensis</i>	-	-	America de Sud
<i>B. finlandensis</i>	-	-	Europa
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>I. nipponensis</i>	Păsări, șopârle, rozătoare	Asia, Europa
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Rozătoare	Japonia
<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	Rozătoare	Europa, SUA
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Rozătoare, șopârle	Europa, Nordul Africii
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	Rozătoare	China
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	Necunoscută (probabil câini și pisici)	Japonia
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Păsări	Japonia
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	Rozătoare	Europa
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. granulatus</i>	Păsări, șopârle	Asia, Europa
<i>B. yangtze</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>I. granulatus</i>	Rozătoare	China

În schimb, *B. burgdorferi* s.s. determină frecvent artrite la pacienții infectați, acestea fiind cel mai important simptom musculoscheletic. *B. afzelii* determină la om în principal leziuni ale pielii, având un tropism cutanat [Rudenko și colab., 2011].

Deși anterior s-a considerat că *B. valaisiana* nu este patogenă pentru om, recent a fost asociată simptomelor cu evoluție cronică și în infecțiile manifestate prin eritem migrator (EM). Mai mult, *B. lusitaniae* a fost izolată în Portugalia de la un pacient iar analiza moleculară a arătat o distribuție clinică diferită de alte specii ale genului *Borrelia*. De asemenea, s-a confirmat rolul *B. spielmanii* drept agent al bolii Lyme, ca urmare a cazurilor apărute în Olanda, Germania, Ungaria și Slovenia [Rudenko și colab., 2011].

Borrelia miyamotoi este o spirochetă din cadrul grupului febrei recurente, transmisă de aceleași căpușe ixodide ce transmit și agenții bolii Lyme. A fost descrisă inițial în anul 1994 în căpușele *Ixodes persulcatus* din Japonia. Aceasta infectează cel puțin șase specii de căpușe *Ixodes* din America de Nord și Eurasia, având ca rezervor natural diferite specii de rozătoare mici și păsări. În 2015 a fost descrisă pentru prima dată în România, fiind identificată prin teste de biologie moleculară în căpușele *questing* colectate din nordul și centrul țării [Kalmar și colab., 2016].

2.1.2 Transmitere și rezervor natural

Căpușele sunt principalii vectori ai genului *Borrelia*. Cele mai importante specii de căpușe implicate în transmiterea *B. burgdorferi* s. l. la om sunt *I. scapularis* (estul Americii de Nord), *I. persulcatus* (jumătatea nordică a Asiei), *I. pacificus* (Vestul Americii de Nord) și *I. ricinus* (Europa) [Parola și colab., 2001b]. Căpușele preiau borreliile în timpul hrănirii cu sânge pe gazdele infectate sau prin co-hrănire, proces ce semnifică inocularea spirochetelor în circulația sanguină a gazdei de către o căpușă infectată și preluarea patogenilor din sânge de către o căpușă neinfectată, ce se hrănește în imediata apropiere. Borreliile rămân inactive în intestinul mijlociu al căpușei pe durata năpârlirii. În stadiul următor, spirochetele diseminează rapid către toate organele, inclusiv glande salivare, de unde speciile de *Borrelia* sunt apoi transferate vertebratelor. Transmiterea transovariană a spirochetelor este rară.

Numeroase specii de animale sunt rezervor pentru *B. Burgdorferi* s. l., fiind reprezentate în principal de mamifere mici sălbatice și păsări, acestea neavând manifestări clinice ca urmare a infecției cu spirochete. Este foarte dificil de determinat întreg spectrul gazdelor rezervor sau capacitatea relativă a uneia sau mai multor specii vertebrate de a deține această caracteristică. În America de Nord, speciile genului *Borrelia* au fost detectate la un număr mare de specii de mamifere și păsări, cea mai competentă gazdă-rezervor fiind specia de șoareci *Peromyscus leucopus* [Kybicova, 2010].

2.1.3 Stadiul cunoașterii în România

În România, numeroase studii au raportat prezența agenților patogeni în căpușele nehrănite (*questing*). Interesul cel mai mare l-a suscitat *Borrelia burgdorferi* s.l. ca urmare a impactului pentru sănătatea publică. Studiile efectuate până în prezent au relevat o prevalență medie mai mică a *B. burgdorferi* s.l. în căpușele *I. ricinus* comparativ cu media europeană [Rauter și colab., 2005]. În urma testării unui număr mai mare de căpușe *questing* (~12.000), colectate din 183 de localități din toate județele, a fost estimată o prevalență globală de 1.4% [Kalmar și colab., 2013]. Un alt studiu, ce a cuprins trei județe din sudul și centrul țării, a semnalat o prevalență de 18% pentru agentul bolii Lyme [Coipan și colab., 2011]. *B. burgdorferi* s.l. a fost de asemenea identificată în căpușe *I. ricinus* colectate de pe diferite specii gazdă: șopârle [Majláthová și colab., 2008], cai [Ionita și colab., 2013], arici [Dumitrache și colab., 2013] și om [Briciu și colab., 2014]. Există și raportări privind identificarea *B. burgdorferi* s.l. în țesuturile carnivorelor mustelide sălbatice [Gherman și colab., 2012] și a vulpilor [Dumitrache și colab., 2015]. Genospeciile identificate mai frecvent în cadrul acestor studii au fost *B. afzelii*, *B. garinii* și *B. burgdorferi* sensu stricto. Recent, Kalmar și colab., 2016, au raportat pentru prima dată infecția cu *B. miyamotoi* în căpușele *I. ricinus* nehrănite din centrul și nordul țării. În România există zone cu un risc crescut de infecție, acestea asigurând condițiile optime de dezvoltare a căpușelor *I. ricinus*. De asemenea, în aceste zone, localizate în sudul, estul și sud-estul României, boala Lyme prezintă un caracter endemic [Kalmar și colab., 2013]. Centrul Național de Supraveghere și Control al Bolilor Transmisibile (CNSCBT) emite, începând cu anul 2010, rapoarte anuale cu privire la situația epidemiologică a bolii Lyme la om. Media anuală a cazurilor confirmate de boală Lyme la oameni, în perioada 2010-2014 a fost de 340 cazuri.

2.2 RICKETTSIA spp.

Genul *Rickettsia* este cel mai de seamă reprezentant al familiei Rickettsiaceae [Guillemi și colab., 2015]. Membrii acestui gen sunt bacterii obligatoriu intracelulare și, conform clasificării moderne, sunt structurați în patru grupuri:

- I. Grupul ancestral (AG)
- II. Grupul tifosului (TG)
- III. Grupul febrei pătate (SFG)
- IV. Grupul tranzitoriu (TRG)

Tabel 2.2/Table 2.2

Clasificarea, vectorii și rezervorul natural al rickettsiilor patogene
Classification, vectors and reservoir hosts for pathogenic *Rickettsia*
 [CDC, 2016]

GRUP ANTIGENIC	INFECȚIA LA OM	SPECIA	VECTOR	REZERVOR NATURAL	DISTRIBUTIA GEOGRAFICĂ
Grupul Febrelor Pătate	Rickettsiosis	<i>R. aeschlimannii</i>	Căpușa	Necunoscut	Africa de Sud, Maroc, litoral mediteranean
	African Tick-bite fever	<i>R. africae</i>	Căpușa	Rumegătoare	Africa SubSahariană, Indiile de Vest
	Rickettsialpox	<i>R. akari</i>	Furnica	Șoarece de casă, Rozătoare	Fostele țări ale Uniunii Sovietice, Africa de Sud, Coreea de Sud, Turcia, țările din Balcani, America de Nord și Sud
	Queensland Tick typhus	<i>R. australis</i>	Căpușa	Rozătoare	Australia, Tazmania
	Mediterranean spotted fever / Febra botunoasă	<i>R. conorii</i>	Căpușa	Câini, Rozătoare	Sudul Europei, sudul și vestul Asiei. Africa, India
	Cat flea rickettsiosis	<i>R. felis</i>	Purice	Pisici, Rozătoare	Europa, America de Nord și Sud, Africa, Asia
	Far Eastern spotted fever	<i>R. heilongjiangensis</i>	Căpușa	Rozătoare	Estul îndepărtat al Rusiei, Nordul Chinei, estul Asiei
	Aneruptive fever	<i>R. helvetica</i>	Căpușa	Rozătoare	Centrul și nordul Europei, Asia
	Flinders Island spotted fever, Thai Tick typhus	<i>R. honei</i> , including strain "marmionii"	Căpușa	Rozătoare, reptile	Australia, Thailanda
	Japanese spotted fever	<i>R. japonica</i>	Căpușa	Rozătoare	Japonia
	Mediterranean spotted fever-like disease	<i>R. massiliae</i>	Căpușa	Necunoscut	Franța, Grecia, Spania, Portugalia, Elveția, Sicilia, centrul Africii, Mali
	Mediterranean spotted fever-like illness	<i>R. monacensis</i>	Căpușa	Șopârle, posibil păsări	Europa, Nordul Africii
	Maculatum infection	<i>R. parkeri</i>	Căpușa	Rozătoare	Nordul și sudul Americii
	Tick-borne lymphadenopathy, Dermacentor-borne necrosis and lymphadenopathy	<i>R. raoultii</i>	Căpușa	Necunoscut	Europa, Asia

Tabel 2.2/Table 2.2 (Continuare/Continuation)

GRUP ANTIGENIC	BOALA	SPECIA	VECTOR	REZERVOR NATURAL	DISTRIBUTIA GEOGRAFICA
Grupul Febrelor Pătate	Rocky Mountain spotted fever, Brazilian spotted fever, febre maculosa, Sao Paulo exanthematic typhus, Minas Gerais exanthematic typhus	<i>R. rickettsii</i>	Căpușa	Rozătoare	America de Nord, Centrală și de Sud
	North Asian Tick typhus, Siberian Tick typhus	<i>R. sibirica</i>	Căpușa	Rozătoare	Rusia, China, Mongolia
	Lymphangitis-associated rickettsiosis	<i>R. sibirica - mongolotimonae</i>	Căpușa	Rozătoare	Sudul Franței, Portugalia, China, Africa
	TIBOLA, DEBONEL	<i>R. slovaca</i>	Căpușa	Lagomorfe, Rozătoare	Sudul și Estul Europei, Asia
Febra tifică	Epidemic typhus, sylvatic typhus	<i>R. prowazekii</i>	Păduchi de corp, ectoparaziți ai veveritelor, posibil unele Căpușe	Om, veverițe	Africa Centrală, Asia, America de Nord, Centrală și de Sud
	Murine typhus	<i>R. typhi</i>	Purice	Rozătoare	Zonele Tropicale și subtropicale

Grupul febrei pătate (SFG) cuprinde numeroase specii patogene (*R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. parkeri*, *R. massilliae*) în timp ce grupul tifosului (TG) este reprezentat de către *R. typhi* și *R. prowazekii* (Tabel 2.2). Grupul ancestral (AG) conține două specii, *R. bellii* și *R. canadensis*, acestea fiind clasate ca nepatogene. Cel de-al patrulea grup (TRG) este format din speciile *R. akari*, *R. australis* și *R. felis* [Guillemi și colab., 2015, Parola și colab., 2013].

Numeroase specii de rickettsii sunt responsabile de producerea infecției la om, acestea fiind transmise de căpușele Ixodidae. Bacteriile *R. typhi* și *R. prowazekii* nu sunt transmise de căpușe, ci sunt vectorizate în principal de păduchi și purici [Guillemi și colab., 2015].

2.2.1 Specii patogene transmise de căpușe

Rickettsia spp. transmise de căpușe sunt responsabile de infecțiile rickettsiale din Europa. Înainte de introducerea în clinica practică a metodelor de biologie moleculară, diagnosticul se efectua numai pentru febra pătată mediteraneană (MSF). S-a suspectat apoi posibilitatea ca alți agenți, diferiți de *Rickettsia conorii* subsp. *conorii*, să fie responsabili de producerea rickettsiozelor. În momentul de față, există un spectru extins al rickettsiozelor transmise de căpușe și include diverse specii ce determină manifestări similare febrei pătate mediteraneene (*Rickettsia helvetica* și *Rickettsia monacensis* – transmise de *Ixodes ricinus*; *Rickettsia massiliae*-transmisă de complexul *Rhipicephalus sanguineus*; *Rickettsia aeschlimannii*-transmisă de *Hyalomma* spp.) [Portillo și colab., 2015]. *Dermacentor marginatus* și *D. reticulatus* sunt considerate specii rezervor pentru *R. slovacica* și *R. raoultii*, aceste rickettsii fiind menținute prin intermediul transmiterii transstadiale și transovariene. Acest aspect sugerează o distribuție geografică a rickettsiilor similară căpușelor din genul *Dermacentor* [Parola și colab., 2009].

2.2.2 Transmitere și rezervor natural

Căpușele ixodide sunt principalii vectori pentru rickettsiile SFG (Figura 2.1); aceste bacterii sunt capabile să infecteze și să se multiplieze în aproape toate organele căpușelor. De asemenea, pot fi transmise transovarian cel puțin către un anumit număr de ouă de la femelele infectate. Procentul de ouă infectate provenite de la femele ale aceleași specii și infectate cu același agent patogen poate varia, depinzând de factori ce vor trebui elucidati. În momentul în care un ou devine infectat, poate avea loc transmiterea transstadială (de la larve către nimfe și apoi către adulți). Aceasta reprezintă o componentă necesară a capacității vectoriale a căpușelor ținând, cont că se hrănesc o singură dată pe durata fiecărui stadiu.

Rickettsiile ce infectează glandele salivare pot fi transmise către vertebratele gazdă în timpul hrănirii. Așadar, ținând cont de faptul că toate cele trei stadii pot provoca infecții gazdelor vertebrate susceptibile, căpușele sunt privite ca fiind principalul rezervor pentru numeroase rickettsii SFG [Brouqui și colab., 2007, Raoult și colab., 1997].

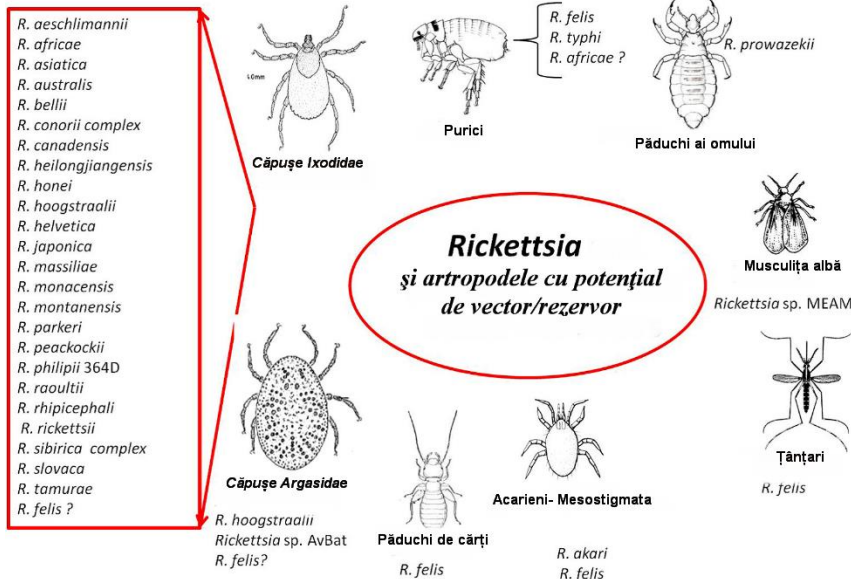


Figura 2.1 Artropodele vector pentru speciile din genul *Rickettsia*
Figure 2.1 Arthropod vectors of *Rickettsia* spp. [după Merhej și colab., 2014]

2.2.3 Stadiul cunoașterii în România

Cazuri provocate de febra pătată mediteraneană în România au fost raportate încă din 1910, primul episod fiind descris în 1948 în zona Bucureștiului și în Dobrogea. *Rickettsia conorii* (agentul etiologic al MSF) are o evoluție endemică în sudul României, fiind identificate cazuri de infecție la om prin efectuarea de studii serologice [Pitigoi și colab., 2013, Serban și colab., 2013]. În 2009 a fost raportată o incidență generală de 0.7/100.000 locuitori, în unele zone atingând valori de 20/100.000 locuitori pe an. Totuși, în ultimul deceniu s-a observat un trend descendent a incidenței MSF [Pitigoi și colab., 2013]. Majoritatea cazurilor înregistrate apar în sud-estul țării, în concordanță cu distribuția și dinamica căpușelor vector [Serban și colab., 2009]. *Rhipicephalus sanguineus*, vectorul competent al speciei *R. conorii*, este o specie bine adaptată mediului urban, ce poate trăi în contact strâns cu omul [Parola și colab., 2008]. Această căpușă are o prevalență ridicată în sud-estul țării fiind identificată parazitând câini, vaci, oi și poate fi întâlnită de asemenea pe animale sălbatice din depresiuni [Mihalca și colab., 2012a]. Identificarea moleculară a *R. conorii* în căpușele *Rh. sanguineus* a fost raportată în cadrul unui singur studiu realizat în sud-estul României de către Ioniță și colab., în 2016, agentul etiologic al MSF fiind detectat într-o căpușă adultă colectată de pe un câine. Se știe faptul că factorii abiotici pot influența riscul de infecție a oamenilor cu

agentul MSF, ca urmare a relației strânse dintre *R. conorii* și căpușa vector. Odată cu procesul de încălzire, *Rh. sanguineus* se poate atașa de gazde, altele decât câinele, manifestând o exacerbare a comportamentului de parazitare [Parola și colab., 2008]. La nivel global, *Rh. sanguineus* a devenit una din cele mai răspândite specii datorită hrănirii specializate și a hrănirii pe câini ce trăiesc atât în zone urbane cât și rurale și care sunt adaptați pentru a trăi în case [Dantas-Torres, 2010]. Acest comportament ar putea crește de asemenea riscul de infecție a omului cu agenți patogeni ai genului *Rickettsia*, în special pentru persoanele aflate în imediata apropiere a câinilor.

Febra pătată mediteraneană a fost, până nu demult, singura rickettsioză umană diagnosticată de clinicieni [Zaharia și colab., 2016]. În 2016, Zaharia și colab. au descris patru cazuri pozitive cu *Rickettsia* spp. Două cazuri au prezentat sindromul SENLAT (scalp eschar and neck lymphadenopathy syndrome) iar alte două au fost pozitive pentru febra pătată (diagnosticul s-a stabilit prin teste serologice iar pentru confirmare s-a efectuat Western Blot). În ceea ce privește speciile identificate, pacienții cu febră pătată au fost pozitivi pentru infecția cu *R. masiliae* iar pacienții cu sindrom SENLAT au ieșit pozitivi la infecția cu *R. slovaca* și *R. raoultii*.

În Europa, *R. masiliae* a fost identificată în căpușe *I. ricinus* și numeroase specii ale genului *Rhipicephalus*, având o prevalență ridicată. Deocamdată, au fost raportate puține cazuri la om determinate de această specie [Cascio și colab., 2013, Chochlakis și colab., 2015, Garcia-Garcia și colab., 2010, Parola și colab., 2008, Vitale și colab., 2006]. În România, infecțiile provocate de *R. masiliae* sunt probabil diagnosticate greșit drept febră pătată mediteraneană [Zaharia și colab., 2016].

Dermacentor marginatus și *D. reticulatus* reprezintă gazde rezervor pentru *R. slovaca* și *R. raoultii*, acestea fiind menținute în căpușe ca urmare a transmiterii transstadiale și transovariene. Așadar, distribuția geografică a acestor specii de rickettsii ar trebui să corespundă cu cea a căpușelor *Dermacentor* [Parola și colab., 2009]. *R. slovaca* face parte din grupul febrilor pătate și a fost încadrată ca agent patogen pentru om în anul 1997. Este responsabilă pentru producerea sindromului TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy), denumit și DEBONEL (*Dermacentor*-borne necrosis erythema and lymphadenopathy). Acest sindrom se caracterizează printr-o mușcătură a căpușei, însoțită de o escară în regiunea scalpului. Apare, de asemenea și limfadenopatia cervicală [Parola și colab., 2009]. În România, *R. slovaca* a fost identificată în căpușe *Dermacentor* colectate de pe gazde. În anul 2013, Ioniță și colab. au raportat o prevalență de 12.5% a *R. slovaca* în căpușele *D. marginatus* colectate de pe vaci din sudul țării. De asemenea, căpușele *D.*

reticulatus colectate de la câini aflați într-o zonă urbană din sud-estul țării au avut o rată a infecției de 3% pentru această specie [Ionita și colab., 2016].

Specia *R. raoultii* reprezintă un agent patogen recent identificat [Mediannikov și colab., 2008] și încadrat în grupul febrilor pătate [Parola și colab., 2009] fiind identificat în căpușele *D. reticulatus* și *D. marginatus* din Europa [Parola și colab., 2005]. A fost de asemenea detectat în România, în căpușe *D. marginatus* colectate de pe vaci și oi (rata de infecție – 8.3%) și *D. reticulatus* colectate de pe câini (rata de infecție–16%) [Ionita și colab., 2013]. Incidența *R. slovacă* și *R. raoultii* probabil este subestimată, luând în considerare faptul că specia *D. marginatus* are o distribuție geografică largă, poate parazita variate specii gazdă și este considerată a doua cea mai abundentă specie din România [Mihalca și colab., 2012a]. Pentru stabilirea prevalenței reale a infecției cu acești agenți în căpușe, sunt necesare noi studii efectuate pe un număr suficient de probe și din zone cât mai reprezentative. Determinarea ratei de infecție în căpușe *questing* va fi importantă pentru a evita o posibilă supraestimare a prevalenței în căpușele colectate de pe gazde [Sándor și colab., 2014].

În urma aplicării tehnicilor de biologie moleculară, în România au fost identificate specii potențial patogene din genul *Rickettsia*. Astfel, au fost identificate cu succes două specii, *R. helvetica* și *R. monacensis* în căpușe colectate de pe gazde. *R. helvetica* a fost detectată în căpușe *I. ricinus* colectate de pe căprioare din estul României, cu o prevalență de 7.4% [Paduraru și colab., 2012]. În 2016, un studiu a raportat în căpușe colectate de pe păsări migratoare din Delta Dunării, prezența a patru specii ale genului *Rickettsia*. Cele patru specii sunt: *Rickettsia monacensis*, *R. helvetica*, *R. massiliae* și *R. slovacă*, cea mai prevalentă fiind *R. monacensis* [Mărcușan și colab., 2016].

Potențialul patogen al *R. helvetica* este momentan necunoscut, dar a fost suspectată în cazuri de pericardită acută, infecții febrile și sarcoidoză [Nilsson și colab., 1999, Nilsson și colab., 2010, Svendsen și colab., 2011]. La nivel european prezența acestei specii a fost semnalată în țări precum Franța, Elveția, Croația, Italia, Germania, Olanda, Portugalia, Polonia, Ungaria, Danemarca și Suedia [Wood și colab., 2012]. *R. helvetica* este vectorizată de *I. ricinus* infecția fiind menținută ca urmare a transmiterii transstadiale și transovariene [Sprong și colab., 2009]. Prezența sa a fost de asemenea semnalată în căpușele *D. reticulatus* [Dobec și colab., 2009]. Gazdele cu rol de rezervor pentru acest agent sunt cel mai probabil mamiferele mari, deși ADN-ul specific *R. helvetica* a fost identificat și la șoareci și mistreț [Inokuma și colab., 2008, Nielsen și colab., 2004, Sprong și colab., 2009]. Luând în considerare larga distribuție a speciei *I. ricinus* în România, putem anticipa o răspândire mai

largă a acestui patogen; cercetări viitoare, efectuate la o scară națională, ar putea elucida aceste presupuneri.

Rickettsia monacensis a fost identificată în căpușe colectate de pe gazde din sudul și estul României. În 2012, Păduraru și colab. au testat, prin metode de biologie moleculară, căpușe *I. ricinus* colectate de pe căprioare și capre domestice. ADN-ul specific agentului patogen a fost identificat în 6.1% din căpușele testate. Prezența acestei specii de rickettsia în sudul țării a fost demonstrată în cadrul a două studii: primul studio, realizat în 2013, a obținut o rată a infecției de 15.6% în căpușele *I. ricinus* colectate de pe vaci [Ionita și colab., 2013]; cel de-al doilea studiu a identificat o singură căpușă *I. ricinus* pozitivă, vectorul fiind colectat de pe un câine [Ionita și colab., 2016].

Luând în considerare aceste rezultate, este de bănuț existența și a altor rickettsii în căpușele din România. Este nevoie, așadar, de eforturi susținute pentru a caracteriza și evalua potențialul lor patogen.

2.3 BARTONELLA spp.

Membrii genului *Bartonella* sunt bacterii facultativ intracelulare, aparținând subgrupului alpha 2 din clasa *Proteobacteria*, filogenetic înrudite cu speciile *Brucella*. Fiecare specie a genului *Bartonella* prezintă abilitatea de a cauza fie infecții acute și cronice, fie manifestări proliferative sau supurative la nivel vascular. Speciile acestui gen sunt transmise predominant în urma mușcăturii unui artropod (ex.: păduchii de corp la om pentru *B. quintana* - agentul febrei Trench, purici și căpușe pentru *Bartonella henselae*) (Tabel 2.3).

Principala caracteristică a infecțiilor cu *Bartonella* spp. o reprezintă bacteriemia intraeritocitară de lungă durată ce determină apariția tardivă a simptomelor în organismul gazdă [Vayssier-Taussat și colab., 2009]. Severitatea semnelor clinice se corelează cu statusul imun al gazdei. Speciile de *Bartonella* descrise până în prezent sunt capabile să infecteze un număr redus de specii de mamifere (Tabel 2.3). Totuși, unele gazde pot fi infectate de mai multe specii de *Bartonella*. În această categorie intră pisica (*B. henselae*, *B. clarridgeiae* și *B. khoelerae*) și rozătoarele (*Myodes glareolus*, *Apodemus sylvaticus*), ce pot purta cel puțin 4 specii diferite ale genului *Bartonella*. [Vayssier-Taussat și colab., 2009].

Bartonella henselae este agentul etiologic al celei mai întâlnite zoonoze din genul *Bartonella*. Este transmisă de la pisică la om, ca urmare a zgârieturii și probabil, prin mușcătura pisicii; de asemenea poate fi transmisă în urma hrănirii puricilor sau a căpușelor infectate. Pisicile infectate cu *B. henselae* sunt aparent sănătoase. Pe baza rezultatelor serologice, la pisicile infectate natural

s-au constatat semne clinice de limfadenită și gingivită, mai ales la pisicile coinfectate cu virusul imunodeficienței feline [Cojocaru, 2014].

Tabel 2.3/Table 2.3

Speciile *Bartonella*, rezervorul natural, vectorii și infecțiile produse la om
***Bartonella* species, reservoir hosts, vectors and human infections**

[Vayssier-Taussat și colab., 2009]

Specia	Gazda	Vectorul; *suspectat	Infecția la om
<i>B. alsatica</i>	Iepure	Necunoscut	Endocardită
<i>B. australis</i>	Cangur	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. bacilliformis</i>	Om	Phlebotome, <i>Lutzomyia verrucarum</i>	Febra Oroya
<i>B. birtlesii</i>	Șoareci (<i>Apodemus</i>)	Purice	Nu a fost descrisă
<i>B. bovis</i>	Rumegătoare	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. capreoli</i>	Rumegătoare	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. chomelii</i>	Rumegătoare	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. clarridgeiae</i>	Pisici	Purici (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Boala zgârieturii de pisică
<i>B. doshiae</i>	Șoareci (<i>microtus</i>)	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. elizabethae</i>	Șobolan	Purice* (<i>Xenopsylla cheopis</i>)	Endocardită
<i>B. grahamii</i>	Șoarece de câmp	Purice (<i>Ctenophthalmus nobilis</i>)	Manifestări oculare
<i>B. henselae</i>	Pisică	Purice* (<i>Ctenocephalides felis</i>) Căpușe (<i>Ixodes ricinus</i>)	Boala zgârieturii de pisică și complicații
<i>B. koehlerae</i>	Pisică	Necunoscut	Boala zgârieturii de pisică Endocardită
<i>B. phoceensis</i>	Șobolan	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. peromysci</i>	Mamifere mici	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. quintana</i>	Om	Păduchi	Febra Trench, endocardită
<i>B. rattimasiliensis</i>	Șobolan	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. schoenbuchensis</i>	Rumegătoare	Musca* (<i>Lipoptena cervi</i>)	Nu a fost descrisă
<i>B. talpae</i>	Cârțița	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. taylorii</i>	Șoareci (<i>Apodemus</i>)	Flea (<i>Ctenophthalmus nobilis</i>)	Nu a fost descrisă
<i>B. tribocorum</i>	Șobolan	Necunoscut	Nu a fost descrisă
<i>B. vinsonii subsp arupensis</i>	Șoareci	Necunoscut	Febră+bacteriemie
<i>B. vinsonii subsp berkhoffii</i>	Câine	Căpușe*	Endocardită
<i>B. vinsonii subsp vinsonii</i>	Șoareci	Purice (<i>Trombicula microti</i>)	Febră+bacteriemie
Specii Candidate			
<i>B. melophagii</i>	Oi	<i>Melophagus ovinus</i> *	Nu a fost descrisă
<i>B. rochalimae</i>	Necunoscut	Necunoscut	Febră

2.3.1 Specii patogene transmise de căpușe

Pentru a identifica speciile de căpușe ce ar putea îndeplini rolul de vector competent pentru *Bartonella* spp., au fost efectuate numeroase anchete epidemiologice ce au vizat identificarea ADN-ului specific în căpușele studiate.

Speciile bacteriene au fost cel mai frecvent identificate prin PCR prin intermediul primerilor specifici genelor *gltA* (citratur sintază), riboflavin sintază, *groEL* (gena proteinei de șoc termic), 16S-23S intergenic spacer, gena proteinei de legare a hemului, 16S ADNr. Rezultatele obținute au indicat o prevalență cu valori cuprinse între 0.43% (căpușe *questing Amblyomma americanum* din sud-estul Statelor Unite ale Americii) și 60% (căpușe *I. ricinus* colectate de pe căprioare din Olanda). Speciile *Bartonella* identificate în căpușe diferă concomitent cu locația. Doar în Asia, căpușele au fost pozitive pentru ADN-ul speciilor *B. doshiae*, *B. rattimassiliensis* și *B. tribocorum*. *Bartonella bacilliformis* și *B. capreoli* au fost detectate numai în căpușele din Europa iar *B. vinsonii* subsp. *berkhoffi* doar în căpușele din SUA [Angelakis și colab., 2010].

2.3.2 Transmitere și rezervor natural

Chiar dacă numeroase specii din genul *Bartonella* au fost detectate în căpușele ixodide, există controverse în ceea ce privește capacitatea vectorilor de a transmite aceste bacterii gazdelor parazitare. Un studiu recent a demonstrat menținerea infecției cu *B. henselae* transstadial în căpușele *I. ricinus*, ceea ce ar permite transmiterea agentului zgârieturii de pisică către gazde. Sunt publicate și studii ce contrazic aceste concluzii, considerând neglijabil riscul transmiterii *B. henselae* de către *I. ricinus* [Tijssen-Klasen și colab., 2011]. Speciile genului *Bartonella* sunt agenți patogeni emergenți ce provoacă infecții la om. Căpușele *Ixodes* spp. pot transmite la om o gamă largă de patogeni iar din acest motiv este necesară demonstrarea capacității de vector pentru speciile patogene ale genului *Bartonella* [Cotte și colab., 2008, Dietrich și colab., 2010, Podsiadly și colab., 2007, Reis și colab., 2011, Sanogo și colab., 2003].

2.3.3 Stadiul cunoașterii în România

Genul *Bartonella* cuprinde specii patogene ce determină infecții emergente la om, fiind totodată și un presupus agent transmis de căpușe, numeroase studii demonstrând prezența diferitelor specii în căpușele *I. ricinus* [Cotte și colab., 2008, Dietrich și colab., 2010, Podsiadly și colab., 2007, Reis

și colab., 2011, Sanogo și colab., 2003]. Cu toate acestea în România nu există informații cu privire la prezența speciilor *Bartonella* în căpușe sau a cazurilor de îmbolnăviri la om. O analiză PCR efectuată pe 175 probe de căpușe *I. ricinus* a identificat nouă probe pozitive pentru *Bartonella* spp. (5.14%) însă secvențierea nu a reușit să identifice speciile prezente [Cojocaru, 2014].

2.4 ANAPLASMA spp.

Genul *Anaplasma* cuprinde bacterii obligatoriu intracelulare ce pot infecta variate tipuri de celule. Sunt transmise prin intermediul căpușelor și provoacă semne clinice de boală la diferite specii de animale și om. Speciile patogene recunoscute la momentul actual sunt *A. phagocytophilum* (anterior cunoscută ca *Ehrlichia equi*, *E. phagocytophila* și agentul ehrlichiozei granulocitare la om), *A. marginale*, *A. ovis*, *A. bovis* (anterior *E. bovis*) și *A. platys* (anterior *E. platys*) (Tabel 2.4) [Yang și colab., 2015].

2.4.1 Specii patogene transmise de căpușe

Speciile din genul *Anaplasma* sunt bacterii asociate căpușelor cu rol important pentru sistemul sanitar și veterinar, acestea determinând anaplasmoză la numeroase specii de animale și la om. *A. phagocytophilum* este o zoonoză genetic heterogenă, transmisă de căpușe din genurile *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Amblyomma*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, fiind detectată în Asia, Europa, Africa și pe continentul american. Prevalența sa variază de la o regiune la alta în funcție de expunerea la atacul căpușelor, imunitate și vârstă. Rumegătoarele domestice dezvoltă în urma infecției așa numita *febră de căpușă*, responsabilă de pierderi economice importante în nordul Europei [Atif, 2016].

Anaplasma bovis are tropism pentru monocitele diverselor specii gazdă fiind descrisă pentru prima dată la bovine, în 1936. De atunci, agentul a fost identificat la animale domestice și sălbatice din Spania, Italia, India, China, Coreea de Sud, Japonia, SUA, Brazilia, Tunisia și Africa de Sud. *A. ovis* este un important agent patogen intraeritocitar, căpușele fiind capabile să îl transmită caprelor, oilor și rumegătoarelor mici sălbatice.

Anaplasmoza ovină a fost considerată o problemă majoră pentru țările subdezvoltate, însă cercetătorii au identificat această bacterie și în țări dezvoltate precum SUA, Ungaria, Grecia, Italia, Spania, Portugalia și Turcia. În aceste țări, *A. ovis* are o distribuție focală iar schimbările climatice și păstoritul pot duce la răspândirea bacteriei [Atif, 2016].

Tabel 2.4/Table 2.4

**Speciile de *Anaplasma* responsabile de producerea infecțiilor cu
importanță medicală și veterinară [Cojocaru, 2014]
Anaplasma species responsible for medically and veterinary significant
infections**

Specii	Celule țintă	Gazda mamiferă	Vectori	Infecția provocată	Distribuția geografică
<i>A. marginale</i>	Globulele roșii	Rumegătoare	<i>I. ricinus</i> <i>R. bursa</i>	Anaplasmoza bovină	Endemică în zonele tropicale și subtropicale Mondială
<i>A. ovis</i>		Ovine, Caprine	<i>R. sanguineus</i> Tabanide	Puțin patogenă	
<i>A. centrale</i>		Bovine		Puțin patogenă	
<i>A. caudatum</i>		Bovine		Anaplasmoza bovină	
<i>A. bovis</i>	Fagocite mononucleate	Bovine	<i>H. excavatum</i> <i>R. appendiculatus</i> <i>A. variegatum</i> <i>A. cajennense</i> <i>H. truncatum</i>	Rickettsioza generală bovină	Africa, America de Sud, Iran, India
<i>A. platys</i>	Plachete	Câine	<i>R. sanguineus</i>	Trombopenia infecțioasă ciclică a câinelui	USA, Venezuela, Asia, Israel, Australia, Europa
<i>A. phago. biovar. phagocytophilum</i>	Granulocite polinucleate	Ovine Bovine Cervidee	<i>I. ricinus</i>	Febra de căpușe (ovine) Febra de pajiște (bovine)	Europa, India, Africa de Sud
<i>A. phago. biovar. Equi</i>		Ecvidee	<i>I. pacificus</i> <i>I. scapularis</i> <i>I. ricinus</i>	Anaplasmoza granulocitară ecvină	
<i>A. phago. biovar. EGH</i>		Oameni Câine Cal	<i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i> <i>I. ricinus</i> <i>I. trianguliceps</i>	Anaplasmoza granulocitară umană (HGA)	

Anaplasma marginale a fost descrisă de către Sir Arnold Theiler în eritrocitele de vacă, sub forma unor puncte marginale. Anaplasmoza bovină este provocată de *A. marginale* și caracterizată prin febră, anemie severă, paloarea mucoaselor, urină maronie, scăderea producției de lapte, avorturi, hiperexcitabilitate, scăderea greutateii și moarte în faza acută a infecției. *A. marginale* conține numeroase variante ce diferă morfologic, antigenic, din

punctul de vedere al secvențelor proteice și a modului de transmitere. *A. platys* este o alphaproteobacterie ce se multiplică în plachetele sanguine și are o distribuție globală. Afectează câinii, prin așa numita trombocitopenie infecțioasă ciclică canină. Prevalența acestui agent la câinii din Europa a fost cuprinsă între 0.4 și 70.5% [Atif, 2016].

2.4.2 Transmitere și rezervor natural

Rezervorul natural al speciei *A. phagocytophilum* nu se cunoaște cu precizie totuși bacteria a fost identificată la căprioară, mistreț, muflon, elan suedez, păsări, mamifere mici (șobolani, șoareci, veverițe etc), mamifere insectivore (arici) și reptile. Căpușele ixodide sunt responsabile de transmiterea agentului, specia *I. ricinus* fiind principalul vector în Europa. Numeroase alte specii sunt capabile de a vectoriza *A. phagocytophilum*, însă până în acest moment, competența vectorială a fost demonstrată doar pentru speciile *I. ricinus*, *I. pacificus*, *I. scapularis* și *I. spinipalpis*.

Anaplasma bovis a fost detectată cu precădere la vaci și capre, aceste două specii fiind și rezervorul natural. Bacteria a mai fost identificată în infecții produse la bivol, câine, căprioară, raton, iepure etc [Atif, 2016]. Cele mai importante specii de căpușe capabile să transmită infecția sunt: *Haemaphysalis megaspinosus*, *H. shimoga*, *H. punctata*, *H. longicornis*, *H. leporispalustris* și *Rhipicephalus sanguineus*. *A. ovis* este transmisă de către specii de căpușe moi și dure (*R. bursa*, *Dermacentor andersoni*, *R. turanicus*, *Ornithodoros lahorensis*) în ultimii ani fiind descrisă în numeroase țări de pe glob (Ungaria, Grecia, Italia, Spania, Portugalia, SUA, Turcia, Iran, Irak, Tunisia, Sudan, Kenya, Pakistan, India, China și Coreea de Sud).

Agentul etiologic al anaplasmozei bovine, *A. marginale*, este distribuit în toată lumea, cu precădere în regiunile tropicale și subtropicale, fiind transmis de 17 specii de căpușe. *Rhipicephalus microplus* este vectorul major în țări precum India, Africa de Sud, Brazilia, Malaezia și Australia. *I. ricinus* reprezintă principalul vector din Europa iar în America de Nord domină *D. andersoni*, *D. variabilis* și *D. albipictus*. *A. platys* este transmisă în Europa și pe tot globul de către specia *R. sanguineus* însă, deocamdată, nu a fost demonstrată transmiterea experimentală [Atif, 2016].

2.4.3 Stadiul cunoașterii în România

În România au fost efectuate numeroase studii ce au vizat identificarea speciilor *Anaplasma* în căpușe sau la animale. Specia cel mai des studiată în

România a fost *A. phagocytophilum*, până la momentul actual nefiind raportate cazuri de anaplasmoză granulocitară la om. Prevalența *A. phagocytophilum* în căpușe *questing* a fost stabilită în cadrul a două studii. Matei și colab. 2015, au raportat o prevalență de 3.4% în urma testării prin tehnici de biologie moleculară a peste 10.000 căpușe *I. ricinus* colectate din 113 puncte și 40 de județe. Recent, a fost stabilită o prevalență similară în căpușele colectate din nordul și centrul țării [Matei și colab., 2015]. Studii similare din Europa, ce au urmărit identificarea speciei *A. phagocytophilum* în căpușe *questing*, au înregistrat o rată a infecției asemănătoare cu cea obținută în România [Coipan și colab., 2013, Egyed și colab., 2012, Richter și colab., 2012, Strle. 2004, Stuen și colab., 2013].

Anaplasma phagocytophilum a fost descrisă în căpușe colectate de la țestoase [Pastiu și colab., 2012], căprioare și capre domestice [Paduraru și colab., 2012], vaci și cai din sud-estul țării [Ionita și colab., 2013]. Au fost efectuate cercetări pentru a detecta agentul anaplasmozei granulocitare umane și în țesuturile animalelor. *Anaplasma phagocytophilum* a fost identificată la arici [Dumitrache și colab., 2013], mistreți [Kiss și colab., 2014], păsări migratoare [Mărcuțan și colab., 2014] și vulpi [Dumitrache și colab., 2015].

2.5 CANDIDATUS NEOEHRlichia MIKURENSIS

Unul din cei mai recentți agenți patogeni identificați, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (C. N. mikurensis), este o bacterie Gram negativă, responsabilă de îmbolnăvirea unui număr mare de persoane la nivel european. Este încadrată în familia Anaplasmataceae, fiind o bacterie cu localizare obligatoriu intracelulară. Se pare că prezintă o afinitate pentru endotelii, aspect suspiciat pe baza simptomelor apărute la pacienții infectați (anevrism, complicații tromboembolice, hemoragii subcutanate și leziuni eritematoase) [Richter și colab., 2012]. Prima descriere a acestui agent patogen s-a realizat în 2004 (Japonia), după ce a fost identificat în specia *Ixodes ovatus* și izolat de la șobolani (*Ratus norvegicus*). Mai târziu, s-a remarcat faptul că bacteria fusese detectată anterior în căpușe *I. ricinus* din Olanda dar că la momentul respectiv s-a considerat a fi o specie similară genului *Ehrlichia*. Primul caz de boală la om a fost descris în Suedia (2010). În Europa, până în 2015, au fost semnalate 14 cazuri la om, fiind observate predominant la pacienții imunocompromiși. Simptomele sunt reprezentate de febră persistentă, frisoane, artralgie, mialgie, dureri de cap și fenomene tromboembolice [Labbe Sandelin și colab., 2015].

2.5.1 Transmitere și rezervor natural

Candidatus Neoehrlichia mikurensis a fost identificată în căpușe *I. ricinus* din 16 țări ale Europei, acoperind aproape întreg continentul. Prevalența generală în căpușele *I. ricinus* sau *I. persulcatus*, colectate de pe vegetație, a avut valori cuprinse între 1 și 20%. *C. N. mikurensis* a fost detectată și în alte specii de căpușe, însă majoritatea fiind colectate de pe gazde. Rolul de rezervor natural pentru acest agent par a-l îndeplini rozătoare, cercetări recente confirmând acest lucru în urma studiilor de xenodiagnostic. În Europa, *C. N. mikurensis* a fost descris la șase specii de rozătoare: *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *Myodes glareolus*, *Microtus agrestis* și *M. arvalis*, având o prevalență variabilă (8.3-52.7%). *Myodes glareolus* a fost specia cea mai frecvent infectată, cu o medie de 9.1% indivizi pozitivi. *My. glareolus* ar putea reprezenta un indicator în cadrul protocoalelor de monitorizare. Genurile *Apodemus* și *Microtus* sunt de asemenea capabile de a indica prezența *C. N. mikurensis*. ADN-ul specific bacteriei *C. N. mikurensis* a fost identificat în căpușe *I. ricinus* colectate de pe căprioară, mistreț, muflon european, oi și vaci existând astfel, posibilitatea lansării de ipoteze referitor la capacitatea acestor specii de a îndeplini rolul de rezervor natural [Silaghi și colab., 2016].

2.5.2 Stadiul cunoașterii în România

În momentul actual există un volum redus de informații legat de circulația *C. N. mikurensis* pe teritoriul României. Agentul a fost recent identificat în căpușele din România, o nimfă *I. ricinus* colectată de la un pacient fiind pozitivă. Au fost testate probe provenite de la pacient însă nu s-a reușit identificarea bacteriei [Andersson și colab., 2014]. Referitor la prevalența *C. N. mikurensis* în căpușele *questing* din România, un singur studiu a raportat în 2015 o rată a infecției de 5.3%, în urma testării a 468 căpușe *I. ricinus* [Kalmár și colab., 2015]. Până la momentul actual, nu există informații privind apariția cazurilor de boală la om. Prezența *C. N. mikurensis* în căpușele *I. ricinus* din România ar trebui să reprezinte un semnal de alarmă având în vedere faptul că este vorba despre un important agent patogen pentru om.

2.6 COINFECTII CU AGENȚI PATOGENI BACTERIENI ÎN CĂPUȘE

Există numeroase publicații ce prezintă persoane infectate concomitent cu mai mulți agenți patogeni transmiși de căpușe [Duffy și colab., 1997,

Magnarelli și colab., 1995]. Acest fenomen este de așteptat, având în vedere faptul că un număr mare de căpușe pot fi infectate cu doi sau mai mulți agenți patogeni pe care îi pot apoi transmite simultan. De asemenea, coinfecțiile pot fi detectate mai frecvent în căpușele *I. ricinus*, având în vedere gama largă de gazde pe care aceste specii se pot regăsi. Cu toate că asocierea agenților patogeni poate 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. Majoritatea acestor studii au vizat identificarea unui număr limitat de agenți patogeni [Ionita și colab., 2013, Ionita și colab., 2016, Kalmar și colab., 2013, Kalmár și colab., 2015, Matei și colab., 2015]. Prevalența coinfecțiilor în căpușele din Europa a înregistrat valori între 3.2% și 28.8% [Lommano și colab., 2012].

Asocierea mai multor agenți patogeni în căpușele *Ixodes* a fost până în acest moment raportată în SUA, Europa și Asia. Cea mai frecventă asociere în căpușele *Ixodes* din SUA a fost cea dintre *B. burgdorferi* sensu stricto, *A. phagocytophilum*, *Babesia microti* și *B. miyamotoi*. De asemenea, au fost descrise numeroase combinații de trei sau doi agenți patogeni. În Europa, asocierea agentului bolii Lyme cu *A. phagocytophilum* sau *Babesia microti* este mai puțin frecventă, deoarece ultimii doi agenți prezintă o prevalență scăzută în căpușele de pe acest continent.

Rata de infecție ridicată dar și implicațiile medicale ale asocierii dintre agenți patogeni subliniază importanța clarificării situației coinfecțiilor în căpușele *questing* din România.

CAPITOLUL III

AGENȚI PATOGENI VIRALI TRANSMIȘI DE CĂPUȘE

CHAPTER III

TICK-BORNE VIRUSES

Virusurile transmise de căpușe sunt încadrate în grupul arbovirusurilor (arthropod-borne viruses) ce infectează și se replică în celulele căpușelor, formând o conexiune intimă și specifică cu artropodul vector. Acestea sunt distribuite în șase familii virale diferite: *Asfarviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* și *Flaviviridae*. Agenții virali ai acestor familii sunt paraziți obligatoriu (similar căpușelor), având nevoie de mecanismele gazdelor pentru procesele de transcripție, translație și post-translație [Brites-Neto și colab., 2015]. Arbovirusurile reprezintă o problemă epidemiologică globală, având implicații majore asupra sănătății publice. Pentru majoritatea virusurilor transmise de căpușe, la momentul actual, nu există vaccinuri eficiente și nici substanțe terapeutice care să stopeze evoluția infecțiilor.

3.1 VIRUSUL ENCEFALITEI DE CĂPUȘĂ

Encefalita de căpușă este o zoonoză virală cauzată de un flavivirus (TBEV), transmisă în Europa de căpușe din specia *Ixodes ricinus* [Perianu, 2011b]. Encefalita de căpușă este cea mai importantă infecție cu flavivirus a sistemului nervos central la om în Europa și Rusia. Numărul total de cazuri este estimat la mai mult de 10.000 în Rusia și în jur de 3.000 de cazuri în Europa. Prima descriere a bolii la om a fost făcută în Austria, în anul 1927 iar în 1937 a fost izolat primul tip viral. În cadrul acestui virus sunt încadrate 3 subtipuri: European (TBEV-Eu), Siberian (TBEV-Sib) și Orientul Îndepărtat (TBEV-FE). Subtipul TBEV-Eu este vectorizat de *I. ricinus* iar celelalte 2 subtipuri sunt transmise de către specia *I. persulcatus*. În unele regiuni ale Siberiei și în Orientul Îndepărtat au fost asociate focarelor de TBE și alte specii de căpușe dure (*Dermacentor reticulatus*, *D. silvarum* și *Haemaphysalis concinna*) [Suss, 2011]. Unii autori, implicați în evaluarea influenței climatice asupra distribuției TBE, au prezis faptul că, datorită creșterii temperaturii din timpul verii și scăderii

umidității, se va constata progresiv o expansiune a virusului TBE și implicit a vectorului *I. ricinus* pe latitudine și altitudine. Pentru a efectua o descriere precisă a zonelor de risc și pentru prevenirea expansiunii virusului, este necesară o supraveghere atentă și o colectare frecventă a informațiilor cu privire la situația epidemiologică a TBEV.

3.1.1 Transmitere și rezervor natural

Virusul TBE circulă în cadrul unui triunghi epidemiologic ce cuprinde interacțiunea dintre virus, căpușa vector și gazdele căpușei, reușind astfel menținerea virusului în cadrul unui habitat pentru lungi perioade de timp. Căpușele pot prelua virusul prin mai multe mecanisme: (i) hrănire/co-hrănire, (ii) transmitere transovariană și probabil (iii) transmitere sexuală. Transmiterea virusului prin co-hrănire este eficientă în mod special, fiind posibilă chiar și în situația hrănirii căpușelor (infectate și neinfectate) pe o gazdă imunocompetentă; transmiterea transovariană a TBEV este considerată mai puțin eficientă.

Ixodes ricinus se hrănește pe un număr mare de specii de mamifere, păsări și reptile. Speciile gazdă ce pot susține ciclul de transmitere a TBEV sunt determinate parțial de preferințele căpușelor vector, dar și de unele preferințe ale virusului TBE. Speciile de rozătoare *Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus* și *Myodes* spp. sunt considerate un important rezervor al subtipului TBEV-Eu în Europa, *A. agrarius* și *A. peninsula* pentru subtipul TBEV-Sib în Siberia iar *Myodes rufocanus* și *Microtus arvalis* pentru subtipul TBEV-Fe în Orientul Îndepărtat. Infecțiile cu virusul TBE pot fi amplificate semnificativ ca urmare a comportamentului de agregare și hrănire a căpușelor în stadiul de larvă. După hrănirea pe gazdă, larvele se desprind de aceasta, năpârlesc și devin nimfe purtătoare de virus ce pot, la rândul lor, să transmită infecția în momentul hrănirii. Căpușele adulte parazitează foarte rar rozătoarele (rezervor natural al TBEV), astfel că larvele și nimfele dețin un rol important în diseminarea virusului TBE.

Timpul scurs de la o generație la alta pentru căpușele *I. ricinus* poate fi cuprins între doi și șase ani (trei ani în mod obișnuit) iar în tot acest interval virusul poate fi transmis de către cele trei stadii de dezvoltare. Transmiterea infecției între căpușe ca urmare a co-hrănirii se poate realiza în lipsa unei stări de viremie a gazdei. Astfel, dacă diferite stadii ale *I. ricinus* se hrănesc aproape unele de celelalte (ex. pe urechea unui șoarece), virusul poate fi transmis direct de la căpușa infectată la cea neinfectată. În acest mod virusul este transmis direct și se poate realiza cu succes, chiar dacă animalul gazdă dezvoltă

anticorpi neutralizanți. Studii recente prezintă co-hrănirea ca fiind cea mai frecventă metodă de transmitere a TBEV [Suss, 2011].

Deși căpușele reprezintă principala cale de răspândire a virusului TBE, transmiterea prin lapte și produse din lapte a fost demonstrată pentru majoritatea membrilor acestui serocomplex. Între 1951-1952, în districtul Roznava din Slovacia, a fost înregistrat un focar de TBE ce a afectat 600 de persoane. Laptele caprelor infectate a fost incriminat ca o probabilă sursă de infecție.

Evoluția bolii este influențată atât de activitatea virusului cât și de factorii specifici gazdelor (vârstă, sex, pre-expunerea sau expunerea simultană la acțiunea altor agenți patogeni). A fost incriminată și susceptibilitatea genetică a populațiilor umane, dar genele implicate nu sunt încă cunoscute.

Cele mai multe informații despre flavivirusurile transmise de căpușe provin de la experimentele pe șoareci și alte rozătoare de laborator. Toate flavivirusurile transmise de căpușe sunt neurotrope la rozătoarele de laborator, gazdele naturale și chiar căpușele-vector, la care creierul/ganglionii reprezintă locurile de replicare favorite. Cu toate acestea, invazia sistemului nervos central a fost considerată în general un „fund de sac” pentru virus, nefiind benefică transmiterii sau perpetuării acestuia în natură. Majoritatea gazdelor naturale implicate în ciclurile de transmitere nu fac probabil infecții cerebrale [Bogovic și colab., 2015].

După transmiterea infecției de către căpușe pe cale naturală, virusul TBE se replică inițial la nivel cutanat (locul de hrănire al căpușei) și apoi în nodurile limfatice ce drenează zona. Studiile realizate pe șoareci au evidențiat faptul că neutrofilele, monocitele/macrofagele și celulele Langerhans atrase la zona mușcăturii de căpușă sunt infectate. La animalele care dezvoltă o viremie evidentă, virusul este transportat pe cale limfatică spre ductul toracic și apoi în fluxul sanguin. Viremia primară permite diseminarea infecției la țesuturile extraneurale care, la rândul lor, asigură în continuare replicarea virală, servind ca sursă de eliberare a virusurilor în circulație. Locurile cele mai importante de replicare virală extraneuronală includ țesutul conjunctiv, mușchii scheletici și miocardul, musculatura netedă, țesuturile limforeticulare și glandele exocrine și endocrine [Bogovic și colab., 2015].

3.1.2 Stadiul cunoașterii în România

Condițiile geo-climatice și ecologice din România permit menținerea și circulația virusului encefalitei de căpușă în natură. Deși primele cercetări privind prezența arbovirusurilor în România sunt comunicate încă din anul 1957 iar

primele date despre morbiditatea regională există din anii 1960, supravegherea encefalitei de căpușă a fost implementată abia de curând și se realizează doar în județele arundate Direcției de Sănătate Publică Cluj (Figura 3.1). În perioada 1985-1993 a fost realizat un studiu seroepidemiologic în 19 județe din partea de nord-vest a țării și în București, urmărindu-se seroprevalența infecției cu virusul encefalitei de căpușă atât la oameni (persoane sănătoase și persoane cu risc de expunere profesională – pădurari) cât și la animalele domestice (bovine, caprine, ovine). Pentru probele umane, s-au detectat procente de seroprevalență cuprinse între 1.1% (județul Constanța) și 19.4% (județul Maramureș), cu o medie de 6.5% [Ionescu și colab., 2009].

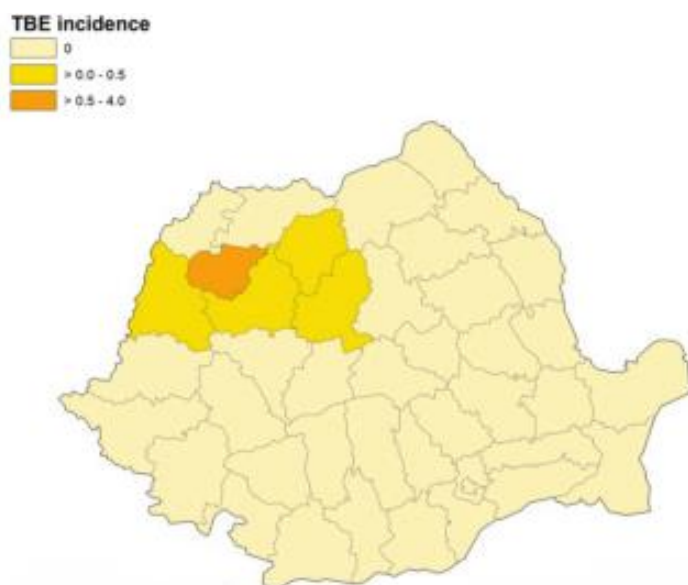


Figura 3.1 Rata incidenței anuale a encefalitei de căpușă la 100.000 de locuitori (perioada 2008-2010) [ECDC, 2012]

Figure 3.1 TBE annual average incidence rate per 100.000 inhabitants (period 2008-2010)

În ceea ce privește categoriile de risc, lucrătorii forestieri au înregistrat cea mai ridicată seroprevalență. Serurile de la animalele domestice analizate au fost pozitive în procente cuprinse între 2% și 34%, următoarele județe remarcându-se cu o seroprevalență ridicată: Hunedoara, Maramureș, Mureș, Suceava, Tulcea, Vâlcea și demonstrând că aceste zone prezintă o focalitate naturală.

3.2 VIRUSUL FEBREI HEMORAGICE CRIMEEA-CONGO

Febra hemoragică Crimeea-Congo (FHCC) este o boală endemică importantă, produsă de un virus din familia *Bunyaviridae*, genul *Nairovirus*, transmis prin intermediul căpușelor. Rezervorul natural al virusului este constituit din rumegătoarele mari și unele mamifere mici [Perianu, 2011b]. FHCC a fost descrisă inițial în Crimeea (Rusia) în 1944, de către cercetătorii sovietici în timpul unui focar ce a afectat 200 de persoane din armata sovietică. Aceștia au denumit-o inițial *febra hemoragică Crimeea*, însă agentul a fost de asemenea identificat la un pacient din Congo, virusul fiind apoi denumit *virusul febrei hemoragice Crimeea-Congo*.

Virusul FHCC are cea mai mare distribuție geografică dintre virusurile transmise de căpușe, fiind descris în Eurasia și Africa. Această distribuție coincide cu cea a căpușelor vector din genul *Hyalomma*. Virusul a fost raportat în aproximativ 30 de țări din Africa (Uganda, Sudan, Republica Democrată Congo, Nigeria, Mauritania, Senegal și Africa de Sud), sud-estul Europei (Kosovo, Rusia, Bulgaria, Grecia, Turcia etc), Orientul Mijlociu (Irak, Iran, Arabia Saudită și Oman) și Asia (Kazakhstan, Tajikistan, Uzbekistan, Pakistan, China și India). Bulgaria este singura țară din Europa unde FHCC are o evoluție endemică. Au fost observate însă focare cu un număr crescând de cazuri și în țări precum Kosovo, Turcia, Albania, Ucraina și sud-vestul Rusiei [Kamboj și colab., 2013].

3.2.1 Transmitere și rezervor natural

Nu există dovezi care să indice boala la animale. Animalele inoculate experimental (rumegătoare domestice, mamifere mici ca spermofilul, aricii, iepurii de câmp și rozătoarele miomorfe) fac forme clinice inaparente sau manifestate doar prin febră moderată și viremie [Swanepoel și colab., 1985]. În unele experimente, păsările s-au dovedit imune la virus, însă dovezi recente sugerează că anumite specii non-paserine sunt capabile să infecteze căpușele, în ciuda faptului că nu s-a depistat o viremie evidentă. Anchetele serologice au fost mijloacele tradiționale prin care s-au stabilit regiunile unde virusul FHCC circulă. În general, aceste studii au prezentat faptul că răspunsul pozitiv înregistrat în rândul efectivelor de animale se corelează cu apariția cazurilor de îmbolnăviri la om. De asemenea, procentajul animalelor pozitive are tendințe de creștere și scădere în funcție de parazitismul căpușelor iar seropozitivitatea este mai mare la animalele adulte comparativ cu cele tinere. Unele aspecte privind epidemiologia FHCC pot fi explicate pe baza necesității de hrănire a

căpușelor din genul *Hyalomma* și a altor căpușe vector atât pe animale mici cât și pe animale de talie mare.

În zonele în care se află un număr mare de mamifere mici (arici, iepuri de câmp) dar și mamifere mari (bovine, ovine), virusul poate circula fără a fi observat, înregistrându-se ocazional cazuri la oameni atunci când fermierii ce intră în contact cu animalele sunt mușcați de căpușele infectate. În contrast, când o regiune are un număr foarte mare de mamifere mici însă puține mamifere de talie mare, orice persoană ce intră în zona respectivă poate suferi în urma atacului căpușelor adulte aflate pe vegetație, rezultând un număr mare de infecții. Aceasta pare să fi fost situația din Crimeea în 1944, acolo unde iepurii de câmp s-au înmulțit foarte mult în fermele abandonate din perioada ocupației germane iar animalele de rentă erau regăsite într-un număr foarte mic. Explozia de cazuri în rândul soldaților și a fermierilor a reflectat nevoia urgentă a căpușelor adulte nehrănite din genul *Hyalomma* de a găsi un animal de talie mare pentru a se hrăni [Bente și colab., 2013].

Hyalomma marginatum cuprinde cinci specii de căpușe (*H. isaaci*, *H. marginatum* sensu stricto, *H. rufipes*, *H. turanicum* și *H. glabrum*) ce se hrănesc pe două gazde diferite, pentru a completa ciclul biologic. Distribuția lor cuprinde biotipuri variate din sudul Europei, sudul Asiei, Orientul Mijlociu și Africa. Năpârlirea de la stadiul de larvă la cel de nimfă se realizează pe prima gazdă (de obicei șoareci, arici și păsări) din cadrul ciclului de dezvoltare. Stadiile imature rămân atașate de gazde timp de 12-26 de zile, ceea ce le permite să fie transportate pe distanțe mari de către păsările migratoare. Adulții parazitează cea de-a doua gazdă (în special bovine și alte ongulate – cai, oi, capre, cămile, căprioare, mistreți și oameni). Căpușele genului *Hyalomma* au fost pozitive pentru infecția cu *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Borrelia* și *Babesia/Theileria* spp. În Europa, *Hyalomma* reprezintă de asemenea cel mai competent vector al virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo. Un rol important în diseminarea virusului este atribuit păsărilor migratoare, ce pot purta căpușele infectate pe distanțe foarte mari, existând astfel posibilitatea apariției de noi focare, inclusiv în România [Capek și colab., 2014].

3.2.2 Stadiul cunoașterii în România

Până în acest moment nu s-a reușit detecția virusului FHCC în căpușele din România. Au fost însă studii ce au obținut semnale serologice pozitive la rumegătoarele mici din sud-estul țării. Această regiune a fost luată în studiu deoarece, conform datelor privind distribuția speciilor de căpușe din țara noastră, *Hyalomma marginatum* (vectorul competent al virusului FHCC) este

limitată în sudul, sud-estul și sud-vestul țării iar zona Deltei Dunării este un punct important datorită biodiversității existente și a numărului foarte mare de păsări migratoare prezente de-a lungul anului [Sandor și colab., 2014]. Prima anchetă seroepidemiologică realizată în 2012 a inclus testarea prin ELISA IgG sandwich a 471 seruri provenite de la oi din județul Tulcea. Au fost obținute 131 seruri pozitive (27.8%) [Ceianu și colab., 2012]. Aceste rezultate sugerează prezența virusului la rumegătoarele mici din sud-estul României, fiind însă nevoie de studii de confirmare prin teste de detecție virală.

3.3 ALTE ARBOVIRUSURI TRANSMISE DE CĂPUȘE

În ultimii ani a fost observată o emergență a virusurilor transmise de căpușe. În anul 2015 erau cunoscute peste 38 specii virale transmise de către căpușe, unele dintre aceste cu o importanță majoră pentru sănătatea publică. În această categorie sunt incluse: virusul encefalitei de căpușă, virusul FHCC, virusul Kyasanur forest disease, virusul Alkhurma, virusul sindromului de trombocitopenie cu febră severă (SFTSV) și virusul Heartland. În plus, numeroși agenți virali transmiși de căpușe afectează de asemenea și sănătatea animalelor: virusul pestei porcine africane, virusul Nairobi și virusul louping ill. Cele mai importante genuri de căpușe responsabile de transmiterea virusurilor sunt: *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor* și *Rhipicephalus* [Xia și colab., 2015].

În pofida a numeroase cercetări privind diversitatea populațiilor bacteriene din căpușe, cunoștințele în ceea ce privește virusurile asociate căpușelor sunt încă limitate. Metodele tradiționale de izolare virală pe culturi celulare au evidențiat numeroși agenți însă au reprezentat un procentaj redus. Recent, virusul Heartland, un nou agent patogen transmis de căpușe a fost izolat de la pacienți în Missouri și a fost caracterizat prin secvențierea pe scară largă (HTS – high-throughput sequencing). Virusul Heartland este similar filogenetic cu virusul SFTS, un agent viral izolat de la căpușe și de la oameni în China. Emergența agenților patogeni noi de origine virală și volumul redus al informațiilor referitoare la viroma din căpușe, sugerează nevoia unei ample supravegheri virale și descrierea virusurilor prezente în căpușe [Tokarz și colab., 2014].

Virusurile Kyasanur forest disease (KFD) și febra hemoragică Omsk (OHF) conțin genom ARN și sunt încadrate în genul *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. KFD provoacă febră hemoragică locuitorilor din India, unde rozătoarele și maimuțele sunt gazde obișnuite ale virusului. Vectori pentru acest virus sunt căpușe nimfe ale genului *Haemaphysalis* (*Haemaphysalis spinigera*

și *Haemaphysalis turturis*). OHF determină o infecție virală acută în zonele lacustre din vestul Siberiei (Omsk, Novosibirsk, Kurgan și Tyumen) Rusia, unde rezervorul natural este reprezentat de rozătoare iar capușele vector pot fi speciile *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *D. pictus* și *I. persulcatus*. Boala la om se manifestă prin semne clinice de febră, migrenă, amețeli, leziuni veziculare orale, dureri musculare accentuate, tuse și stare de prostrație ce poate dura 1-2 săptămâni, cu posibilitatea înrăutățirii stării generale spre pneumonie, meningită, hemoragii severe ale aparatelor respirator, digestiv și genital, nefroză; moartea survine la 2-10% din cazuri [Brites-Neto și colab., 2015].

Virusul West Nile (WNV) este un membru al familiei *Flaviviridae* izolat de la diferite specii de țânțari dar și de la specii de ectoparaziți hematofagi (căpușe dure – *I. ricinus* și *I. scapularis*; căpușe moi - *O. moubata* și *C. capensis*) din regiuni ale Europei, Africii și Asiei. În zonele unde WNV determină infecții cu evoluție endemică, numeroase specii de păsări și mamifere manifestă semne clinice neurologice și de encefalomielită. Cu toate că țânțarii sunt vectorii competenți ai WNV iar căpușele nu sunt considerate capabile de a transmite eficient infecția, se pare că virusul poate fi menținut perioade mai lungi în căpușele infectate și de asemenea transmis între gazdele vertebrate, ceea ce ar putea sugera un potențial rol de rezervor natural al căpușelor [Brites-Neto și colab., 2015].

Febra de căpușă Colorado este provocată de un virus ARN al cărui genom cuprinde 12 segmente, fiind încadrat în familia *Reoviridae*, genul *Coltivirus*. Virusul a fost inițial identificat în SUA și Canada, căpușele din specia *Dermacentor andersoni* având rolul de vector. Rezervorul natural de virus este constituit din mamifere sălbatice iar principalele semne clinice la om sunt reprezentate de febră, mialgie și migrene moderate, conjunctivită, eritem și meningită.

Encefalita Powassan este o infecție a cărei agent etiologic este un virus ARN din familia *Flaviviridae*, genul *Flavivirus*, distribuit în emisfera nordică (inclusiv Canada, SUA, Rusia) și transmis de căpușele *D. andersoni*, *D. variabilis*, *Ixodes cookei* și *I. scapularis*. Virusul encefalitei Powassan determină infecția la om după o perioadă de incubatie de 8 până la 34 de zile, semnele clinice constând în febră, migrene, dezorientare, vomă, prostrație, dispnee și pareză spastică. Boala poate evolua către meningoencefalită și meningită. La animale, poate fi observată o evoluție subclinică, însă caii și animalele sălbatice pot dezvolta viremie și semne neurologice [Brites-Neto și colab., 2015].

Virusul Louping ill este încadrat în genul *Flavivirus* și aparține complexului viral transmis de căpușele *I. ricinus* în vestul Europei. Perioada de

incubație la om este de 2-8 zile. Boala are o evoluție bifazică. Prima fază este caracterizată de febră, durere retro-orbitală și dureri de cap; în cea de-a doua fază apar simptome nervoase sub forma meningoencefalitelor sau a poliomielitei paralitice. Infecția se poate observa și la animale situate în zone enzootice, cu afectarea oilor și a vacilor după o perioadă de incubație de 6-18 zile. Semnele clinice dominante sunt febra, incoordonare motorie, tremurături, hipersalivație și letargie.

Virusul pestei porcine africane este un virus ADN din familia *Asfviridae*, genul *Asfivirus* ce afectează suinele printr-o febră hemoragică cu procent ridicat de letalitate; această infecție reprezintă una din cele mai importante boli virale fiind inclusă pe lista A de către OIE (Oficiul Internațional de Epizootii). În natură, virusul circulă în cadrul a două categorii de cicluri enzootice (silvatic și domestic), ambele incluzând porcii și căpușele *Argasidae* din genul *Ornithodoros* în Africa (*O. moubata*, *O. porcinus*, *O. savignyi* și *O. sonrai*), membrii complexului *O. erraticus* în Peninsula Iberică și Rusia și *O. coriaceus*, *O. turicata*, *O. parkeri*, *O. puertoricensis* în America de Nord și Caraibe [Brites-Neto și colab., 2015].

CAPITOLUL IV SECVENȚIEREA DE ULTIMĂ GENERAȚIE (NGS) – APLICAȚIE PENTRU EXPLORAREA MICROBIOMEI DIN CĂPUȘE

CHAPTER IV NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) – EXPLORING THE MICROBIOME OF TICKS

Identificarea diversității microbiene prezentă în artropodele vector reprezintă un pas important din punct de vedere medical, în vederea monitorizării infecțiilor endemice, a supravegherii agenților zoonotici emergenți și pentru descoperirea microorganismelor asociate gazdelor [Carpi și colab., 2011].

4.1 TEHNOLOGIILE DE SECVENȚIERE ACTUALE

Toate platformele de secvențiere existente la ora actuală necesită o etapă inițială de procesare a ADN-ului cu scopul de a constitui o bibliotecă adecvată pentru secvențiere. În general, această etapă implică fragmentarea moleculelor mari de ADN pentru obținerea unor dimensiuni specifice fiecărei platforme. Apoi, adaptorii specifici sunt atașați de capetele 3' și 5' ale acestor fragmente; fiecare platformă utilizează adaptorii compatibili pentru următoarele etape ale analizei [Dabney și colab., 2012].

4.1.1 Tehnologia *Illumina*

Toate procesele enzimatice și etapele de vizualizare din cadrul tehnologiei *Illumina* au loc în cadrul unui flux celular. În funcție de platforma *Illumina* utilizată, fluxul celular poate fi partiționat în 1 (MiSeq), 2 (HiSeq2500) sau 8 (HiSeq2000, HiSeq2500) coloane separate. Platforma *Illumina* utilizează

principiul amplificării în punte și o abordare de secvențiere prin sinteză (Figura 4.1). Pe suprafața coloanelor cu flux celular sunt atașate pentru amplificare oligonucleotide *sens* și *antisens* (având un situs de clivare), complementare adaptorilor introduși în cursul etapei de preparare a bibliotecii; aceste oligonucleotide sunt atașate pe întreaga suprafață a coloanei de flux celular. Anterior introducerii secvențelor din bibliotecă pe suprafața internă a coloanelor, primul pas este reprezentat de denaturarea ADN-ului dublu catenar în molecule de ADN monocatenar. Acestea vor hibridiza pe suprafața fluxului celular cu nucleotidele deja fixate, ce joacă rolul de primeri, în vederea formării unei copii inițiale ale secvenței țintă. Moleculele inițiale ale bibliotecii sunt eliminate iar fragmentele copiate și atașate de fluxul celular sunt utilizate pentru generarea unui *cluster* (număr mare de copii) format din molecule identice cu cea inițială, prin intermediul amplificării izotermele. Această amplificare se realizează prin alternări ciclice a trei substanțe tampon specifice ce mediază pașii de denaturare, atașare și elongare la 60°C. Pe durata acestor pași, capătul 3' al copiilor moleculelor din bibliotecă poate hibridiza cu oligonucleotidele complementare atașate fluxului celular, formând astfel o structură asemănătoare unei punți (Figura 4.1) [Buermans și colab., 2014].

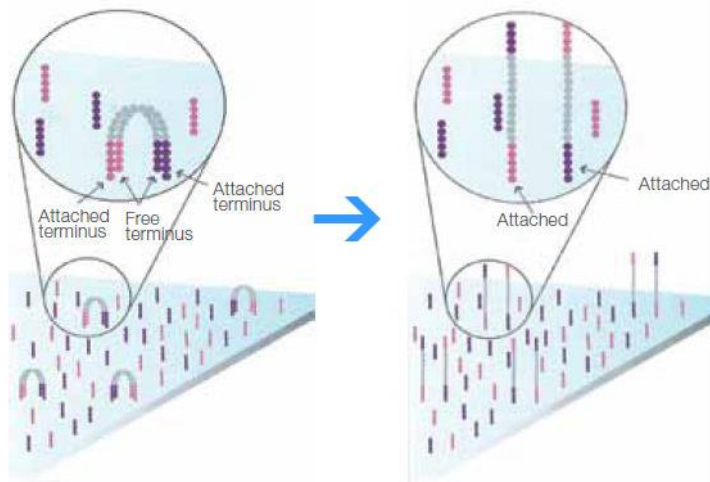


Figura 4.1 Amplificarea în punte a ADN-ului în cadrul platformei *Illumina*
Figure 4.1 Bridge amplification in *Illumina* platform
 [www.illumina.com]

Etapa finală este reprezentată de îndepărtarea unei catene din fragmentele ADN dublu catenare, prin utilizarea situsurilor de clivaj de la suprafața oligonucleotidelor și de blocarea capetelor 3' cu ddNTP pentru

prevenirea capetelor 3' deschise de a se comporta precum situsuri de secvențiere primară.

4.1.2 Tehnologia *Ion Torrent*

În cadrul platformelor PGM/Proton, secvențele șablon sunt generate pe o bilă sau sferă prin intermediul reacției în lanț a polimerazei (PCR) în emulsie. O emulsie ulei-apă este creată pentru a diviza micile vezicule de reacție, fiecare conținând o singură sferă, o singură moleculă din bibliotecă și toți reagenții necesari pentru amplificare. Sunt prezenți de asemenea, doi primeri complementari cu adaptorii secvenței din bibliotecă, însă un primer se află în soluție în timp ce celălalt este atașat de sferă. Astfel se realizează o selecție a moleculelor din bibliotecă ce au ambele tipuri de adaptorii (A și B) excluzând din reacția PCR în emulsie moleculele cu un singur tip de adaptorii (A sau B) (Figura 4.2). Pe durata PCR în emulsie, moleculele individuale din bibliotecă sunt amplificate în milioane de copii identice ce sunt atașate de sferă pentru a permite detecția semnalului.

Cu toate că o singură reacție PCR în emulsie poate genera miliarde de sfere șablon, sunt anumite aspecte ce intervin în cadrul acestei metode ce afectează obținerea unui rezultat optim. Așadar, este imposibil de obținut o încărcare corespunzătoare a unei molecule în fiecare godeu. De fapt, 1/3 din godeuri vor avea o singură moleculă pe când 2/3 din godeuri vor fi, fie lipsite de molecule din bibliotecă, fie vor avea mai multe. În plus, recuperarea sferelor este inefficientă chiar și prin utilizarea sistemelor automate. În etapa finală, sferele ce conțin ADN amplificat sunt separate de cele goale și depozitate în godeurile de secvențiere.

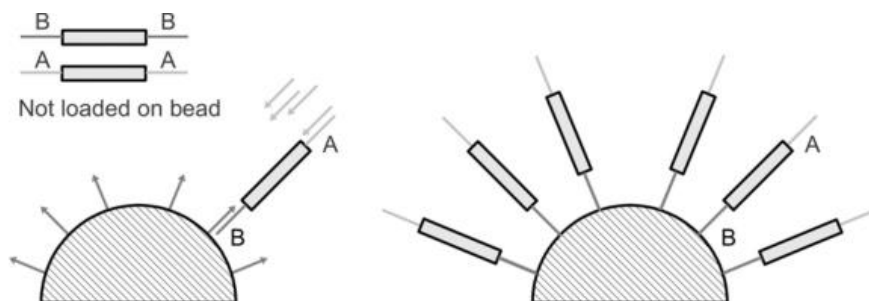


Figura 4.2 Generarea secvențelor șablon prin PCR în emulsie

Figure 4.2 Generating template sequences by emulsion PCR

[Buermans și colab., 2014]

Godeurile *Ion torrent* sunt constituite din compartimente cu fluide și senzori de pH fabricați prin tehnologia standard CMOS (complementary metal-oxide semiconductor). Detecția bazelor azotate integrate din timpul secvențierii nu se bazează pe captarea imagistică sau a semnalelor fluorescente ci pe eliberarea unui H⁺ din timpul elongării fiecărei nucleotide. Eliberarea hidrogenului este detectată ca o schimbare a pH-ului din interiorul godeurilor [Buermans și colab., 2014].

4.1.3 Tehnologia *Pacific biosciences*

Principiile ce stau la baza tehnologiei de secvențiere în timp real a unei molecule de ADN, realizată de Pacific biosciences, diferă semnificativ de cele menționate anterior. În primul rând, această tehnologie este aplicată pentru detecția unei singure molecule având o sensibilitate crescută pentru a înregistra încorporarea unei singure nucleotide marcată fluorescent. În plus, prepararea secvențelor șablon nu necesită etape de amplificare iar moleculele bibliotecii reprezintă șablonul pentru secvențiere. Prepararea bibliotecii este similară celorlalte platforme: fragmentarea ADN-ului genomic până la dimensiunile necesare (în acest caz având dimensiuni de mai multe kilobaze) urmată de repararea capetelor secvențelor sau legarea adaptorilor specifici. Diferența semnificativă se referă la structura adaptorilor, ce au o formă de semicerc astfel că, după legare, fragmentele de ADN dublu catenar vor deveni circulare. Pre-prepararea secvențelor șablon constă în atașarea primerilor de secvențiere de ADN-ul monocatenar, urmată de legarea ADN polimerazei cu formarea complexului activ de polimerizare.

Ca și în cazul platformei Illumina, cele patru nucleotide sunt marcate fluorescent, fiecare cu un marker individual. Totuși, diferența semnificativă constă în faptul că markerul sistemului PacBio este clivat în timpul elongării secvenței. În plus, nucleotidele nu conțin un grup terminal ce permite elongarea continuă a copiei de ADN. În momentul când o nucleotidă complementară șablonului este legată în poziția corespunzătoare de către ADN polimerază, identitatea nucleotidei este înregistrată datorită markerului fluorescent. Pe durata elongării markerul este clivat, difuzează în afara zonei de captare a semnalului luminos iar complexul este pregătit pentru următoarea elongare. În esență, sistemul înregistrează filmul activității polimerazei din timpul ciclului de amplificare. Polimeraza utilizată de către sistemul PacBio pentru realizarea secvențierii reprezintă o versiune modificată a enzimei phi29 [Buermans și colab., 2014] ce păstrează majoritatea proprietăților enzimei phi29 originale

(procesare ridicată a câtorva sute de kilobaze, rata mică de eroare, etc) [de Vega și colab., 1996].

4.2 APLICAȚIILE SECVENȚIERII DE ULTIMĂ GENERAȚIE

Tehnologia NGS are numeroase aplicații, cea mai evidentă fiind reprezentată de secvențierea genomică. Revoluția secvențierii de ultimă generație a redus într-un mod semnificativ durata și costurile necesare pentru secvențierea genomurilor de dimensiuni mari. Tehnologiile NGS au devenit astfel foarte importante pentru secvențierea *de novo* a genomului de la eucariote. Este de asemenea utilizat pentru secvențierea întregului genom sau pentru resecvențierea țintită, fiind astăzi aplicații larg utilizate. Comparate cu un genom de referință, secvențele resecvențiate pot fi utilizate pentru identificarea SNPs (polimorfismul unei singure nucleotide), inserții mici sau deleții, variația numărului de copii și alte variații structurale. În acest mod, resecvențierea de ultimă generație arată cum diferențele de ordin genetic pot influența caracterele fenotipice și evoluția unor boli.

Recent, platformele NGS au căpătat o importanță crescută pentru diagnostic, ca urmare a detecției mutațiilor moleculare; aplicarea NGS permite vizualizarea mutațiilor la nivelul întregului genom, a modificărilor aberante din secvențele de ADN și noi gene caracteristice diverselor infecții. O altă utilitate a platformelor NGS se referă la examinarea modificărilor epigenetice de-a lungul întregului genom studiat. Modificări precum metilarea ADN-ului, variații în structura cromatinei și modificări posttranslaționale ale histonelor, joacă un rol esențial în procesele celulare, inclusiv în reglarea genomică.

Studiile de metagenomică reprezintă de asemenea o aplicație cheie a secvențierii de ultimă generație, fiind utilizate în cercetări de ecologie și mediu. Diversitatea microbiană poate fi astfel monitorizată prin analiza probelor de mediu și a celor clinice. Aceste studii permit înțelegerea dezvoltării evolutive și a biodiversității ecologice a unor microbi, ajutând astfel la încadrarea speciilor [Wong și colab., 2012]. NGS a fost de asemenea utilizată cu succes pentru observarea profilului expresiei genice prin secvențierea diferitelor specii de ARNm. Aceste analize ample ale NGS joacă un rol important în biologia moleculară, măsurând în paralel activitatea a mii de gene; mai mult, NGS permite cuantificarea absolută a transcriptelor [Mutz și colab., 2013].

PARTEA a II-a
CONTRIBUȚII PERSONALE

PART II
PERSONAL CONTRIBUTIONS

CAPITOLUL V

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

CHAPTER V

GOAL AND OBJECTIVES

Vectorii biologici ai infecțiilor pentru animale și om sunt reprezentați în principal de specii de artropode capabile să mențină și să transmită agenți infecțioși către gazdele parazitare. Dintre aceștia, căpușele transmit cea mai mare varietate de agenți patogeni, comparativ cu orice alt artropod. *Ixodes ricinus* (căpușa oii) este cea mai răspândită specie din Europa, fiind vector pentru numeroși agenți bacterieni, inclusiv pentru *Borrelia burgdorferi* s.l., agentul etiologic al bolii Lyme. *Ixodes ricinus* este de asemenea un vector competent pentru unele specii patogene din genul *Rickettsia*, *Anaplasma* și *Ehrlichia*.

România, prin așezarea geografică la granița de est a Uniunii Europene, constituie un teritoriu important din punct de vedere epidemiologic și poate reprezenta un risc continuu de urgență a bolilor infecțioase atât pentru locuitorii autohtoni cât și pentru cei de pe întregul continent european. La momentul actual, în țara noastră, infecțiile transmise de căpușe se află încă în evaluare pentru definirea statutului lor epidemiologic. Există o necesitate stringentă 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, intitulată "**Cercetări epidemiologice și etiologice asupra unor boli infecțioase emergente cu transmitere vectorială în zona de est a României**", 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 cercetări cu o abordare integrată, ce au vizat evaluarea riscului infecțiilor vectorizate de căpușe pentru animale și om, în concordanță cu principiile de bază ale conceptului *One Health*.

Primul obiectiv din cadrul tezei a vizat efectuarea unor **investigații seroepidemiologice asupra principalelor infecții cu transmitere vectorială la animale și riscul pentru om** în zona de studiu (Estul României). Pentru îndeplinirea acestui deziderat, am efectuat două anchete seroepidemiologice. Prima anchetă a urmărit identificarea anticorpilor specifici IgG anti-*Borrelia* la câinii aflați în padocuri și a celor din gospodăriile populației. Această anchetă a fost inițiată ca urmare a studiilor anterioare ce au indicat o perspectivă promițătoare în utilizarea anchetelor serologice la câine pentru identificarea potențialelor zone de risc de boală Lyme la om. A doua anchetă seroepidemiologică a urmărit detecția anticorpilor specifici virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo din serurile rumegătoarelor mici (oi și capre din sud-estul României).

Cel de-al doilea obiectiv propus în cadrul studiului, **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 din estul României, distincte din punct de vedere geografic dar și al tipului de habitat.

Ultimul obiectiv al tezei a urmărit **caracterizarea comunităților microbiene din căpușe prin aplicarea secvențierii de ultimă generație (NGS)**. Componenta comunităților microbiene în căpușele din România a fost descrisă prin aplicarea metodelor clasice de biologie moleculară, ce a permis identificarea unui număr redus de agenți patogeni. În acest context, am efectuat un studiu de inventariere a agenților bacterieni patogeni dar și a endosimbionților prezenți în trei mixuri de ARN obținute de la căpușele nehrănite. De asemenea, am urmărit caracterizarea populațiilor virale din căpușele colectate de pe vegetație în zona de est a României, utilizând tehnologia secvențierii pe scară largă (HTS). Acest studiu a reprezentat o etapă importantă în procesul de identificare și caracterizare a microbiomei căpușelor aflate în condiții naturale în România.

CAPITOLUL VI

INVESTIGAȚII SEROLOGICE ȘI ETIOLOGICE ASUPRA PRINCIPALELOR INFECȚII TRANSMISE DE CĂPUȘE LA ANIMALE

CHAPTER VI

SEROLOGICAL AND ETIOLOGICAL STUDIES OF MAIN TICK-BORNE INFECTIONS IN ANIMALS

6.1 ANCHETĂ SEROEPIDEMIOLOGICĂ PRIVIND FEBRA HEMORAGICĂ CRIMEEA-CONGO LA RUMEGĂTOARE MICI DIN SUD-ESTUL ROMÂNIEI

Dintre virusurile transmise de căpușe, virusul febrei hemoragice Crimeea-Congo are cea mai mare distribuție geografică, fiind răspândit pe teritoriul Eurasiei și Africii. Această distribuție coincide cu cea a căpușelor vector din genul *Hyalomma*. Virusul a fost raportat în aproximativ 30 de țări din Africa (Uganda, Sudan, Republica Democrată Congo, Nigeria, Mauritania, Senegal și Africa de Sud), sud-estul Europei (Kosovo, Rusia, Bulgaria, Grecia, Turcia etc), Orientul Mijlociu (Irak, Iran, Arabia Saudită și Oman) și Asia (Kazakhstan, Tajikistan, Uzbekistan, Pakistan, China și India). Bulgaria este singura țară din Europa unde FHCC are o evoluție endemică, însă au fost observate focare cu un număr crescând de cazuri și în țări precum Kosovo, Turcia, Albania, Ucraina și sud-vestul Rusiei [Kamboj și colab., 2013].

FHCC circulă în natură prin intermediul unui ciclu căpușă-gazda vertebrată-căpușă, în transmiterea virusului intervenind 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: larvele și nimfele se hrănesc pe mamifere mici și pe păsările ce se hrănesc pe sol, în timp ce căpușele adulte parazitează mamiferele mari precum căprioara, mistrețul dar și animale de rentă, acestea fiind de altfel

rezervorul de virus. Virusul FHCC poate fi transmis pe cale verticală de către *H. marginatum*, aceasta îndeplinind astfel rolul de vector dar și de rezervor natural pentru acest patogen [Ceianu și colab., 2012].

Prezentul studiu s-a realizat pentru a determina prevalența anticorpilor specifici virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo (VFHCC) la oi și capre din regiunea Dobrogei și pentru a aprecia factori 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* (Figura 6.1) [Mihalca și colab., 2012a] dar și de datele obținute de către Ceianu și colab. (2012), ce au raportat o prevalență de 27.8% probe serologic pozitive la infecția cu virusul FHCC la oi din județul Tulcea [Ceianu și colab., 2012].

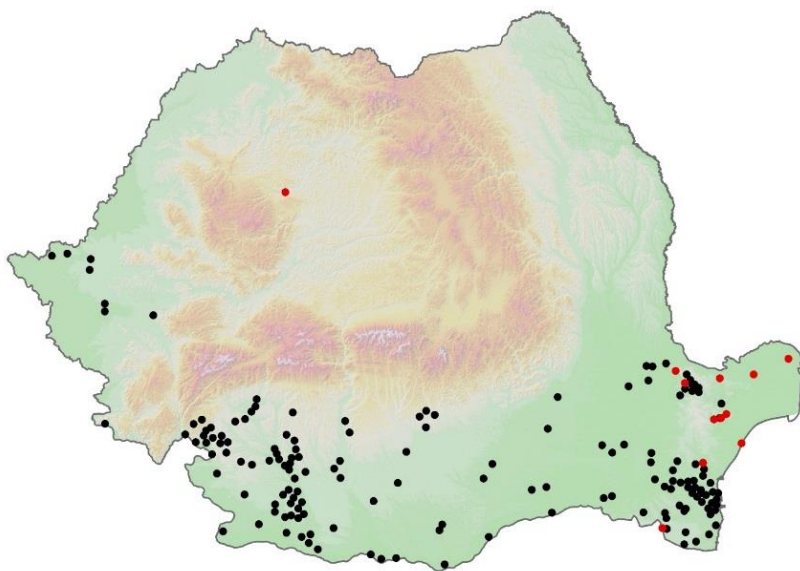


Figura 6.1 Harta distribuției *H. marginatum* în România

● Zonele cunoscute înainte de 2012; ● Zone adăugate de Mihalca și colab., 2012

Figure 6.1 Distribution map of *H. marginatum* in Romania

● Sites known before 2012; ● Sites added by Mihalca et al., 2012

[Mihalca și colab., 2012a]

Principiul reacției ELISA

Această metodă de identificare a imunoglobulinei G specifică virusului FHCC reprezintă o reacție în cursul căreia serurile de analizat interacționează cu antigenele FHCC fixate în godeuri. Legarea anticorpilor specifici de antigenele fixate duce la formarea complexelor antigen-anticorp situate la

suprafața godeurilor. În momentul adăugării conjugatului, acesta este încorporat de către complexul imun format. Astfel, complexul antigen-anticorp-conjugat este vizualizat prin intermediul unei reacții de culoare utilizând un substrat de peroxidază, peroxid de hidrogen și un cromogen (tetrametilbenzidină). Intensitatea colorării este direct proporțională concentrației IgG anti-FHCC.

6.1.1 Materiale și metode

6.1.1.1 Zona de studiu

Pentru efectuarea reacției imunoenzimatică ELISA, au fost recoltate probe de ser din 10 localități din regiunea Dobrogei: 3 localități din județul Tulcea și 7 localități aparținând județului Constanța (Tabel 6.1, Figura 6.2). În total au fost testate 90 de probe de ser, dintre care 29 de seruri provenite de la capre și 61 de seruri recoltate de la oi.

Tabel 6.1/Table 6.1

Probele recoltate de la oi și capre în perioada iulie-septembrie 2014
Serum samples from sheep and goats collected between July and September 2014

Localitatea	Numărul de probe	Specia
1. Baia, TL	10	Capre
2. Slava Rusă, TL	4	Capre
3. Slava Rusă, TL	9	Oi
4. Slava Cercheză, TL	15	Oi
5. Baia, TL	17	Oi
6. Rîmnicul de Jos, CT	5	Capre
7. Tariverde, CT	5	Capre
8. Vârtop, CT	5	Capre
9. Coroana, CT	5	Oi
10. Cloșca, CT	5	Oi
11. Piatra, CT	5	Oi
12. Mangalia, CT	5	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 Elisa pentru om, produs de VectorBest-Rusia (Vect-Crimean-CHF-IgG), protocolul de lucru având unele modificări

minore. Pentru a testa probele de ser recoltate de la rumegătoare mici, protocolul a fost adaptat prin utilizarea anticorpilor secundari IgG HRP anti-capră și anti-oaie (Covalab, Villeurbanne, France) în concentrație de 1/500. Godeurile plăcii au fost căptușite cu antigen viral FHCC. Controlul negativ în cadrul reacției a fost reprezentat de o probă de ser provenită de la un berbec din localitatea Cotnari, județul Iași, această localitate fiind în afara ariei de distribuție a speciei *H. marginatum*, principalul vector al virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo.

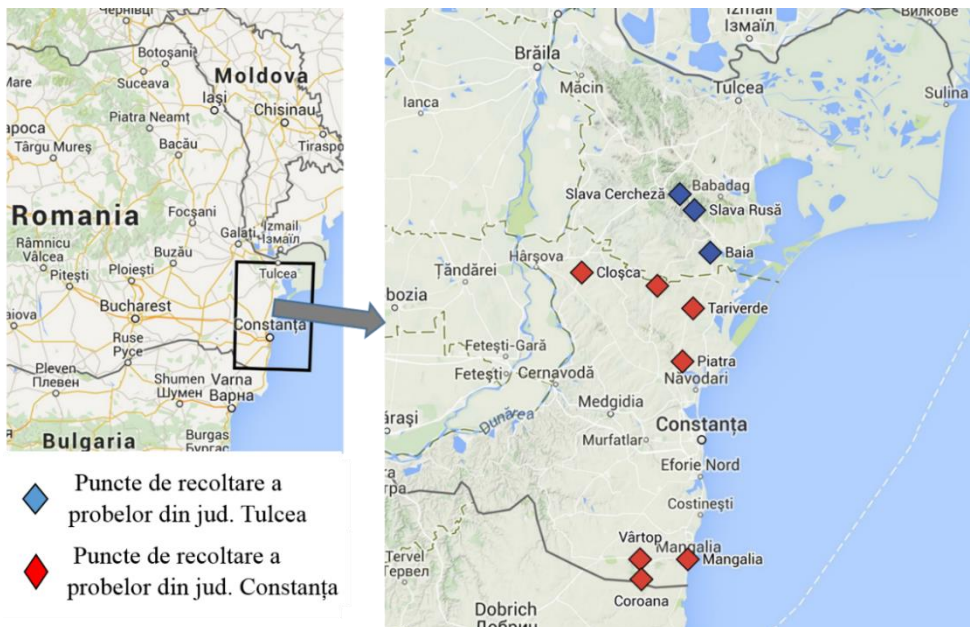


Figura 6.2 Localitățile de unde s-au recoltat probele de ser
Figure 6.2 Localities from which serum samples were collected

6.1.1.2 Analiza probelor colectate

Protocolul de lucru pentru realizarea reacției a constat în parcurgerea următoarelor etape:

1. Adăugarea probelor de control:
 - 1 godeu - 100 μl C⁺ ;
 - 2 godeuri - 100 μl C⁻ în fiecare.

Ex: 100 μl C⁻ în godeurile A-1 și B-1, 100 μl C⁺ în godeul C-1.

2. Pentru realizarea screening-ului, se adaugă 90 μl tampon de diluare a serurilor și 10 μl din serul diluat în prealabil, în fiecare din godeurile

rămase. Soluțiile se amestecă cu grijă. Serurile de testat sunt astfel diluate de 100 de ori.

3. Incubare: placa se sigilează cu film adeziv și se incubează la termostat timp de 60 de minute la 37° C.
4. Spălare: după incubare, filmul se îndepărtează. Spălarea plăcii se face de 5 ori cu soluția de spălare, alternând aspirarea și umplerea imediată a godeurilor din fiecare rând al plăcii. Se adaugă cel puțin 400 μl de substanță de spălare în fiecare godeu la fiecare ciclu de spălare. Intervalul dintre umplerea și golirea godeurilor nu trebuie să fie mai mic de 30 de secunde. Soluția de spălare trebuie să fie complet eliminată după fiecare spălare. După spălare, se îndepărtează soluția rămasă din godeuri prin utilizarea hârtiei de filtru, pe care se așează placa răsturnată.
5. Adăugarea conjugatului: se adaugă 100 μl de conjugat (anticorpi secundari antispecie) în fiecare godeu, la o diluție de 1/1000 (anti-sheep HRP, anti-goat HRP).
6. Incubare: sigilarea plăcii cu film adeziv, apoi incubare la termostat, 30 de minute la 37° C.
7. După incubare, se efectuează spălarea plăcii de 5 ori.
8. Adăugarea TMB: 100 μl soluție tetrametilbenzidină în toate godeurile.
9. Incubare: placa se menține într-un loc ferit de lumină, timp de 20 de minute, la 18-25°C.
10. Adăugarea soluției stop: 100 μl soluție stop în fiecare godeu al plăcii, la aceeași rată și ordine la care s-a realizat pentru soluția de tetrametilbenzidină.

Măsurarea densității optice s-a realizat la 405 nm cu ajutorul cititorului de plăci. Intervalul cuprins între oprirea reacției și măsurarea densității optice nu trebuie să depășească 5 minute.

Rezultatele reacției sunt valide dacă sunt satisfăcute următoarele condiții:

- densitatea optică medie în godeurile ce conțin controlul negativ nu înregistrează valori mai mari de 0.25 U.O. (unități optice);
- densitatea optică în godeul cu controlul pozitiv este cel puțin 1.0 U.O.

Evaluarea rezultatelor se face prin calcularea valorii cut-off a densității optice utilizând ecuația: $OD_{CO} = OD_{avC^-} + 0.2$, unde OD_{avC^-} = valoare medie a densității optice din godeurile cu un control negativ.

Un rezultat al analizei este considerat pozitiv dacă $OD_{PROB\bar{A}} \geq OD_{CO}$, unde: $OD_{PROB\bar{A}}$ = densitatea optică a probelor testate. Rezultatul este considerat negativ dacă $OD_{PROB\bar{A}} < 0.8 \times OD_{CO}$. Rezultatul este considerat echivoc (dubios) dacă $0.8 \times OD_{CO} \leq OD_{PROB\bar{A}} < OD_{CO}$.

6.1.2 Rezultate și discuții

Diagnosticul serologic al unei infecții provocate de virusul FHCC constă în detecția anticorpilor specifici induși în urma răspunsului umoral, cu precădere împotriva antigenului dominant NP (nucleoproteină). Virusul FHCC conține un singur serotip iar în urma comparării mai multor sușe virale din zone geografice diferite s-a remarcat o mare omogenitate antigenică [Palacios și colab., 2006]. Tehnica ELISA este utilizată în mod curent pentru detecția anticorpilor FHCC, fiind considerată mai sensibilă decât imunofluorescența [Ceianu și colab., 2012, Raileanu și colab., 2015].

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% (Tabel 6.2). Au fost 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.

A fost demonstrat faptul că anticorpilor specifici nucleoproteinei recombinante VFHCC nu reacționează încrucișat cu anticorpilor nairovirusurilor înrudite (virusurile Hazara și Dugbe) sau cu cei ai altor virusuri din familia *Bunyaviridae* (ex: virusul Puumala) [Marriot și colab., 1994, Ceianu și colab., 2012]. În România, rezultatele primei anchete seroepidemiologice realizată în cadrul populației de ovine au fost publicate în anul 2012 [Ceianu și colab., 2012]. În cadrul acestui studiu s-au testat 476 probe de ser de la ovine, înregistrându-se o seroprevalență de 27.8%, un număr de 131 de seruri fiind pozitive la testul ELISA IgG sandwich. Probele de ser au provenit din localități ale județului Tulcea, acest studiu evidențiind pentru prima dată circulația virusului FHCC în România.

În cadrul studiului nostru am inclus și probe provenite de la animale din județul Constanța, fiind obținute rezultate pozitive, evidențiind astfel existența unui areal mai mare de animale serologic pozitive pentru FHCC. Febra hemoragică Crimeea Congo este o boală vectorială ce evoluează în țările vecine României. În Turcia sunt înregistrate anual peste 1000 de cazuri de îmbolnăviri la oameni. Virusul a fost identificat și în Bulgaria, Ungaria, Ucraina, ceea ce presupune o prezență și pe teritoriul României.

În cadrul unei anchete transversale privind seroprevalența FHCC la animalele de rentă din 2 localități rurale din Bulgaria, au fost identificate ca fiind pozitive 72% dintre animalele supuse investigațiilor. Astfel, se observă o seropozitivitate ridicată în cadrul rezervorului de virus, însă cu toate acestea, în

Bulgaria, în perioada 2007-2012, au fost înregistrate doar 37 de cazuri cu FHCC la om [Barthel și colab., 2014].

Tabel 6.2/Table 6.2

Distribuția probelor pozitive pentru IgG anti-VFHCC
Distribution of positive samples for IgG anti-CCHFV

Județ	Localitate	Specia	Nr. de probe testate	Probe poz. pentru IgG anti VFHCC / %
Tulcea	Baia	capre	10	8/80
		oi	17	15/88.2
	Slava Rusă	capre	4	3/75
		oi	9	7/70
	Slava Cercheză	oi	15	13/86.6
Constanța	Râmnicul de Jos	capre	5	2/40
	Tariverde	capre	5	2/40
	Vârtop	capre	5	1/20
	Coroana	oi	5	3/60
	Cloșca	oi	5	5/100
	Piatra	oi	5	3/60
	Mangalia	oi	5	5/100
Total			90	67/74.4

În urma unui studiu efectuat în Turcia, regiunea Marmara de Sud, considerată a fi non-endemică, au fost testate 508 probe de sânge recoltate de la animale de rentă din 5 localități. Rezultatele obținute au indicat o seroprevalență de 33.1%, rata cea mai mare fiind înregistrată la capre (66.%). Rezultatele acestui studiu demonstrează distribuția largă a virusului FHCC în localități non-endemice, ceea ce poate duce la generarea unor zone de infecții focale cu risc pentru om.

Seroprevalența înregistrată în cadrul studiului nostru a fost de 74.4%. Aceasta a avut valori mai mari la ovine (85%), comparativ cu seroprevalența obținută la caprine – 55.1%. Rezultatele noastre 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. Este necesară astfel instituirea altor studii la animale dar și realizarea de cercetări asupra căpușelor vector, pentru a evalua riscul reprezentat de virusul FHCC asupra sănătății publice.

6.2 DETECȚIA VIRUSULUI FHCC ÎN CĂPUȘE COLECTATE DE PE GAZDELE TESTATE SEROLOGIC

Rumegătoarele mici testate pentru prezența anticorpilor anti-FHCC au fost totodată examinate pentru a observa un eventual parazitism cu căpușe. În urma examinării, au fost colectate 74 de căpușe adulte iar identificarea s-a realizat până la nivel de gen, la stereomicroscop, prin intermediul cheilor de identificare taxonomică [Perez-Eid, 2007]. Toți indivizii colectați au aparținut genului *Rhipicephalus* spp., unele specii ale genului fiind recunoscute drept vectori competenți pentru virusul FHCC (Tabel 6.3).

Tabel 6.3/Table 6.3

Căpușe colectate de la oi și capre testate serologic pentru prezența anticorpilor anti-FHCC

Ticks collected from sheep and goats surveyed for anti-CCHFV antibodies

Turma	Specia gazdă	<i>Rhipicephalus</i> spp.		Locația	Căpușe colectate
		Femele	Masculi		
Turma 1	Capră	6	3	Slava Cercheză	9
	Capră	5	3		8
	Capră	3	4		7
	Capră	3	6		9
	Capră		1		1
	Capră		2		2
	Capră	1			1
	Capră	4	1		5
	Capră		1		1
Total 1		22	21		43
Turma 2	Oaie	1	5	Slava Rusă	6
	Oaie	4	4		8
	Oaie	1	4		5
	Oaie	2	4		6
Total 2		8	17		25
Turma 3	Oaie	1	1	Slava Rusă	2
	Oaie	1			1
	Oaie		1		1
	Oaie		1		1
	Oaie	1			1
Total 3		3	3		6
Total General		33	41		74

6.2.1 Materiale și metode

6.2.1.1 Colectarea probelor

După colectarea probelor de sânge, fiecare animal a fost examinat în vederea identificării căpușelor. Au fost examinate cu precădere regiunile axilare, perianale și abdominale (regiuni preferate de căpușe pentru hrănire). Căpușele observate pe animal au fost colectate vii, cu ajutorul unor pense speciale și transportate la laborator pentru identificare taxonomică și stocare. Conservarea ectoparaziților s-a realizat la -80°C, fiind precedată de o etapă de spălare în etanol 70% și apă distilată.

6.2.1.2 Extracția ARN

Extracția ARN-ului s-a realizat cu *kit*-ul Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Protocolul de lucru s-a realizat conform etapelor descrise în manualul de utilizare a *kit*-ului. Fiecare căpușă a fost distribuită într-un tub cu 6 bile metalice cu diametrul de 2.8 mm (Hard Tissues Grinding Mix = Precellys lysing kit, Bertin), 300 μ l de mediu clasic pentru culturi celulare (D-MEM) conținând 10% ser fetal bovin (Gibeco). Căpușele au fost apoi lizate utilizând trituratorul de organe Precellys 24 lyser / homogenizer (Bertin, Franța) timp de 20 de secunde la 5500 rpm. După triturare, probele s-au centrifugat la 1500 rpm timp de 2 minute.

Premergător etapelor de extracție propriu-zise, s-a efectuat o liză celulară prin adăugarea a 350 μ l Buffer RA1 și 3.5 μ l β -mercaptoetanol peste trituratul de căpușe centrifugat din fiecare tub. După etapa de liză celulară, urmează extracția ARN-ului efectuată în șapte etape.

1. Filtrarea lizatului

Se plasează filtrul Nucleospin în tubul colector și se adaugă amestecul precedent în coloană. Se centrifughează 1 min x 11.000 g.

2. Ajustarea condițiilor de precipitare a ARN-ului

Se pune filtratul într-un tub Eppendorf de 1.5 ml și se adaugă 350 μ l etanol 70%. Se omogenizează.

3. Precipitarea ARN-ului

Se plasează o coloană Nucleospin RNA II într-un tub de 2 ml. Se adaugă lizatul din etapa 3 în coloană. Se centrifughează 30s x 8.000g. Se plasează coloana într-un nou tub de colectare.

4. Desalinizarea membranei de siliciu

Se adaugă 350 µl de Membrane desalting Buffer. Se centrifughează 1 min x 11.000 g, pentru a se usca membrana de siliciu.

5. Digestia ADN-ului

Se prepară mix-ul DNase într-un tub steril: 10 µl DNase I + 90 µl DNase reaction Buffer. Se depune 95 µl de mix în centrul coloanei. Se incubează 15 minute la temperatura camerei.

6. Spălarea și uscarea membranei de siliciu

Prima spălare. Se adaugă 200 µl de buffer RA2 în coloană, se centrifughează 30s x 8000g; se plasează coloana într-un nou tub colector.

A doua spălare. Se adaugă 600 µl de buffer RA3 în coloană, se centrifughează 30s x 8000g, se aruncă supernatantul și se repune coloana în tubul colector.

A treia spălare. Se adaugă 250 µl de buffer RA3, se centrifughează 2 min x 11000g pentru a se usca membrana.

7. Eluția ARN -ului

Se depun 60 µl de apă RNase free în centrul coloanei și se centrifughează 1 min x 11000g.

6.2.1.3 Revers transcripție-PCR în timp real (rRT-PCR) pentru identificarea febrei hemoragice Crimeea-Congo

Probele de ARN au fost testate în cadrul reacției rRT-PCR ce a urmărit detecția virusului febrei hemoragice Crimeea-Congo, utilizând amorse și sonde specifice. Reacțiile rRT-PCR Taqman au fost efectuate în 20 µl volum final de reacție, utilizând LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes master mix (Roche Applied Science, Germania) la concentrație finală de 1x, cu 0.5 µM amorse specifice, 0.25 µM sonde, 3.25 mM acetat de mangan [Mn(OAc)₂] și 2 µl ARN de testat. Toate reacțiile au inclus un martor negativ (apă) și unul pozitiv. Condițiile termice pentru rRT-PCR au fost: 63°C pentru 3 min, 95°C pentru 30 s, 45 cicluri la 95°C pentru 10 s, apoi 60°C pentru 30 s, urmând apoi o etapă de răcire la 40°C pentru 10 s.

6.2.2 Rezultate și discuții

În urma testării celor 74 de căpușe *Rhipicephalus* spp. nu au fost identificate probe pozitive pentru infecția cu virusul FHCC. Această situație indică faptul că ectoparaziții nu conțineau virusul FHCC în momentul atașării pe gazde, nefiind astfel responsabili de transmiterea infecției către rumegătoarele mici. Oile și caprele serologic pozitive au fost infectate anterior parazitismului

cu indivizii colectați și testați în cadrul acestui studiu. Infecția cu virusul FHCC la rumegătoare are o evoluție asimptomatică, însă animalele au capacitatea de transmitere a virusului către căpușe în momentul hrănirii acestora. Este de bănuat faptul că oile și caprele pozitive au trecut prin procesul de seroconversie anterior atașării căpușelor și astfel nu s-a realizat transmiterea virusului FHCC către vectori.

6.3 ANCHETĂ SEROEPIDEMIOLOGICĂ PRIVIND BOALA LYME LA CÂINI DIN ZONA DE EST A ROMÂNIEI

Boala Lyme este o infecție multisistemică cauzată de diferite specii bacteriene ale complexului *Borrelia burgdorferi* transmise de căpușele genului *Ixodes* [Paduraru și colab., 2012]. 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*.

În anul 2009, în Statele Unite ale Americii, s-a înregistrat un număr de aproximativ 38.000 cazuri confirmate și suspecte de boală Lyme la om. În Europa se presupune existența unui număr mai mare de infecții cauzate de agenții bolii față de cele descrise, ca urmare a lipsei unui sistem uniform de raportare. Căpușele pot transmite eficient boala Lyme la câinii din America de Nord și Europa. Câinele este utilizat drept santinelă și model animal eficient pentru studierea bolii Lyme la om [Krupka și colab., 2010].

Infecția la câine poate provoca artrită (ce evoluează cu șchiopături), anorexie, febră, letargie, limfadenopatie și în unele cazuri glomerulonefrită fatală [Little și colab., 2010]. Spre deosebire de cazurile de boală Lyme la om, cazurile clinice la câini nu pot fi divizate cu precizie în trei stadii. Este acceptat faptul că nu toți indivizii infectați natural dezvoltă semne clinice de boală; în condiții experimentale, aproximativ 75% din câinii infectați au dezvoltat boala. Prezența anticorpilor specifici nu se corelează neapărat cu semne clinice de boală, mulți câini infectați cu agenții bolii Lyme suferind procesul de seroconversie și rămânând asimptomatici [Krupka și colab., 2010]. Diagnosticul cert de boală Lyme reprezintă încă un proces lung și dificil atât în medicina omului cât și în cea veterinară, deoarece nu există un test de diagnostic specific acestei boli. Pe de altă parte, spirochetele nu pot fi identificate cu ușurință, existând de asemenea un număr substanțial de infecții subclinice. Răspunsul imunologic tardiv și manifestările clinice întârziate împiedică diagnosticul și aplicarea eficientă a tratamentului.

Metodele bazate pe tehnica ELISA permit detecția imunoglobulinelor IgM și IgG. Pentru medicina veterinară, detecția IgM nu este recomandată deoarece semnele clinice apar după câteva săptămâni de la contactul cu ectoparaziții, atunci când IgG sunt deja prezente. Câinii infectați experimental au produs un nivel detectabil de IgG la patru-șase săptămâni de la expunere iar anticorpii persistă timp de patru ani [Topfer și colab., 2007].

Stabilirea potențialelor zone de risc pentru boala Lyme este dificil de realizat, mai ales în situațiile cu un număr redus de cazuri la om. Pentru identificarea zonelor endemice, sunt importante studiarea relației vector-gazdă, populația de căpușe prezente și prevalența anticorpilor anti-*B. burgdorferi* în rezervorul natural de boală. Anchetele serologice efectuate la câini pentru detecția anticorpilor specifici anti-*Borrelia* oferă perspective încurajatoare pentru 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 [Bhide și colab., 2004].

Scopul acestui studiu a constatat în stabilirea prevalenței anticorpilor specifici anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. în probe 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, Centrul național de supraveghere și control al bolilor transmisibile (CNSCBT) a raportat prezența cazurilor de boală Lyme la om.

6.3.1 Materiale și metode

6.3.1.1 Zona de studiu

Pentru detecția anticorpilor specifici anti-*Borrelia* spp., au fost testate 90 de probe de ser recoltate de la câini cazați în padocuri publice (68 de probe: n=20, Suceava; n=30, Tomești; n=8, Comănești; n=10, Tulcea) și câini aflați în gospodăria din mediul rural (22 de probe: n=20, județul Bacău; n=2, Vatra Dornei) (Tabel 6.4; Fig. 6.3). Probele au fost recoltate în perioada mai – septembrie 2014. Vârsta câinilor incluși în studiu a fost cuprinsă între șase luni și 14 ani. Fiecare individ a fost examinat pentru a observa căpușe, acestea fiind prelevate și conservate pentru testări ulterioare. Probele de sânge au fost recoltate aseptice, prin puncția venei cefalice, utilizându-se tuburi fără anticoagulant, pentru exprimarea serului; probele de ser recoltate au fost depozitate la -20°C.

6.3.1.2 Testarea probelor colectate

Probele de ser au fost testate prin reacția ELISA, după o prealabilă diluție 1:100, utilizându-se un kit comercial “Enzyme linked immunosorbent assay” (Borrelia Canine Lyme IgG - ELISA Novatec Immunodiagnostica GmbH, Germany) ce are drept scop identificarea anticorpilor IgG anti-*Borrelia burgdorferi* în serul de câine.

Tabel 6.4/Table 6.4

Probe de sânge colectate de la câini
Blood samples collected from dogs

Nr. probe	Localitatea	Masculi	Femele	Data colectării	Căpușe colectate		
					F	M	N
8	Comănești, Jud. Bacău	NE	NE	NE			
10	Tulcea	4	6	4.08.2014	4 R. ross.	3 R. ross.	11 R. ross.
20	Suceava	13	7	13.09.2014			
30	Tomesti, Jud. Iasi	10	20	16.09.2014			
20	Bacău	NE	NE	19.09.2014			
2	Vatra Dornei, Jud. Suceava		2	21.09.2014	7 I. r.	9 I. r.	

NE : necunoscut; F: Femele; M: Masculi; N: Nimfe; R. ross: *Rhipicephalus rossicus*; I.r.: *Ixodes ricinus*.

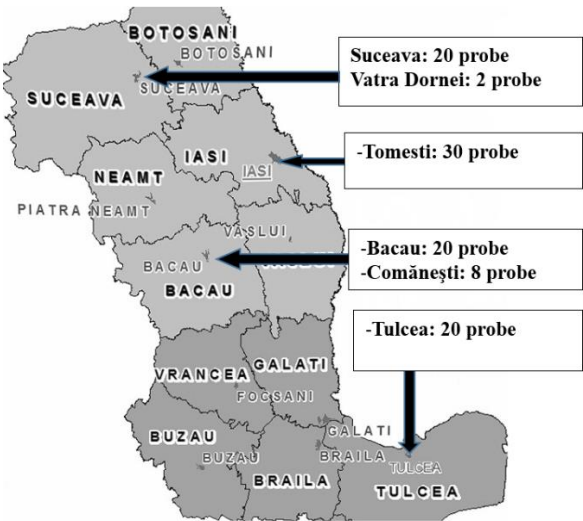


Figura 6.3 Zonele de unde au fost recoltare probele de ser
Figure 6.3 Sampling sites in Eastern Romania

Protocolul de lucru pentru realizarea reacției a cuprins următoarele etape:

1. Distribuirea a 100 μ l soluție de control și a probelor diluate în godeuri. Poziția A1 de pe placă rămâne liberă pentru substratul *blank*.

2. Acoperirea godeurilor cu folia existentă în kit.

3. Incubare 60 de minute $\pm$ 5 minute la $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

4. După terminarea incubăției, folia este îndepărtată. Se aspiră conținutul godeurilor și se spală fiecare godeu de 3 x cu 300 μ l soluție de spălare. Trebuie să se evite supraîncărcarea și scurgeri din godeurile de reacție. Timpul de uscare dintre spălări este de aproximativ 5 secunde. La final, înainte de ultima etapă, se îndepărtează cu grijă restul de lichid pe hârtie absorbantă.

5. Adăugarea a 100 μ l Lyme *Borrelia* anti-dog IgG conjugat în godeuri, exceptându-l pe cel din poziția A1 (substratul *blank*). Se acoperă cu folie.

6. Incubarea plăcii 30 de minute la temperatura camerei.

7. Repetarea etapei cu numărul 4.

8. Se adaugă 100 μ l TMB soluție substrat în toate godeurile.

9. Incubare timp de 15 minute la temperatura camerei și la întuneric.

10. Adăugarea a 100 μ l soluție stop, în toate godeurile, în aceeași ordine și cu aceeași rată ca cea pentru soluția substrat TMB.

11. Măsurarea absorbanței probelor la 450/620 nm, în primele 30 de minute de la adăugarea soluției stop.

Valorile absorbanței au fost măsurate utilizând cititorul Microreader (Biorad), la o lungime de undă de 450 nm. Interpretarea rezultatelor a fost realizată prin compararea atât a valorii absorbanței unei probe, obținută prin calcularea cutoff-ului, cât și a culorii finale a probelor prin comparație cu cele ale matorului negativ și pozitiv.

6.3.2 Rezultate și discuții

În urma reacției ELISA, din cele 90 de probe testate s-a identificat o singură probă pozitivă, aparținând unei femele în vârstă de patru ani din județul Tulcea. În urma examinării, aceasta era parazitată de două căpușe din specia *Rhipicephalus rossicus*, aflate în stadiul de nimfă. Această specie a fost descrisă drept cea mai abundentă pe câinii din regiunea Deltei Dunării [Sandor și colab., 2014].

Seroprevalența generală a bolii Lyme la câini (1.1%) înregistrată în acest studiu este redusă. Un studiu anterior a raportat o prevalență de 6.25% a anticorpilor anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. [Kiss și colab., 2011], Ilie și colab.

(2012) au obținut o seroprevalență de 18.6% la câinii din regiunea vestică a țării iar în studiul efectuat de Mircean și colab., 0.5% din câinii testați au fost pozitivi la infecție [Mircean și colab., 2012]. În România nu există suficiente date cu privire la epidemiologia bolii Lyme la câine, fiind frecvent raportată în alte țări. În Spania au fost testate 1100 probe de ser recoltate de la câini din diferite regiuni ale țării iar prevalența generală pentru *Borrelia burgdorferi* a fost de 0.4% [Miro și colab., 2013]. Seropozitivitatea în rândul câinilor de vânătoare din Slovacia a fost de 40% în timp ce câinii de serviciu și cei de companie au fost pozitivi într-o proporție de 11.8% – 29.4% [Bhide și colab., 2004]. În perioada 2001–2006 Bowman și colab. au realizat o anchetă la nivel național în SUA ce a inclus testarea serologică a 982.336 de câini pentru anticorpii specifici anti-*B. burgdorferi*. În urma acestui studiu a fost obținută o seroprevalență cuprinsă între 0.1 și 0.5% [Bowman și colab., 2009].

Există anumite limite ce necesită atenție în momentul analizei rezultatelor obținute în acest studiu. Un prim aspect este legat de numărul redus de probe analizate, nefiind reprezentativ pentru întreaga populație de câini din regiune. De asemenea, majoritatea câinilor testați se aflau, la momentul recoltării probelor de ser, ținuti în adăposturi, neavând astfel acces la habitatele specifice căpușelor. Luând în considerare aceste aspecte, putem presupune valori mai ridicate ale seroprevalenței reale în rândul populației canine din România. Rezultatele obținute în cadrul acestei anchete pot fi totuși utilizate pentru a oferi o valoare aproximativă a prevalenței anticorpilor specifici anti-*B. burgdorferi* s.l. la câinii din estul României [Raileanu și colab., 2015].

Pentru a determina zonele endemice de boală Lyme, este indicată efectuarea anchetelor serologice în cadrul categoriilor expuse atacului căpușelor (ex. câini de vânătoare); aceste categorii expuse pot îndeplini rolul de santinelă sau seroindicatori de noi focare. Pentru a înțelege dinamica bolii Lyme dar și a altor infecții transmise de căpușe, sunt necesare eforturi integrate și de colaborare ale specialiștilor din domeniile de sănătate publică și medicină veterinară.

6.3.3 Concluzii parțiale

1. În ciuda faptului că până în acest moment în România nu s-a dovedit prezența virusului FHCC, **datele obținute în acest studiu arată o circulație a virusului în cadrul efectivelor de rumegătoare mici.**
2. Febra hemoragică Crimeea-Congo este o boală cu risc zoonotic important. Având în vedere faptul că **în zona de sud-est a țării există ecosisteme capabile de a întreține infecțiile transmise de căpușe,**

este prezent vectorul competent *Hyalomma marginatum* și au fost evidențiate semnale serologice pozitive la oile și caprele din județele Tulcea și Constanța, **sunt necesare studii epidemiologice și etiologice sistematice pentru a evalua această amenințare.**

3. Conform studiilor efectuate de alți autori, s-a relevat faptul că majoritatea cazurilor de boală Lyme la oameni evoluează în regiuni unde prevalența bolii la câini este ridicată. Astfel, **profilul serologic la câine poate reprezenta un indicator al riscului bolii Lyme pentru om.**
4. În studiul de față, **s-a înregistrat o prevalență redusă a seropozitivității bolii Lyme la câine (1.11%),** comparativ cu valorile înregistrate în alte studii întreprinse în țara noastră. Efectuarea unor anchete serologice în rândul populațiilor de câini la nivel național ar putea duce la stabilirea unor zone de risc pentru infecția produsă de *Borrelia burgdorferi* s.l. la om.

CAPITOLUL VII

IDENTIFICAREA AGENȚILOR PATOGENI ÎN CĂPUȘE NEHRĂNITE (QUESTING) PRIN METODE DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

CHAPTER VII

TICK-BORNE PATHOGENS DETECTION IN QUESTING TICKS

Căpușele reprezintă cei mai importanți vectori biotici din Europa, fiind implicate în producerea de infecții atât la om cât și la animale. *Ixodes ricinus* reprezintă specia dominantă din Europa, fiind distribuită pe întreg continentul. Căpușele acestei specii sunt capabile de transmiterea unei varietăți largi de agenți patogeni (virusuri, bacterii, protozoare). *I. ricinus* reprezintă specia dominantă și pentru România (aprox. 86%) fiind urmată de *Dermacentor marginatus* (9.5%), *Haemaphysalis punctata* (2.6%) și *Dermacentor reticulatus* (0.02%).

În Europa, boala Lyme deține cel mai mare număr de infecții din categoria celor provocate în urma parazitismului căpușelor. Bacteriile din grupul *Borrelia burgdorferi* s.l. provoacă anual circa 80.000 de cazuri.

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 coinfecțiilor în căpușele din Europa are valori cuprinse între 3.2 și 28.8%, acest fapt având importante implicații medicale și reflectă necesitatea identificării coinfecțiilor în căpușele din România.

Obiectivul cercetărilor din cadrul acestui capitol a constat în identificarea celor mai importanți agenți patogeni transmiși de căpușe (bacterii și virusuri) și descrierea prevalenței coinfecțiilor în căpușele nehrănite colectate din trei zone distincte atât geografic cât și din punct de vedere al tipului de habitat.

7.1 MATERIALE ȘI METODE

7.1.1 Zona luată în studiu

Colectarea căpușelor nehrănite s-a efectuat din 19 puncte de colectare, distribuite pe raza a șase județe (Figura 7.1). Metodologia de selecție a punctele de colectare a constat în alegerea a trei categorii diferite din punct de vedere al habitatului și a poziției geografice. Astfel, cele 3 zone alese pentru colectarea căpușelor sunt distribuite în partea de nord a țării (Zona 1 - zonă împădurită), estul țării, pe raza municipiului Iași (Zona 2 – arii recreaționale și de agrement) și sud-estul țării, pe raza județului Tulcea (Zona 3). Colectarea s-a realizat în intervalul orar 10⁰⁰-14⁰⁰, între mai 2013 și septembrie 2014, utilizând metoda drapelului [Egyed și colab., 2012]. Metodologia a constat în colectarea probelor pe lungimea a 5 linii, fiecare a câte 300 de metri, pentru fiecare punct de colectare. Fiecare linie a conținut 10 trageri cu lungimea de 10 metri, distanța dintre fiecare tragere fiind de 20 metri. Prin această metodă, la fiecare punct de colectare, s-a acoperit o suprafață de aproximativ 1.5 hectare. Colectarea din zonele de agrement de pe raza municipiului Iași s-a realizat lunar, în perioada martie – septembrie 2014. Căpușele din celelalte puncte au fost colectate în urma unei singure deplasări, între mai 2013 și septembrie 2014.

Zona de studiu 1 este reprezentată prin șase puncte de colectare de pe raza a patru județe; punctele de colectare au fost selectate ca urmare a situării acestora în vecinătatea așezărilor rurale (46.536747 N, 26.821123 E; 47.23221 N, 26.54634 E ; 46.517207 N, 26.187067 E; 47.780000 N, 25.718600 E; 47.550000 N, 25.950000 E și 47.779500 N, 26.516000 E) (Figura 7.1).

Zona de studiu 2 a cuprins șase puncte de colectare reprezentând zone de recreere și agrement din municipiul Iași [Breazu (47.212044 N, 27.530304 E), C.A. Rosetti (47.204710 N, 27.556685 E), Ciric (47.178178 N, 27.609791 E), Cetățuia (47.132564 N, 27.582936 E), Bârnova (47.059598 N, 27.640815 E) și Bucium 0(47.068330 N, 27.664561 E)] (Figura 7.1). Aceste zone au fost selectate ca urmare a riscului ridicat de interacțiune dintre om și căpușe. Vegetația din aceste zone este reprezentată de păduri suburbane mixte și de foioase [Pavel și colab., 2014].

Zona de studiu 3 este reprezentată de șapte puncte de colectare, aflate în județul Tulcea (45.269722 N, 28.459722 E; 45.215936 N, 28.415648 E; 45.26293 N, 28.16968 E; 44.891311 N, 28.717223 E; 44.873796 N, 28.735763 E; 44.865767 N, 28.810092 E și 44.86309 N, 28.689242 E) (Figura 7.1). Climatul în această regiune este în principal unul de tip arid, parțial de coastă. Este caracterizat de o medie anuală scăzută a precipitațiilor și de valori ridicate



7.1.2 Extracția ADN-ului și a ARN-ului

116

După triturarea probelor, 75 µl din conținutul tubului se transferă într-un tub Eppendorf în care se adaugă 180 µl Buffer T1 și 25 µl proteinaza K. Se omogenizează 5-10 secunde și apoi se incubează la temperatura de 56°C timp de 3 ore până liza este completă. Se omogenizează ocazional în timpul incubăției. Probele se omogenizează câteva secunde, apoi se adaugă 200 µl Buffer B3, se agită din nou și se incubează timp de 10 minute la 70°C. Se adaugă 210 µl de etanol (70°) pe probă și se agită riguros. Pentru fiecare probă, se introduce o coloană „Nucleo-Spin Tissue Column” într-un tub colector. Se depune proba în coloană. Se centrifughează 1 minut la 11000 x g. După centrifugare se pune coloana într-un nou tub colector. Urmează apoi etapele de spălare.

Prima spălare. Se adaugă 500 µl Buffer BW. Se centrifughează 1 minut la 11000 x g. Se aruncă conținutul din tubul colector și se pune coloana la loc.

A doua spălare. Se adaugă 600 µl Buffer B5. Se centrifughează 1 minut la 11000 x g. Se aruncă conținutul din tubul colector și se pune coloana la loc.

Se centrifughează coloana timp de un minut la 11000 x g. În această etapă, etanolul rezidual este îndepărtat.

Eluția ADN-ului pur. Se plasează coloana „NucleoSpin Tissue” într-un tub Eppendorf și se adaugă 50 µl Buffer BE preîncălzit (70°C). Se incubează la temperatura camerei timp de un minut și apoi se centrifughează un minut la 11000 x g.

Extracția ARN-ului s-a realizat cu *kit*-ul Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Duren, Germany), conform protocolului descris în capitolul VI.

7.1.3 Testarea probelor obținute

7.1.3.1 Reacția în lanț a polimerazei (PCR) pentru identificarea *Bartonella* spp. și *Rickettsia* spp.

Probele de ADN au fost testate prin PCR pentru identificarea secvențelor specifice ale *Bartonella* spp. și *Rickettsia* spp. Au fost utilizate amorse specifice genei *gltA* pentru fiecare gen bacterian [Norman și colab., 1995, Regnery și colab., 1991] (Tabel 7.1). Producții PCR au fost amplificate în cadrul unei reacții de amplificare cu Phusion® High-Fidelity PCR Kit (Thermo Scientific, Statele Unite ale Americii).

Toate reacțiile s-au desfășurat în 20 µl volum de reacție, conținând 5 µl ADN, 4 µl 5x soluție tampon PCR, 200 µM pentru fiecare dNTP, 0.5 µl pentru fiecare amorsă și 0.4 µl ADN polimerază.

Tabel 7.1/Table 7.1

Amorse utilizate pentru amplificarea genelor specifice agenților patogeni din căpușe

Primer sets for DNA amplification and sequencing of pathogens in ticks

Ag. patogen	Gena țintă	Primeri	Secvențe de nucleotide (5'- 3')	Amplicon (bp)
<i>Bartonella</i> spp.	<i>gltA</i>	bart781 bart1137	GGGGACCAGCTCATGGTGG AATGCAAAAAGAACAGTAAACA	380-400
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>	Rsf877 Rsf1258	GGGGGCCTGCTCACGGCGG ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	381
<i>Borrelia</i> spp.	23S rRNA	Bo_bu_sl_23S_F Bo_bu_sl_23S_R Bo_bu_sl_23S_P	GAGTCTTAAAGGGCGATTTAGT CTTCAGCCTGGCCATAAATAG AGATGTGGTAGACCCGAAGCCGAGT	73
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto	<i>rpoB</i>	Bo_bu_rpoB_F Bo_bu_rpoB_R Bo_bu_rpoB_P	GCTTACTCACAAAAGGCGTCTT GCACATCTCTTACTTCAAATCCT AATGCTCTTGGACCAGGAGGACTTTCA	83
<i>Borrelia garinii</i>	<i>rpoB</i>	Bo_ga_rpoB_F Bo_ga_rpoB_R Bo_ga_rpoB_P	TGGCCGAACCTACCCACAAAA ACATCTCTTACTTCAAATCCTGC TCTATCTCTTGAAAGTCCCCTGGTCC	88
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>fla</i>	Bo_af_flA_F Bo_af_flA_R Bo_af_flA_P	GGAGCAAATCAAGATGAAGCAAT TGAGCACCTCTTGAACAGG TGCAGCCTGAGCAGCTTGAGCTCC	116
<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>ospA</i>	Bo_va_ospA_F Bo_va_ospA_R Bo_va_ospA_P	ACTCACAATGACAGATGCTGAA GCTTGCTTAAAGTAACAGTACCT TCCGCCTACAAGATTTCTGGAAGCTT	135
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>rpoB</i>	Bo_lus_rpoB_F Bo_lus_rpoB_R Bo_lus_rpoB_P	CGAACTTACTCATAAAAGGCGTC TGGACGTCTCTTACTTCAAATCC TTAATGCTCTCGGGCCTGGGGGACT	87
<i>Borrelia spielmanii</i>	<i>fla</i>	Bo_spi_flA_F Bo_spi_flA_R Bo_spi_flA_P	ATCTATTTTCTGGTGAGGGAGC TCCTTCTTGTTGAGCACCTTC TTGAACAGGCGCAGTCTGAGCAGCTT	71
<i>Borrelia bissetii</i>	<i>rpoB</i>	Bo_bi_rpoB_F Bo_bi_rpoB_R Bo_bi_rpoB_P	GCAACCAGTCAGCTTTCACAG CAAATCCTGCCCTATCCCTTG AAAGTCCTCCCGGCCCAAGAGCATTA	118
<i>Borrelia miyamotoi</i>	<i>glpQ</i>	B_miya_glpQ_F B_miya_glpQ_R B_miya_glpQ_P	CACGACCCAGAAATTGACACA GTGTGAAGTCAGTGGCGTAAT TCGTCCGTTTTCTAGCTCGATTGGG	94

Tabel 7.1/Table 7.1 (Continuare/ Continuation)

Ag. patogen	Gena țintă	Primeri	Secvențe de nucleotide (5' - 3')	Amplicon (bp)
<i>Borrelia</i> spp. (<i>Lyme</i> and <i>Relapsing fever</i>)	IGS	Outer primers: Bosp.-IGS-F Bosp.-IGS-R	GTATGTTTAGTGAGGGGGGTG GGATCATAGCTCAGGTGGTTAG	1007
		Inner primers: Bosp.-IGS-Fi Bosp.-IGS-Ri	AGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG GTCTGATAAACCTGAGGTGCGA	388-685
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>msp2</i>	An_ph_msp2_F An_ph_msp2_R An_ph_msp2_P	GCTATGGAAGGCAGTGTGG GTCTTGAAGCGCTCGTAACC AATCTCAAGCTCAACCCTGGCACCAC	77
<i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>groEL</i>	Neo_mik.groE.F Neo_mik.groEL.R Neo_mik.groEL.P	AGAGACATCATTCGCATTTTGA TTCCGGGTGACCATAAGGCTT AGATGCTGTTGGATGTACTGCTGGACC	96
<i>TBEV</i>	3' non-coding region	F-TBE 1 R-TBE 1 TBE-Probe-WT	GGGCGGTTCTTGTCTCC ACACATCACCTCCTTGTCAGACT TGAGCCACCATCACCCAGACACA	67
	non-structural protein NS5	Outer primers: FSM-1 FSM-2	GAGGCTGAACAACTGCACGA GAACACGTCCATTCTGATCT	357
	non-structural protein NS5	Inner primers: FSM-li FSM-2i	ACGGAACGTGACAAGGCTAG GCTTGTTACCATCTTTGGAG	251

Identificarea speciilor s-a realizat în urma secvențierii fragmentelor specifice (380-400 perechi de baze pentru *Bartonella* spp. și 381 pb pentru *Rickettsia* spp.). Secvențele au fost asamblate prin intermediul programului BioEdit [Hall TA, 1999] și apoi comparate cu baza de date NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Program PCR pentru *Bartonella* spp.

Temperatura	Durata	Nr. de cicluri
98°C	30 s	1
98°C	10 s	35
52°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	10 min	1
4°C	∞	

Program PCR pentru *Rickettsia* spp.

Temperatura	Durata	Nr. de cicluri
98°C	30 s	1
98°C	10 s	35
56°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	10 min	1
4°C	∞	

7.1.3.2 Real time-PCR pentru *A. phagocytophilum*, *Candidatus N. mikurensis* și a speciilor din genul *Borrelia*

Reacțiile PCR în timp real (real-time PCR) s-au efectuat utilizând amorse și sonde specifice genei 23S *rARN* pentru speciile *Borrelia*, gena *msp2* pentru *A. phagocytophilum* și gena *groEL* pentru *Candidatus N. mikurensis* (Tabel 7.1). Toate sondele fluorogene au fost sintetizate prin atașarea unei mecule reporter 6-carboxy-fluorescein (FAM) de capătul 5' și *Black Hole Quencher 1* (BHQ1) la capătul 3'. Reacțiile real-time Taqman PCR au fost efectuate într-un volum final de 12 μ l utilizând LightCycler® 480 Probe Master mix (Roche Applied Science, Germany) la o concentrație finală 1x, amorsele și sondele la 20 nM și o cantitate de 2 μ l de ADN. Fiecare reacție a inclus un martor pozitiv și unul negativ (apă bidistilată). Programul termic a constat în tratarea la 95°C pentru 5 min urmată de 45 cicluri la 95°C pentru 10 s apoi 60°C pentru 15 s, cu o etapă de răcire finală la 40°C pentru 10 s.

7.1.3.3 Identificarea speciilor *Borrelia*

Toate probele pozitive obținute în urma reacției real-time PCR au fost apoi incluse într-o reacție de amplificare prin *nested* PCR având drept țintă gena *IGS 16S-23S ARNr* [Bunikis și colab., 2004]. Amplificarea s-a efectuat utilizând Phusion® High-Fidelity PCR Kit. Reacția PCR s-a desfășurat în 20 μ l volum de reacție final (5 μ l ADN de testat, 4 μ l 5x tampon PCR, 200 μ M pentru fiecare dNTP, 0.5 μ M pentru fiecare amorsă și 0.4 U Phusion ADN polimerază) (tabel 3.1). Programul PCR s-a desfășurat astfel: 98°C pentru 30 s, 35 cicluri la 98°C pentru 10 s, apoi 56°C pentru 30 s și 72°C pentru 60 s, cu o etapă de elongare finală la 72°C pentru 10 minute. *Nested* PCR a fost efectuat sub aceleași condiții (20 μ l volum final) și în cazul utilizării amorselor interne având temperatura de atașare de 58°C. Produșii de amplificare au fost secvențiați de către Eurofins MWG Operon, secvențele obținute fiind asamblate în programul BioEdit și apoi comparate cu baza de date NCBI.

Probele pozitive pentru *Borrelia* spp. obținute în cadrul reacției PCR în timp real care nu au putut fi identificate la nivel de specie prin *nested*-PCR au fost incluse într-o altă reacție PCR în timp real, utilizând primeri și sonde specifice a șapte specii diferite din genul *Borrelia*: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* și *B. bissetti* (Tabel 7.1).

7.1.3.4 Real time RT-PCR pentru identificarea virusului encefalitei de căpușă (TBEV) și a virusului EYACH

Probele de ARN au fost testate prin reacția rRT-PCR ce a urmărit amplificarea unei regiuni 3' non-codante pentru virusul encefalitei de căpușă [Schwaiger și colab., 2003] și a genei VP2 pentru virusul Eyach, utilizând amorse și sonde specifice. Reacțiile rRT-PCR Taqman au fost efectuate în 20 μ l volum final de reacție, utilizând LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes master mix (Roche Applied Science, Germania) la concentrație finală de 1x, cu 0.5 μ M amorse specifice, 0.25 μ M sonde, 3.25 mM acetat de mangan [$\text{Mn}(\text{OAc})_2$] și 2 μ l ARN de testat. Toate reacțiile au inclus un martor negativ (apă) și unul pozitiv. Condițiile termice pentru rRT-PCR au fost: 63°C pentru 3 min, 95°C pentru 30 s, 45 cicluri la 95°C pentru 10 s, apoi 60°C pentru 30 s, urmând apoi o etapă de răcire la 40°C pentru 10 s. Probele pozitive pentru TBEV au fost apoi incluse într-o reacție *one-step* RT-PCR și *nested* PCR pentru identificarea proteinei non-structurale NS5 [Puchhammer-Stockl și colab., 1995]. Probele pozitive de ARN au fost revers transcrise cu ajutorul Titan One Tube RT-PCR Systems (Roche Applied Science, Germania) într-un volum de reacție de 50 μ l (10 μ l ARN din căpușe, 10 μ l 5x tampon RT-PCR, 200 μ M pentru fiecare dNTP, 0.4 μ M pentru fiecare primer, 1 μ l mix de enzime și 500 μ M dithiothreitol - DTT). Programul termic s-a desfășurat astfel: 50°C pentru 30 min, 95°C pentru 3 min urmat apoi de 35 cicluri la 95°C pentru 30 s, 40°C pentru 30 s, și 72°C for 30 s, cu o etapă finală la 72°C pentru 5 min. *Nested*-PCR s-a realizat cu *kit*-ul Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR, într-un volum final de 50 μ l: 5 μ l ADN-ul complementar de testat (ADNc), 10 μ l 5x tampon PCR, 200 μ M din fiecare dNTP, 0.5 μ M pentru fiecare primer intern și 1 U Phusion ADN polimerază. Condițiile termice au fost: 98°C pentru 30s, apoi 35 cicluri la 98°C pentru 10 s, 53°C timp de 30 s, și 72°C timp de 60 s și etapa de elongație finală, 72°C pentru 10 min.

7.1.4 Analiza statistică

Rezultatele obținute au fost procesate prin intermediul programului IBM SPSS® Statistics version 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, USA). Analiza unidirecțională a variației (ANOVA)-testul Bonferoni posthoc s-a efectuat asupra ratei de infecție a grupurilor distincte din punct de vedere geografic. Compararea prevalenței între stadiile de dezvoltare a căpușelor a fost efectuată utilizând *Independent-Samples T-Test*. În cadrul semnificației statistice, valoarea p (p -value) este prezentată în paranteze.

Diferențele dintre grupuri au fost considerate statistic semnificative în situațiile unde $p\text{-value} < 0.05$.

7.2 REZULTATE OBȚINUTE

7.2.1 Agenți patogeni bacterieni 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 cu unul sau mai mulți agenți patogeni a avut o valoare de 47.9% (256/534). Căpușele *I. ricinus* din zona 3 au fost infectate într-un procent de 61.1% (104/170). Această prevalență a fost semnificativ mai mare decât cea înregistrată pentru căpușele din zona 2 (40.4%; 120/297) ($p < 0.05$) însă fără a fi statistic diferită de rata infecției obținută în zona 1 (47.7%). Rata de infecție nu a prezentat diferențe statistic semnificative între căpușele adulte (60.9%; 39/64) și nimfe (47.4%; 217/457).

Borrelia spp. a fost identificată în 164 (30.7%) 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) iar nimfele în procent de 30.4% (139/457) (Figura 7.2). În ceea ce privește diferențele observate între cele trei zone de colectare, rata de infecție cu *Borrelia* spp. a fost semnificativ mai mare în căpușele din zona 3 (sud-estul României), comparativ cu zonele 1 și 2 (60% vs 25% sau 31% la adulți și 46% vs 22% sau 21% în cazul nimfelor) ($p < 0.05$) (Figura 7.2, Tabel 7.2). 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. Probele au fost trimise pentru secvențiere iar în urma prelucrării cinci secvențe au fost încadrate drept *B. valaisiana* (identitate 97%, nr. acces GenBank CP009117.1) și o secvență *B. afzelii* (identitate 99%, nr. acces GenBank CP009058.1). Patru secvențe adiționale au avut o calitate scăzută, trei au exprimat 75% identitate cu *Uncultured Borrelia* sp. (nr. acces GenBank JQ693994.1) și o secvență a avut 75% identitate cu *B. afzelii* (nr. acces GenBank FJ750349.1). Cinci căpușe *I. ricinus* au fost diagnosticate pozitiv pentru infecția cu *B. miyamotoi*, agentul febrei recurente. Patru secvențe din cele cinci pozitive au prezentat 100% identitate cu *B. miyamotoi* - nr. acces GenBank KP202177.1.

Tabel 7.2/Table7.2

Numărul total de căpușe testate și agenții patogeni identificați
Total number of questing ticks and identified pathogens according to sampling area

Zona studiu	Specia	Nr. de căpușe testate			Agenții patogeni testați												
					<i>Borrelia</i> spp.			<i>A. phago.</i>		<i>Rickettsia</i> spp.			<i>Bartonella</i> spp.			<i>C. N. mikurensis</i>	
		A	N	Total	A/%	N/%	T/%	N/%	T/%	A/%	N/%	T/%	A/%	N/%	T/%	N/%	T/%
Zona 1	<i>I. r.</i>	8	59	67	2/25	13/22	15/22.3	1/1.6	1/1.4	3/37.5	10/16.9	13/19.4		3/5	3/4.4	5/8.4	5/7.4
	<i>I. r.</i>	64	233	297	20/31.2	50/21.4	70/23.5			8/12.5	33/14.1	41/13.8	6/9.3	12/5.1	18/6	3/1.2	3/1
Zona 2	<i>H. p.</i>	3	11	14		1/9	1/7.1				1/9	1/7.1		1/9	1/7.1		
	<i>D. r.</i>	4		4						1/25		1/25					
	Total	71	244	315			71/22.5			9/12.6	34/13.9	43/13.6	6/8.4	13/5.3	19/6	3/1.2	3/0.9
Zona 3	<i>I. r.</i>	5	165	170	3/60	76/46	79/46.4	6/3.6	6/3.5	1/20	23/13.9	24/14.1		1/0.6	1/0.5	21/12.7	21/12.3
	<i>H. p.</i>		5	5													
	Total	5	170	175			79/45.1		6/3.4			24/14.1			1/0.5		
Total		84	473	557	25/29.7	140/29.5	165/29.6	7/1.4	7/1.2	13/15.4	67/14.1	80/14.3	6/7.1	17/3.6	23/4.1	29/6.1	29/5.2

Prevalența fiecărui agent patogen este exprimată și ca procent de căpușe pozitive pentru agentul respectiv; *I.r.* – *Ixodes ricinus*; *H.p.* – *Haemaphysalis punctata*; *D.r.* – *Dermacentor reticulatus*; A – Adult; N – Nimfă; *A. phago.* – *Anaplasma phagocytophilum*; T - total.

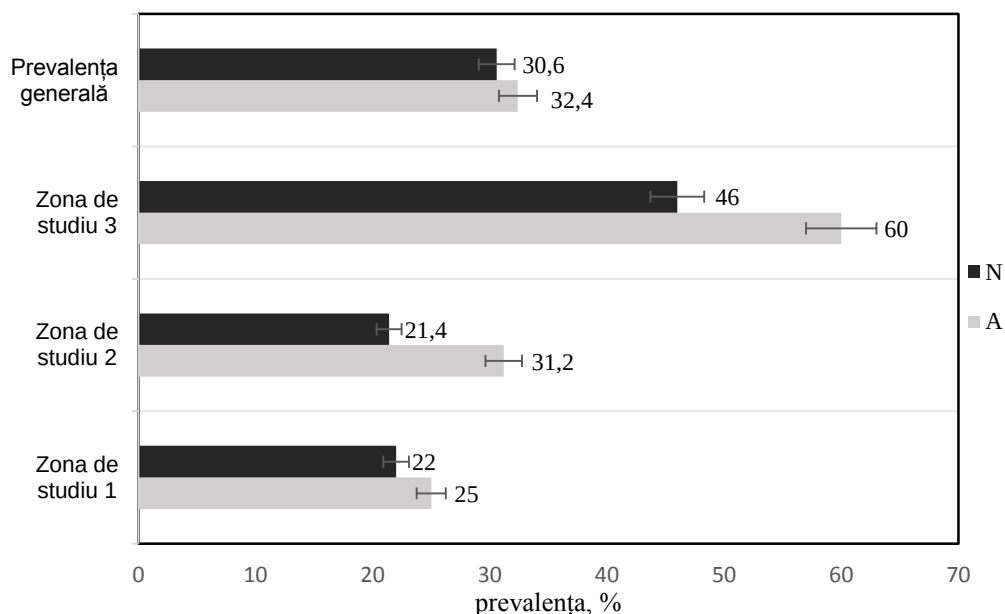


Figura 7.2 Prevalența *Borrelia* spp. în căpușele nehrănite *I. ricinus*
Figure 7.2 DNA prevalence of *Borrelia* spp. in questing *I. ricinus* ticks

În urma reacției *nested*-PCR, 144 de probe pozitive inițial 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* (Tabel 7.3). Gena *rpoB* specifică speciei *B. burgdorferi sensu stricto* a fost detectată în două nimfe din zonele 1 și 2. *Borrelia garinii rpoB* a fost identificată în 79 căpușe *I. ricinus* (zona 1= 11 nimfe; zona 2=26: 9 adulți și 17 nimfe; zona 3= 42: 2 adulți și 40 nimfe). Alte 46 de căpușe au fost pozitive pentru infecția cu *B. afzelii* (zona 1= 10 nimfe; zona 2=20: 4 adulți și 16 nimfe; zona 3=16: 1 adult și 15 nimfe).

Borrelia valaisiana ospA a fost găsită în 26 de căpușe (zona 1=1 nimfă *I. ricinus*; zona 2=9: 3 adulți și 6 nimfe; zona 3=16 căpușe aflate în stadiul de nimfă).

De asemenea, 26 de căpușe au fost pozitive pentru *B. lusitaniae rpoB* (zona 1=2 nimfe; zona 2=5: 2 adulți și 3 nimfe; zona 3=19: 1 adult și 18 nimfe); *B. spielmanii* a fost identificată în șase căpușe din zonele 2 și 3 (zona 2: 1 adult și 2 nimfe și 3 nimfe din zona 3) iar o nimfă din zona 1 a fost pozitivă pentru infecția cu *B. bissetti* (Tabel 7.3).

Tabel 7.3/Table 7.3

Speciile *Borrelia* identificate în căpușele *Ixodes ricinus* (%)
***Borrelia* species identified in *Ixodes ricinus* ticks (%)**

Zona studiu	Nr. probe	<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. val.</i>	<i>B. lusit.</i>	<i>B. spiel.</i>	<i>B. burgd. ss</i>	<i>B. bissetti</i>	<i>B. miya.</i>
Zona 1	A (8)								
	N (59)	11/18.6	10/16.9	1/1.6	2/3.3		1/1.6	1/1.6	1/1.6
Zona 2	A (64)	9/14	4/6.2	3/4.6	2/3.1	1/1.5			1/1.5
	N (233)	17/7.2	16/6.8	6/2.5	3/1.2	2/0.8	1/0.4		3/1.2
Zona 3	A (5)	2/40	1/20		1/20				
	N (165)	40/24.2	15/9	16/9.6	18/10.9	3/1.8			
Total	A (77)	11/14.2	5/6.4	3/3.8	3/3.8	1/1.2			1/1.2
	N (457)	68/14.8	41/9.1	23/5	23/5	5/1	2/0.4	1/0.2	4/0.8

A: Adulți; N: Nimfe; *B. val.*: *B. valaisiana*; *B. lusit.*: *B. lusitaniae*; *B. spiel.*: *B. spielmanii*; *B. burgd. ss*: *B. burgdorferi* ss; *B. miya.*: *B. miyamotoi*.

Prevalența generală în căpușele *I. ricinus* testate a fost de 14.7% pentru *B. garinii* (14.2% adulți și 14.8% nimfe), 8.8% pentru *B. afzelii* (6.4% adulți și 9.1% nimfe), 4.8% pentru *B. valaisiana* (3.8% adulți și 5% nimfe), 4.8% pentru *B. lusitaniae* (3.8% adulți și 5% nimfe), 1.1% pentru *B. spielmanii* (1.2% adulți și 1% nimfe), 0.9% pentru *B. miyamotoi* (1.2% adulți și 0.8% nimfe), 0.3% pentru *B. burgdorferi sensu stricto* (0.4% nimfe) și 0.1% pentru *B. bissetti* (0.2% nimfe) (Figura 7.3).

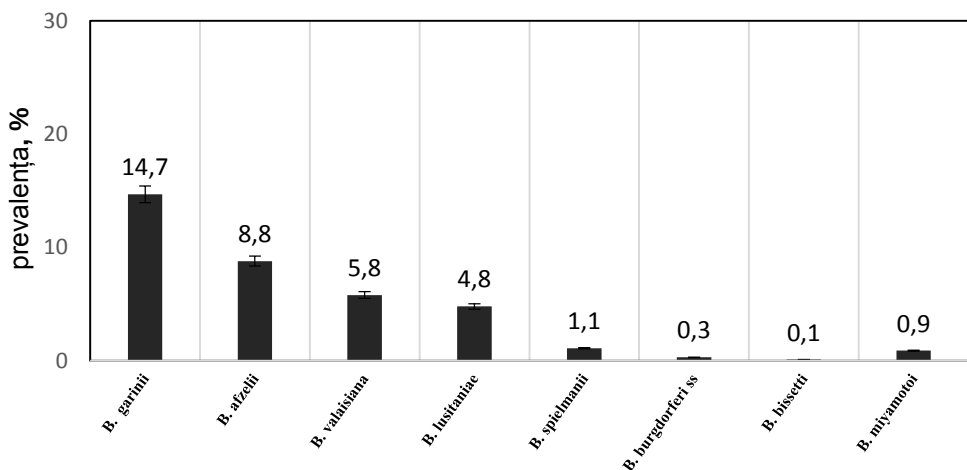


Figura 7.3 Prevalența speciilor *Borrelia* în căpușele *Ixodes ricinus*
Figure 7.3 Prevalence of *Borrelia* species in *Ixodes ricinus* ticks

Anaplasma phagocytophilum a fost identificată în 7/534 (1.3%) căpușe *I. ricinus*, aflate în stadiul de nimfă (Figura 7.4, Tabel 7.2). Prevalența în căpușele colectate din zona 1 a fost de 1.4% (1/67) iar în zona 3 de 3.5% (6/170). Căpușele colectate din zona 2 nu au fost pozitive la infecție.

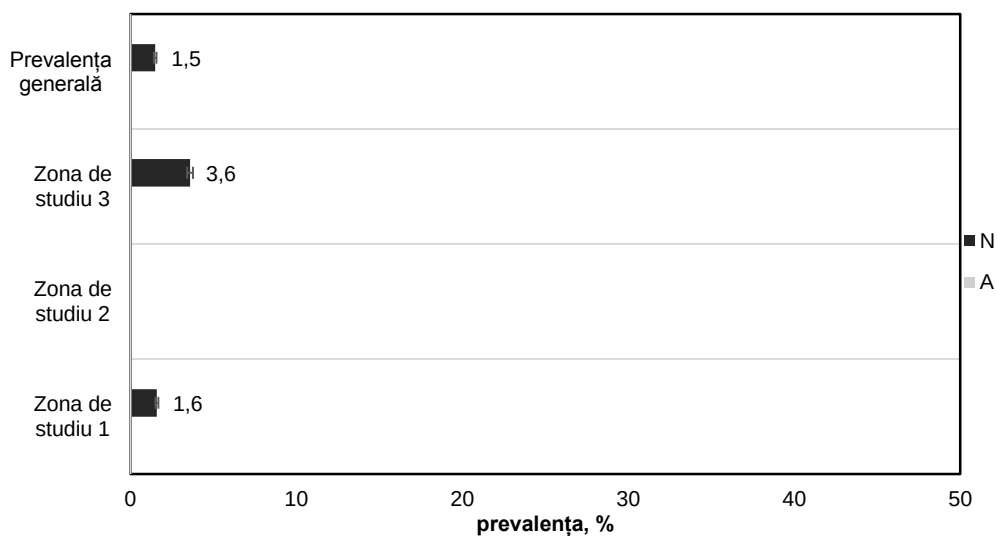


Figura 7.4 Prevalența *A. phagocytophilum* în căpușele *Ixodes ricinus*
Figure 7.4 Prevalence of *A. phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks

Rickettsia spp. a fost observată în 78/534 (14.6%) căpușe *I. ricinus* (Tabel 7.2). 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 (Figura 7.5). Cea mai ridicată rată a prevalenței a fost observată în zona 1 (19.4%), celelalte două zone având valori apropiate (13.8% în zona 2 și respectiv 14.1% în zona 3). Produșii PCR au fost secvențiați, obținându-se 19 secvențe *gltA* cu identitate de 99-100% cu specia și o secvență *R. helvetica* cu identitate 95%. Numerele de acces în Genbank sunt după cum urmează: AM418450.1 (n=2); JX040636.1 (n=8); KJ663745.1 (n=7); și KF447530.1 (n=3). Alte 33 de secvențe au prezentat identitate de 99-100% cu *R. monacensis* [numerele de acces în Genbank: JX003686.1 (n=14); KJ663734.1 (n=6); JX040639.1 (n=5); JX040640.1 (n=4); KJ663735.1 (n=3); and KC996728.1 (n=1)]. În cele din urmă, o secvență a fost descrisă ca având o identitate de 99% cu *uncultured Rickettsia* sp. clone 403ER/1, nr. de acces în GenBank : JN849396.1. *Rickettsia helvetica* a avut o rată medie a infecției de 3,7% (1.2% în căpușele adulte și 4.1% în nimfe) iar *R. monacensis* a fost prezentă în 6.1%

din căpușele testate (10.3% din adulți și 5.4% din nimfe). Pentru celelalte 25 probe pozitive la infecția cu *Rickettsia* spp. nu au fost obținute secvențe valide.

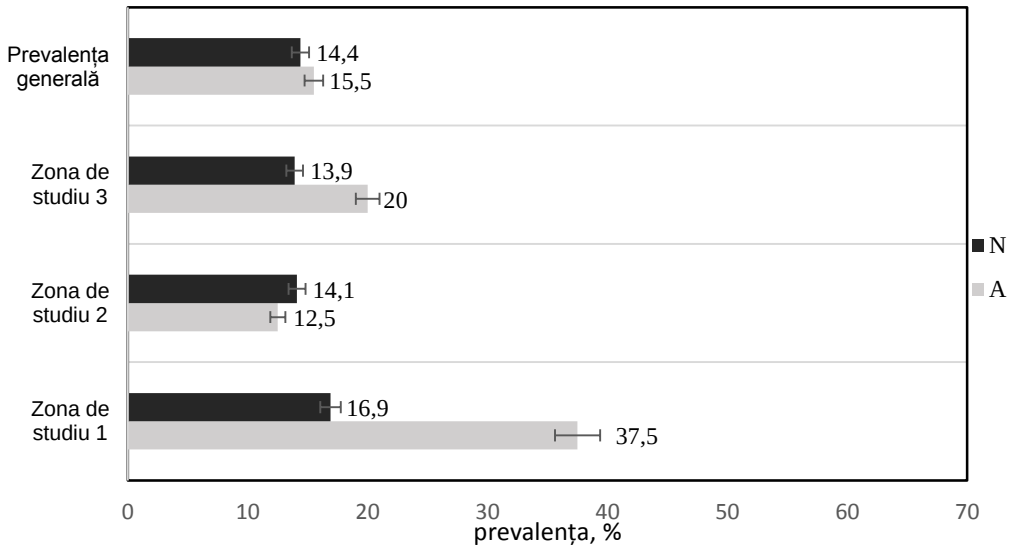


Figura 7.5 Prevalența *Rickettsia* spp. în căpușele *Ixodes ricinus*
Figure 7.5 Prevalence of *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks

Bartonella spp. a fost identificată în 22 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) din nimfe au prezentat produși de amplificare specifici genului *Bartonella* (Figura 7.6). A fost descrisă o diferență statistic semnificativă între prevalența *Bartonella* spp. în căpușele colectate din zona 2 (6%) cu cea din zona 3 (0.5%) ($p < 0.05$), în timp ce zona 1 a înregistrat o valoare de 4.4%. Secvențierea a determinat încadrarea unei singure secvențe cu identitate 100% ca fiind *B. henselae* (nr de acces Genbank: HG965802.1).

Secvențe specifice speciei *C. N. mikurensis* au fost identificate în 5.4% (29/534) din căpușele testate, toate aflate în stadiul de nimfă, cu o prevalență de 6.3% (29/457) (Figura 7.7). O rată mai mare a prevalenței a fost observată în zona 1 (8.4%) comparativ cu zona 2 (1.2%); de asemenea, rata de infecție din zona 3 a prezentat o diferență statistic semnificativă comparativ cu zona 2 ($p < 0.05$).

Căpușele *I. ricinus* au înregistrat de asemenea asocieri între doi și trei agenți patogeni. Coinfecțiile au fost observate într-un număr total de 96 (96/534; 17.9%) de căpușe, reprezentând 37.5% (96/256) din totalul celor infectate.

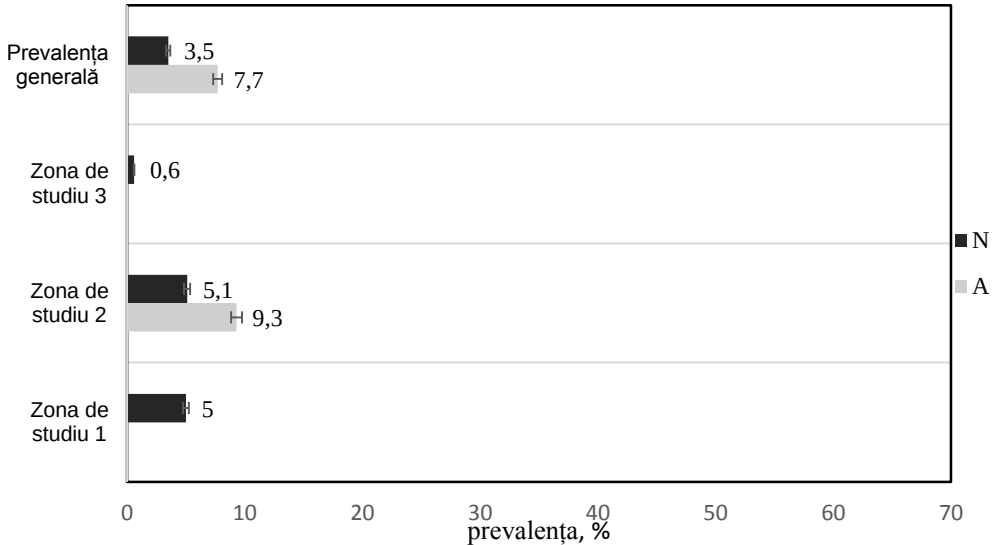


Figura 7.6 Prevalența *Bartonella* spp. în căpușele *Ixodes ricinus*
Figure 7.6 Prevalence of *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* ticks

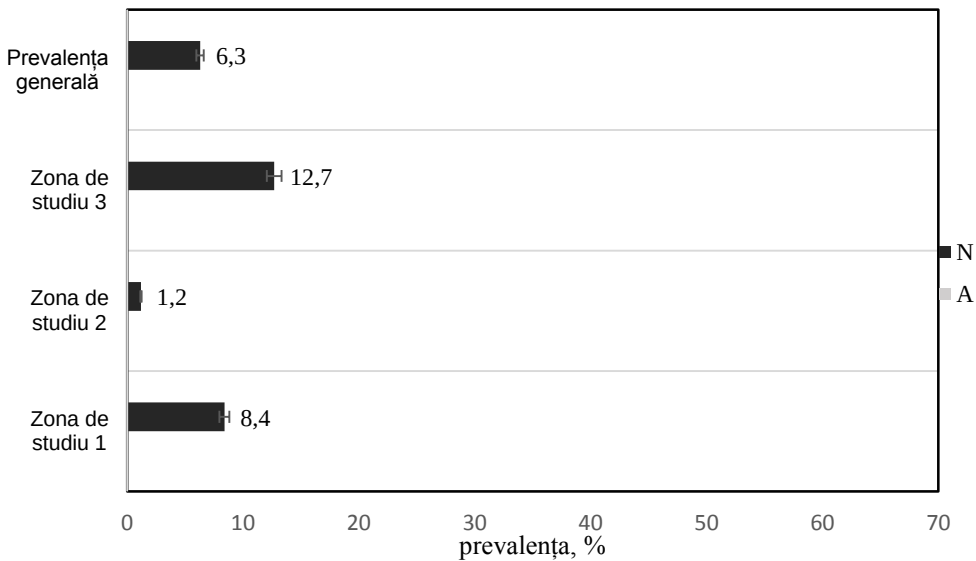


Figura 7.7 Prevalența *C. N. mikurensis* în căpușele *Ixodes ricinus*
Figure 7.7 Prevalence of *C. N. mikurensis* in *Ixodes ricinus* ticks

Prevalența coinfecțiilor în cadrul adulților a fost de 15.5% (12/77) iar pentru nimfe a fost identificată o rată de 18.3% (84/457). Căpușele din zona 1 coinfectate au reprezentat 17.9% (12/67; 25% căpușe adulte și 16.9% nimfe);

în zona 2, rata de infecție a asocierii de agenți patogeni în căpușe a fost 11.4% (34/297: 12.5% adulți și 11.1% nimfe) iar în zona 3 a avut o valoare de 29.4% (50/170: 40% adulți și 29% nimfe).

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). Asocierea a trei specii, regăsită în opt căpușe, a avut aceeași componență în patru probe - *B. garinii*, *B. afzelii* și *B. valaisiana* (Tabel 7.4). În ceea ce privește distribuția infecțiilor multiple cu specii *Borrelia* pe stadii de dezvoltare, stadiul de adult *I. ricinus* a înregistrat o rată de 11.6% (9/77) iar nimfele de 12.2% (56/457), cu asocieri de două sau trei genospecii.

Prevalența infecțiilor multiple cu specii *Borrelia* a fost de 12.1% (65/534). În rândul căpușelor adulte a fost obținută o prevalență de 11.6% iar nimfele au avut o rată similară de 12.2%. În zona 1, 13.4% (9/67) din căpușele testate au fost pozitive la infecția cu specii *Borrelia*, prevalența în rândul căpușelor adulte (37.5%) fiind semnificativ mai mare decât cea înregistrată pentru nimfe (10.1%). În zona 2 am identificat 7% (21/297) căpușe pozitive pentru asocieri ale speciilor *Borrelia*. Rata de căpușe adulte pozitive a fost de 6.2% iar pentru nimfe de 7.2%. Prevalența infecțiilor multiple cu specii *Borrelia* în căpușele din zona 3 a reprezentat 20.5% (35/170). Căpușele adulte din zona 3 au fost infectate într-un procent semnificativ mai mare (40%) comparativ cu nimfele (20%).

Căpușele *I. ricinus* au înregistrat coinfecții cu speciile de *Borrelia* și alți agenți patogeni testați în cadrul acestui studiu. Coinfecțiile au fost detectate în 8.2% căpușe *I. ricinus* (44/534); stadiul adult din toate cele trei zone luate în studiu a fost pozitiv în proporție de 6.4% iar prevalența în rândul nimfelor a fost de 8.5%. În zona 1, 8.9% (6/67) din căpușele testate au fost pozitive pentru coinfecții, dintre care 25% au fost căpușe adulte și 6.7% nimfe. Căpușele pozitive la coinfecții din zona 2 au avut o prevalență de 4.7% (14/297). Procentul de infecție al stadiilor de dezvoltare din zona 2 a fost de 4.6% pentru căpușele adulte și 4.7% pentru nimfe. Căpușele din zona 3 pozitive la coinfecții au avut o prevalență de 14.1% (24/170) fiind reprezentate doar de stadiul nimfal.

În ceea ce privește coinfecțiile dintre doi agenți patogeni, respectiv o specie *Borrelia* și alt gen bacterian, acestea au fost identificate în 4.1% căpușe *I. ricinus* (22/534). Nouă căpușe au fost pozitive pentru infecția cu *Borrelia* spp. și *Rickettsia* spp. iar șapte ectoparaziți au fost infectați cu *Borrelia* spp. și C.N.

mikurensis. Am identificat 0.9% căpușe (5/534) pozitive pentru asocierea a doi agenți patogeni, alții decât specii din genul *Borrelia*.

Coinfecții cu două specii *Borrelia* și un alt patogen au fost observate în 2.2% din probe (12/534). Nouă căpușe au fost pozitive la infecția cu două specii *Borrelia* și o specie *Rickettsia*. Patru căpușe, reprezentând 0.7% (4/534) din probele testate, au fost infectate cu o specie a genului *Borrelia* și alți doi agenți patogeni (trei căpușe au fost pozitive pentru asocierea dintre *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. și *C. N. mikurensis*) iar un individ a fost pozitiv pentru trei specii diferite ale genului *Borrelia* (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae*) și *C. N. mikurensis* (Tabel 7.5).

7.2.2 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele *Dermacentor reticulatus*

În urma colectării prin metoda drapelului, s-au capturat patru femele *D. reticulatus* (4/557; 0.7%), acestea fiind găsite în zona 2 (Tabel 7.2). 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 constatată o identitate de 99% cu *Rickettsia raoultii* (nr. acces în GenBank KJ663737.1).

7.2.3 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele *Haemaphysalis punctata*

Specia *H. punctata* reprezintă 3.4% din numărul total de căpușe colectate, fiind identificați 19 indivizi (trei adulți și 16 nimfe). Au fost detectate trei nimfe pozitive (3/19; 15.7%), fiecare cu câte un agent patogen diferit, dintre cei incluși în cadrul acestui studiu.

ADN-ul specific *Borrelia* spp. a fost identificat la o nimfă colectată din zona 2 (Tabel 7.2). Produsul PCR a fost secvențiat cu succes, secvența având o identitate de 94% cu *Borrelia miyamotoi* (nr. acces în GenBank CP010308.1). *Rickettsia* spp. a fost diagnosticată într-o nimfă de asemenea colectată din zona 2. Secvențierea nu a oferit o secvență validă pentru produsul PCR obținut. ADN-ul *Bartonella* spp. a fost observat într-o nimfă *H. punctata* localizată în zona 2. Secvențierea nu a permis încadrarea produsului PCR. În urma testării celor 19 căpușe *H. punctata*, nu au fost obținute probe pozitive pentru infecția cu mai mulți agenți patogeni.

Tabel 7.4/Table 7.4

Asocieri de două și trei specii de *Borrelia* în căpușele *Ixodes ricinus*
Association of two and three *Borrelia* species in *Ixodes ricinus* ticks (%)

Zona studiu	Probe colectate	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i> + <i>B. val.</i>	<i>B. garinii</i> + <i>B. lusit.</i>	<i>B. garinii</i> + <i>B. spiel.</i>	<i>B. afzelii</i> + <i>B. bissetti</i>	<i>B. afzelii</i> + <i>B. lusit.</i>	<i>B. val.</i> + <i>B. spiel.</i>	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. lusitaniae</i>	<i>B. garinii</i> + <i>B. val.</i> + <i>B. lusit.</i>	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. val.</i>	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. spiel.</i>
Zona 1	A (8)	1/12.5		1/12.5						1/12.5		
	N (59)	5/8.4				1/1.6						
Zona 2	A (64)	3/4.6										1/1.5
	N (233)	10/4.2		1/0.4	2/0.8		1/0.4		2/0.8		1/0.4	
Zona 3	A (5)	1/20		1/20								
	N (165)	10/6	3/1.8	15/9	1/0.6			1/0.6			3/1.8	
Total	A (77)	5/6.4		2/2.5						1/1.2		1/1.2
	N (457)	25/5.4	3/0.6	16/3.5	3/0.6	1/0.2	1/0.2	1/0.2	2/0.4		4/0.8	

A: Adulți; N: Nimfe; *B. lusit.*: *Borrelia lusitaniae*; *B. val.*: *Borrelia valaisiana*; *B. spiel.*: *Borrelia spielmanii*

Tabel 7.5/Table 7.5

Coinfecții în căpușele *Ixodes ricinus*
Co-infections in *Ixodes ricinus* ticks

Asocieri ale agenților patogeni	Zona 1			Zona 2			Zona 3			Total		
	A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total
<i>B. garinii</i> + <i>B.afzelii</i>		5	5	3	9	12	1	5	6	4	19	23
<i>B.afzelii</i> + <i>B. bissetti</i>		1	1								1	1
<i>B. garinii</i> + <i>B. spielmanii</i>					2	2		1	1		3	3
<i>B. garinii</i> + <i>B. lusitaniae</i>					1	1	1	12	13	1	13	14
<i>B. afzelii</i> + <i>B. lusitaniae</i>					1	1		2	2		3	3
<i>B. garinii</i> + <i>B. valaisiana</i>								1	1		1	1
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. lusitaniae</i>					1	1					1	1
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. spielmanii</i>				1		1				1		1
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i>					1	1		3	3		4	4
<i>B. garinii</i> + <i>B. valaisiana</i> + <i>B. lusitaniae</i>				1		1				1		1
<i>B. afzelii</i> + <i>Rickettsia</i> spp.		1	1								1	1
<i>B. miyamotoi</i> + C N miku		1	1								1	1
<i>B. valaisiana</i> + <i>R. monacensis</i>				1		1				1		1
<i>B. garinii</i> + <i>R. monacensis</i>					1	1		1	1		2	2
<i>B. valaisiana</i> + <i>Barto. spp.</i>				1	1	2				1	1	2
<i>B. valaisiana</i> + <i>Rickettsia</i> spp.					1	1					1	1
<i>B. miyamotoi</i> + <i>Barto</i> spp.					1	1					1	1
<i>B.afzelii</i> + C N miku					2	2					2	2
<i>B. garinii</i> + <i>Barto. spp.</i>					1	1					1	1
<i>B. spielmanii</i> + <i>A phago</i>								1	1		1	1
<i>B. garinii</i> + <i>Rickettsia</i> spp.								1	1		1	1

Tabel 7.5/Table 7.5 (Continuare/Continuation)

Asocieri ale agenților patogeni	Zona 1			Zona 2			Zona 3			Total		
	A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total
<i>B. valaisiana</i> + C N miku							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + C N miku							1	1		1	1	
<i>B. valaisiana</i> + C N miku							1	1		1	1	
<i>B. afzelii</i> + <i>R. helvetica</i>							1	1		1	1	
<i>Borrelia</i> spp. + C N miku							1	1		1	1	
<i>Borrelia</i> spp. + <i>R. monacensis</i>				1		1	1	1		1	1	2
<i>Borrelia</i> spp. + <i>Barto.</i> spp.					1	1				1	1	
<i>A phago</i> + C N miku		1	1							1	1	
<i>Barto.</i> spp. + <i>R. helvetica</i>		1	1		1	1				2	2	
<i>R. helvetica</i> + <i>A phago</i>							1	1		1	1	
<i>R. monacensis</i> + <i>A phago</i>							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + <i>Rickettsia</i> spp.	1		1							1		1
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>Rickettsia</i> spp.	1		1		1	1	1	1		1	2	3
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>R. monacensis</i>							1	1		1	1	
<i>B. valaisiana</i> + <i>B. spielmanii</i> + <i>R. monacensis</i>							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>B. valaisiana</i> + <i>R. helvetica</i>							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>A phago</i>							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + <i>Rickettsia</i> spp.							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>R. monacensis</i>							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + C N miku							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>B. valaisiana</i> + C N miku							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>R. helvetica</i> + <i>Barto</i> spp.							1	1		1	1	
<i>B. valaisiana</i> + <i>R. monacensis</i> + C N miku							1	1		1	1	
<i>B. valaisiana</i> + <i>Rickettsia</i> spp. + C N miku							1	1		1	1	
<i>Borrelia</i> spp. + <i>R. monacensis</i> + C N miku							1	1		1	1	
<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + C N miku					1	1				1	1	
Total	2	10	12	8	26	34	2	48	50	12	84	96

7.2.4 Agenți patogeni virali cercetați în căpușele testate

În urma testării prin rRT-PCR, virusul encefalitei de căpușă a fost detectat în 10 probe de ARN. Ulterior, pentru confirmare, probele au fost incluse într-o reacție *nested*-PCR însă toate au fost identificate drept negative. Detecția virusului Eyach s-a încercat prin rRT-PCR, urmărind amplificarea genei VP2. Toate probele testate pentru acest agent viral au fost negative.

7.3 DISCUȚII

Scopul acestui studiu l-a reprezentat identificarea principalilor agenți patogeni transmiși de căpușe și de asemenea stabilirea ratei de infecție a acestora în căpușele nehrănite colectate din trei zone distincte din punct de vedere geografic cât și ca ecosistem. Astfel, a fost cercetată prezența a șapte agenți patogeni majori: cinci agenți bacterieni (*Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*) și doi agenți virali (virusul Eyach și virusul encefalitei de căpușă), în trei specii de căpușe (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* și *Haemaphysalis punctata*) colectate din estul României.

7.3.1 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele

Ixodes ricinus

Ixodes ricinus reprezintă cea mai răspândită specie de pe continentul european [Reis și colab., 2011] și este de asemenea specia cel mai des întâlnită în zonele împădurite din România [Mihalca și colab., 2012c]. Este cunoscut faptul că prezintă o arie foarte largă în ceea ce privește diversitatea speciilor gazdă, fiind capabilă să paraziteze peste 300 de specii de mamifere, păsări și reptile [Mihalca și colab., 2013]. În plus, căpușele *I. ricinus* pot îndeplini sarcina de vector pentru numeroși agenți patogeni cu importanță pentru sănătatea umană. Principalii reprezentanți în această categorie sunt: virusul encefalitei de căpușă - subtipul vestic european (TBEv-Eur), responsabil de producerea encefalitei de căpușă și spirochetele din complexul *B. burgdorferi* s.l., agentul bolii Lyme la om [Rizzoli și colab., 2014].

În cadrul acestui studiu au fost constatate rate ridicate ale prevalenței *B. burgdorferi* s.l. în căpușele *I. ricinus* din estul țării. Prevalența generală, pentru toate zonele de colectare, a fost puțin peste 30%, mai ridicată comparativ cu valorile raportate în studii anterioare de prevalență a agentului bolii Lyme în

căpușele nehrănite [Coipan și colab., 2011, Kalmar și colab., 2013]. Acest rezultat poate semnifica o creștere în timp a prevalenței speciilor *Borrelia* în căpușele nehrănite, lucru confirmat în alte țări europene [Wojcik-Fatla și colab., 2016].

Infecția cu *Borrelia burgdorferi* s.l. în căpușele *I. ricinus* reprezintă un risc crescut pentru om mai ales în zona 2, punctele de colectare fiind des frecventate de persoane efectuând activități de agrement și recreaționale. Riscul bolii Lyme pentru om este conectat de frecvența posibilului contact cu o căpușă (nimfă sau adult) infectată cu agentul patogen specific bolii [Fedorova și colab., 2014]. Astfel, în zona 2 există un risc ridicat pentru infecția cu agentul bolii Lyme, aspect susținut și de prevalența mare (~23%) a căpușelor pozitive pentru *Borrelia* spp. De fapt, rata de infecție a fost mai ridicată în zona 2 comparativ cu zona 1, o zonă de pădure mixtă și de foioase ce reprezintă un habitat căruia *I. ricinus* se asociază. Cel mai probabil, zona urbană de colectare 2 conține un număr foarte ridicat de specii gazdă pentru căpușe, influențând astfel densitatea căpușelor nehrănite și totodată menținerea populațiilor de căpușe infectate [Mihalca și colab., 2013]. În plus, se poate observa o prevalență vizibil mai mare a agentului responsabil pentru infecția cu boala Lyme în zona 3 comparativ cu celelalte două zone. Zona de studiu 3 reprezintă o regiune împădurită, însă aridă, din sud-estul României. Prevalența crescută a *Borrelia* spp. în această zonă poate fi explicată printr-o prezență semnificativă a numeroase specii ce dețin rolul de gazdă pentru căpușele *I. ricinus*. Acest lucru este de asemenea susținut de situarea zonei de colectare în cadrul Rezervației Biosfera Delta Dunării, cunoscută pentru găzduirea unui număr mare de specii, atât mamifere cât și păsări migratoare sau rezidente, descrise anterior drept gazde pentru căpușe [Sándor și colab., 2014]. Prin intermediul acestor rezultate, am confirmat încadrarea anterioară a sud-estului României drept regiune endemică pentru infecția cu *B. burgdorferi* s.l. [Kalmar și colab., 2013].

Am obținut rate de infecție similare în căpușele *I. ricinus* adulte și nimfe (32.4% vs 30.6%). Studiile efectuate în Europa au detectat valori mult mai mari ale prevalenței în căpușele adulte comparativ cu nimfele [Rauter și colab., 2005]. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că adulții se hrănesc de două ori în cursul dezvoltării, ceea ce crește riscul de preluare a agenților patogeni. Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu nu par a urma această cale. Nu poate fi găsită o explicație clară pentru această situație. O cauză probabilă o poate reprezenta abundența nimfelor *I. ricinus* în zona de studiu, fapt ce se corelează pozitiv cu rata crescută a infecției nimfelor cu agentul bolii Lyme [Vennestrom și colab., 2008]. Stadiul de nimfă al speciei *I. ricinus* reprezintă cel

mai primejdios stadiu pentru sănătatea omului, datorită dimensiunii reduse, a antropofiliei pronunțate, abundenței și a capacității acesteia de a rămâne atașată de om o perioadă mai îndelungată [Vassallo și colab., 2000]. Toți acești factori solicită noi studii privind abundența și rata de infecție a nimfelor *I. ricinus*, din perspectiva sănătății umane.

În urma secvențierii, au fost identificate două specii aparținând grupului *Borrelia burgdorferi* s.l. respectiv *B. afzelii* și *B. valaisiana*. *Borrelia afzelii* a fost genospecia cel mai frecvent detectată în căpușele din România [Coipan și colab., 2011, Kalmar și colab., 2013]. *Borrelia valaisiana* a fost identificată în căpușe nehrănite din centrul și estul țării [Coipan și colab., 2011]. În urma testării prin PCR în timp real am reușit identificarea a șapte genospecii din grupul bolii Lyme. Specia *B. garinii* a înregistrat rata de infecție cea mai ridicată fiind urmată de *B. afzelii* (descrisă anterior drept cea mai întâlnită genospecie în căpușele din România). Am identificat de asemenea specii descrise anterior în centrul și sudul țării [Coipan și colab., 2011]. Frecventa asociere a speciilor din grupul Lyme reprezintă o problemă de sănătate publică, ca urmare a agravării semnelor clinice de boală sau a apariției simptomelor atipice ce pot îngreuna stabilirea corectă a diagnosticului.

Pe lângă cele două specii ale grupului *Borrelia burgdorferi* s.l., a fost identificată o specie adițională, din grupul febrei recurente, *B. miyamotoi*. Această specie este transmisă de aceleași specii ale genului *Ixodes*, capabile de a vectoriza spirochetele responsabile de producerea bolii Lyme. În ultimele decenii, *B. miyamotoi* a fost identificată în căpușe *Ixodes* din Europa, Rusia și Statele Unite ale Americii, primul caz de infecție la om fiind raportat în Rusia, în 2011 [Krause și colab., 2015]. În ultimul timp, au fost descrise noi infecții la om în SUA și Olanda [Jahfari și colab., 2014]. Un studiu recent efectuat în România, a raportat prezența *B. miyamotoi* în căpușe nehrănite *I. ricinus*, cu o prevalență de 1.5% [Kalmár și colab., 2015]. Până în prezent, nu au fost înregistrate evoluții clinice la om provocate de *B. miyamotoi*.

Anaplasma phagocytophilum este agentul etiologic al anaplasmozei granulocitare la om (HGA), câine, bovine și cabaline [Paduraru și colab., 2012] și, de asemenea, poate determina febra mușcăturii de căpușă în momentul în care căpușele *Ixodes* parazitează omul [Reis și colab., 2011]. La nivel european, *A. phagocytophilum* parazitează între 0.3% și 24% din totalul căpușelor testate [Cotte și colab., 2010, Rosef și colab., 2009]. În cadrul acestui studiu, a fost evidențiată o rată redusă a infecției, fiind semnalată doar la stadiul de nimfă al speciei *I. ricinus*. Această valoare a prevalenței este mai mică decât cea raportată în studii anterioare ce au vizat identificarea *A. phagocytophilum* în căpușele *I. ricinus* colectate de pe vegetație; prevalența medie obținută în

cadrul acestor studii a fost de 3.4% [Kalmár și colab., 2015, Matei și colab., 2015]. Zona 2 nu a avut probe pozitive ceea ce reprezintă un indicator al distribuției focale pentru infecția cu *A. phagocytophilum*. De altfel, numeroase studii au prezentat variații foarte mari ale prevalenței între diferite habitate și zone distincte din punct de vedere geografic [Matei și colab., 2015]. Prevalența redusă a *A. phagocytophilum* în căpușe poate fi pusă pe seama numărului redus de căpușe adulte colectate. Având în vedere faptul că transmiterea transovariană a *A. phagocytophilum* nu a fost încă demonstrată [Matei și colab., 2015], este de presupus că stadiul adult *I. ricinus* se infectează mai des cu acest agent decât nimfele; așadar, este posibil ca prevalența agentului anaplasmozei granulocitare umane să fie mai mare decât cea înregistrată în acest studiu. În România nu există până în prezent îmbolnăviri semnalate la om, însă numeroase studii au demonstrat circulația *A. phagocytophilum* pe teritoriul țării [Dumitrache și colab., 2013, Ionita și colab., 2013, Kiss și colab., 2014, Mircean și colab., 2012, Pastiu și colab., 2012].

Speciile genului *Rickettsia* determină infecții emergente, prezente în Europa și implicit în România, ce pot provoca o gamă largă de manifestări clinice [Ionita și colab., 2016, Oteo și colab., 2012]. Cercetări anterioare din România au semnalat prezența speciilor *Rickettsia* în căpușe colectate de pe diverse gazde [Ionita și colab., 2013, Ionita și colab., 2016, Mărcuțan și colab., 2016, Paduraru și colab., 2012]; până în prezent, nu au fost efectuate studii care să descrie prevalența *Rickettsia* spp. în căpușele nehrănite.

Prevalența *Rickettsia* spp. în cele trei zone de colectare a fost similară, ceea ce poate reprezenta o distribuție uniformă a agenților febrilor pătate (SFG) în căpușele din estul României. Este necesar a se determina prevalența generală a acestui agent infecțios și a stabili gradul de risc pentru om, prin intermediul unor studii efectuate la o scară mai largă. În ceea ce privește rata de infecție în funcție de stadiul de dezvoltare, au fost obținute valori similare atât pentru căpușele adulte cât și pentru nimfe. Acest lucru poate fi pus pe seama capacității speciilor de *Rickettsia* de a fi transmise transovarian. Impactul acestui fenomen asupra prevalenței globale poate fi similar infecției produse în urma hrănirii căpușelor cu sânge [Reis și colab., 2011]. Căpușele *I. ricinus* au fost infectate cu diferite specii ale genului *Rickettsia*: *R. helvetica*, *R. monacensis* și specii *Rickettsia* neidentificate/necultivate. *Rickettsia helvetica*, al cărui potențial patogen este momentan necunoscut, a fost suspectată în perimiocardită, fenomene febrile fără identificarea cauzei și sarcoidoză [Nilsson și colab., 1999, Nilsson și colab., 2010, Svendsen și colab., 2011]. *Rickettsia monacensis* a fost recent identificată în căpușele din România [Mărcuțan și

colab., 2016]. Riscul reprezentat de această specie pentru sănătatea omului rămâne incert.

În baza acestor rezultate, afirmăm ca fiind foarte probabil ca și alte specii ale genului *Rickettsia* să fie prezente în căpușele din România, fiind necesare eforturi susținute pentru o mai bună caracterizare și evaluare a potențialului patogen al acestora.

Secvențe genice specifice genului *Bartonella* au fost identificate în 4.3% din totalul căpușelor *I. ricinus* testate. În urma secvențierii, a rezultat o singură probă validă aparținând speciei *B. henselae*, agentul etiologic al bolii zgârieturii de pisică, una din cele mai comune zoonoze în țările industrializate [Chaloner și colab., 2011]. Principalul vector al *B. henselae* este puricele pisicii - *Ctenocephalides felis* iar rezervorul natural îl reprezintă pisica [Sanogo și colab., 2003]; *B. henselae* poate fi însă un agent transmis și de căpușe. 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 [Cotte și colab., 2008, Picascia și colab., 2015]. A fost înregistrată o prevalență mai mare în rândul căpușelor adulte comparativ cu nimfele și un nivel semnificativ mai mic al ratei de infecție în zona 3 față de zona 2 ($p < 0.05$), aspect ce poate fi pus pe seama absenței speciilor rezervor din zona 3.

Prevalența generală a infecției cu *C. N. mikurensis* în căpușele nehrănite s-a încadrat în valorile raportate de alte studii efectuate în Europa (3.5-7%) [Lommano și colab., 2012]. Prima semnalare a prezenței acestui agent patogen în România a fost realizată în urma testării prin PCR cantitativ a unei căpușe *I. ricinus* colectată de la un pacient [Andersson și colab., 2014]. Un studiu recent efectuat de Kalmar și colab., în 2015, a raportat o prevalență similară (5.3%) cu cea obținută în cadrul acestui studiu (5.4%), căpușele *I. ricinus* nehrănite fiind colectate din centrul și nordul țării [Kalmár și colab., 2015].

Nimfele *I. ricinus* din zona 3 au înregistrat cea mai ridicată rată a infecției cu agentul *C. N. mikurensis*, zona 2 având un număr redus de căpușe pozitive ($p < 0.05$). Rozătoarele reprezintă rezervor natural atât pentru *C. N. mikurensis* cât și pentru *Borrelia* spp., acești doi agenți având, în unele situații, o distribuție geografică similară [Burri și colab., 2014]. Zona 3 prezintă habitate cu numeroase specii de mamifere [Murariu, 2006], de unde putem explica aceste valori ridicate ale prevalenței *C. N. mikurensis* în căpușele *I. ricinus*. Cu privire la infecția stadiilor de dezvoltare, doar nimfele au fost identificate pozitiv pentru infecția cu *C. N. mikurensis*. Un număr mare de căpușe pozitive provine din zona 3, de unde au fost colectate în majoritate nimfe, ceea ce explică într-o anumită măsură lipsa căpușelor adulte pozitive. 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 pentru om.

Există numeroase publicații ce prezintă persoane infectate concomitent cu mai mulți agenți patogeni transmiși de căpușe [Duffy și colab., 1997, Magnarelli și colab., 1995]. 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 asocierile dintre agenții patogeni pot avea un impact major asupra diagnosticului și tratamentului bolilor transmise de căpușe, foarte puține studii din România s-au adresat determinării prevalenței coinfecțiilor în căpușe. În cadrul acestui studiu, 8.2% din căpușele testate au fost infectate cu doi sau trei agenți patogeni, fiind originare din toate cele trei zone luate în studiu. Am raportat infecții multiple în căpușele *I. ricinus* nehrănite cu o rată a infecției similară altor studii din Europa [Lommano și colab., 2012, Reis și colab., 2011, Welc-Faleciak și colab., 2014]. Jumătate dintre coinfecții au fost semnalate în zona de studiu 3, din sud-estul țării, aceasta fiind o zonă de risc ridicat pentru infecțiile transmise de căpușe. Rezultatele din acest studiu sugerează reflecții referitoare la posibilitatea de co-transmitere a acestor agenți la om, efectul coinfecțiilor asupra severității simptomelor, eficacitatea tratamentelor împotriva infecțiilor multiple și la dezvoltarea unor noi metode de diagnostic.

7.3.2 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus reprezintă specia clasată pe locul secund din punctul de vedere al abundenței în Europa centrală [Rubel și colab., 2016]. Stadiile imature parazitează mamiferele mici ce trăiesc în vizuini iar căpușele adulte se hrănesc pe mamifere mari. Rareori atacă oameni dar pot menține și distribui agenți patogeni către gazde [Mierzejewska și colab., 2015]. În România, prevalența căpușelor nehrănite *D. reticulatus* a fost estimată la 0.02% [Mihalca și colab., 2012a]. În cadrul acțiunii de colectare a probelor, am identificat patru femele *D. reticulatus* iar în urma testării o probă a fost pozitivă pentru *Rickettsia raoultii*. *Dermacentor reticulatus* a fost descrisă în Europa drept cel mai competent vector pentru *R. raoultii* [Mierzejewska și colab., 2015]. Acest agent patogen produce la om limfadenopatia de căpușă (TIBOLA), fiind descris anterior în căpușe *Dermacentor* colectate din România [Ionita și colab.,

2013, Ionita și colab., 2016]; se confirmă astfel rolul acestei specii în transmiterea *R. raoultii*. Desigur, studii suplimentare sunt necesare pentru a avea o imagine de ansamblu privitor la importanța căpușelor *Dermacentor* în transmiterea agenților patogeni în România.

7.3.3 Agenți patogeni bacterieni identificați în căpușele *Haemaphysalis punctata*

Haemaphysalis punctata reprezintă o specie de dimensiuni mici, ce parazitează omul în aproape toate țările europene, fiind considerată un vector competent pentru virusul Crimeea-Congo și virusul encefalitei de căpușă [Estrada-Pena și colab., 1999]. În România, *H. punctata* reprezintă aproximativ 2% din totalul speciilor de căpușe [Mihalca și colab., 2012a]. În țara noastră există un număr limitat de informații privind prevalența agenților patogeni în căpușele *H. punctata*, nefiind raportate căpușe infectate [Briciu și colab., 2014]. O nimfă *H. punctata* a fost detectată pozitiv pentru *Borrelia miyamotoi*. În Europa, *I. ricinus* reprezintă vectorul principal pentru speciile *Borrelia*, *H. punctata* fiind mai puțin eficientă în menținerea infecției cu speciile *Borrelia* [Jaenson și colab., 1996]. Totuși, *H. punctata* ar fi putut prelua acest patogen în stadiul de larvă, în momentul hrănirii pe un animal infectat sau prin hrănirea în imediata apropiere a unor căpușe pozitive. În acest mod, ADN-ul *Borrelia* a rămas pe durata năpârlirii, până în stadiul de nimfă.

Bartonella spp. a fost identificată într-o nimfă *H. punctata* colectată din zona 2. De asemenea, o specie neclasată de *Rickettsia* spp. a fost identificată într-o nimfă. Există studii în Europa ce descriu prezența *Bartonella* spp. și *Rickettsia* spp. în căpușe nehrănite *H. punctata* [Ciceroni și colab., 2009, Tjisse-Klasen și colab., 2013]. Pentru România însă nu există astfel de informații. Rezultatele noastre oferă sugestii privind rolul potențial de vectori al căpușelor nehrănite *H. punctata* pentru agenți patogeni importanți. Este necesar, astfel, aprofundarea studiilor pentru a determina competența vectorială și implicațiile speciei *H. punctata* în transmiterea de agenți patogeni.

7.3.4 Agenți patogeni virali cercetați în căpușele testate

Encefalita de căpușă a fost semnalată la un număr redus de persoane din zona Transilvaniei (județele Mureș și Sibiu) iar anchetele seroepidemiologice au estimat infecția cu acest agent viral la 0.6% [Amicizia și colab., 2013]. Centrul National de Supraveghere și Control al Bolilor Transmisibile (CNSCBT) a raportat, pentru perioada 2010-2013, trei cazuri la

pacienți din Transilvania. Lipsa datelor cu privire la infecția TBEv în căpușele din România face necesară o evaluare sistematică a distribuției și a prevalenței virusului TBE în căpușele Ixodidae.

Virusul Eyach este un membru al genului *Coltivirus*, familia *Reoviridae*, izolat pentru prima dată în 1972, în căpușe *Ixodes ricinus* colectate din Germania. A fost mai apoi identificat în Franța (1981), în căpușe din specia *Ixodes ventralloi*. În fosta Cehoslovacie, a fost incriminat de infecții asociate cu encefalită și poliradiculoneurită, pe baza identificării anticorpilor din serul pacienților. Prezența virusului a fost recent confirmată în Franța, în căpușe din regiunile Ardennes și Alsace, având o prevalență de 0.07% și respectiv 5.2% [Moutailler și colab., 2016a]. În momentul de față nu există dovezi clare cu privire la infecția provocată de virusul Eyach la animale și la om. Căpușele testate în studiul de față au fost negative la infecția cu acest virus. Pentru a dovedi absența sau prezența virusului Eyach în căpușele din România, este necesar a se continua cu cercetări sistematice de detecție a agentului viral în cadrul populațiilor de căpușe.

7.4 CONCLUZII PARȚIALE

1. Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu confirmă rolul de vector al căpușelor dure, atât în ecosistemele specifice din zonele extravilane, cât și în zonele urbane.
2. S-a remarcat **prevalența crescută** a agenților bolii Lyme în **zone intens populate**, această constatare recomandând o mai bună supraveghere epidemiologică și acțiuni preventive susținute.
3. **Au fost identificate și descrise numeroase asocieri ale genospeciilor din grupul *Borrelia burgdorferi* s.l., asocieri ce pot influența diagnosticul și eficiența tratamentului afecțiunilor la om.**
4. Au fost identificați **pentru prima dată în zona de est a României agenți patogeni implicați în producerea de infecții la om (*Borrelia miyamotoi*, *C. N. mikurensis*, *Rickettsia raoultii*).**
5. **Au fost identificate noi zone de risc în estul României și au fost generate informații detaliate privind distribuția agenților patogeni cu transmitere vectorială.**
6. Aceste rezultate vor putea reprezenta o fundație solidă pentru viitoare studii, în tentativa de evaluare sistematică a riscului infecțiilor transmise de căpușe.

CAPITOLUL VIII

DETECȚIA AGENȚILOR PATOGENI DIN CĂPUȘE PRIN INTERMEDIUL SISTEMULUI HIGH-THROUGHPUT REAL- TIME PCR

CHAPTER VIII

HIGH-THROUGHPUT DETECTION OF TICK-BORNE PATHOGENS

Ixodes ricinus are capacitatea de a transmite cea mai largă varietate de agenți patogeni ce determină infecții atât la animale cât și la om. Principalul factor ce-i conferă această însușire îl reprezintă aria largă de specii gazdă parazitată ce expun căpușele la numeroase microorganisme, cum ar fi bacterii (*Borrelia burgdorferi* s.l.: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *Anaplasma phagocytophilum*, grupul febrei pătate din genul *Rickettsia* și posibil *Bartonella* spp. și *Candidatus* *Neoehrlichia mikurensis*), paraziți (în principal *Babesia*) și virusuri (encefalita de căpușă). Larvele nehrănite pot fi infectate de către un număr restrâns de agenți patogeni, reprezentați de cei capabili de transmiterea verticală în organismul căpușelor, astfel, având un rol minor în procesul de vectorizare a agenților patogeni. Nimfele însă, sunt capabile de transmiterea unor numeroși agenți cu implicații majore pentru sănătatea publică. Adulții nehrăniți se pot hrăni și pe om, fiind responsabili pentru 10-40% din cazurile de parazitism înregistrate la nivel european [Moutailler și colab., 2016b]. Până la stadiul de adult, căpușele ingeră sânge de la două gazde diferite, ambele oferind o posibilitate de transmitere a agenților infecțioși. Drept urmare, căpușele adulte au șanse mai mari de a fi infectate (sau de a avea infecții multiple) comparativ cu nimfele, reprezentând o amenințare substanțială pentru sănătatea publică. Totuși, stadiul de adult prezintă o abundență redusă comparativ cu nimfele și, de obicei, adulții sunt îndepărtați mai repede de pe gazde, fiind mai ușor de reperat [Moutailler și colab., 2016b].

Sistemul BioMark *real time*-PCR (Fluidigm, USA) permite testarea simultană a unui număr mare de agenți patogeni, având o aplicabilitate ridicată în cadrul studiilor epidemiologice de evaluare a prezenței agenților patogeni în cadrul anumitor teritorii.

În acest capitol sunt prezentate rezultatele obținute după testarea prin sistemul Biomark *real time*-PCR (Fluidigm, USA) a celor 144 de probe de ADN *Borrelia* spp. pozitive în urma reacției *real time*-PCR (vezi Cap. VII). De asemenea, cele 557 probe de ARN au fost distribuite în 34 de amestecuri pentru a fi apoi testate în cadrul aceluiași sistem pentru 24 agenți virali vectorizați de către căpușele Ixodidae.

8.1 MATERIALE ȘI METODE

În cadrul acestui studiu au fost incluse probe de ARN și ADN extrase din căpușele colectate de pe vegetație în zona de est a României.

Probele de ADN au fost inițial incluse într-o reacție *real-time* PCR pentru detecția genei 23S ARNr specifică genului *Borrelia* iar probele pozitive au fost mai apoi testate prin *nested*-PCR pentru gena IGS 16S-23S rRNA, având ca obiectiv identificarea speciilor genului *Borrelia*. În final, au rezultat 144 probe pozitive pentru genul *Borrelia* ce au avut în urma *nested*-PCR, un număr de doar 20 produși de amplificare (vezi Cap. VII). Aceste probe au fost testate prin PCR în timp real realizat prin sistemul BioMark *real time*-PCR (Fluidigm, USA) utilizând primeri și sonde specifice pentru 39 agenți bacterieni și parazitari și 4 specii de căpușe (*Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*, *Dermacentor reticulatus* și *D. marginatus*).

Obiectivul principal al testării probelor de ADN a constat în evaluarea eficacității acestei metode în supravegherea infecțiilor majore și a celor emergente transmise de căpușe. Am urmărit totodată identificarea eventualelor coinfecții prezente în căpușe.

Probele de ARN au fost în prealabil distribuite în 34 de amestecuri, rezultând aproximativ 16 probe/amestec. ADN-ul complementar obținut în urma revers-transcripției ARN-ului, a fost testat prin PCR în timp real-sistemul BioMark *real-time* PCR (Fluidigm, USA), pentru 24 agenți virali cunoscuți, identificați anterior în organismul căpușelor (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 Schmallenberg, virusul West Nile și virusul Bourbon).

Am testat astfel, cele 34 de amestecuri ARN pentru a evalua rolul căpușelor colectate din estul României în transmiterea agenților patogeni virali.

8.1.1 Revers-transcripția ARN-ului

Pentru obținerea ADN-ului complementar, plecând de la probele de ARN, a fost utilizat *kit*-ul QScript cDNA (Quanta Biosciences). RT-PCR se realizează în două etape, prin intermediul unei substanțe tampon 5X ce include concentrații optimizate de MgCl₂, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), inhibitori de proteine-RNase recombinant, qScript reverse transcriptază, primeri random, oligo(dT) primeri și stabilizatori. Reacția se desfășoară în 5 μl volum final format din 1 μl QScript cDNA, 1 μl ARN din proba de testat și 3 μl de apă.

Programul de revers-transcripție a inclus următoarele etape de incubare:

- 5 minute la 25°C
- 30 minute la 42°C
- 5 minute la 85°C
- răcire la 10°C

8.1.2 Pre-amplificarea ADN-ului și testarea probelor pentru agenții patogeni selectați

Etapa de pre-amplificare a ADN-ului și a ADN-ului complementar s-a efectuat în 5 μl volum final de reacție format din 2.5 μl TaqMan PreAmp Master Mix (2X), 1.2 μl din mixul de primeri (0.2X) și 1.3 μl ADN-ul extras din căpușele nehrănite. Programul termic s-a desfășurat după cum urmează: 95°C timp de 10 min, 14 cicluri la 95°C pentru 15 s și 4 minute la 60°C.

Sistemul BioMark™ dynamic array Fluidigm este capabil să execute reacții paralele PCR în timp real, utilizând fie plăci ce conțin un număr de cipuri de 96x96 fie de 48x48; în acest mod, pot fi efectuate 9216 respectiv 2304 reacții individuale [Michelet și colab., 2014].

Ulterior etapei de pre-amplificare, probele au fost incluse într-o reacție qPCR utilizând sonde Taqman marcate 6-carboxyfluoresceină (FAM) și black hole quencher (BHQ1) împreună cu TaqMan Gene Expression Master Mix, respectând instrucțiunilor producătorului (Applied Biosystems, France). Condițiile termice au fost următoarele: 95°C pentru 5 min, 45 cicluri la 95°C pentru 10 s, 60°C pentru 15 s și 40°C timp de 10 s. Datele au fost preluate prin

intermediul sistemului *BioMark Real-Time PCR* iar analiza rezultatelor s-a realizat prin intermediul programului *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* ce a permis obținerea valorilor *crossing point* (CP). Reacțiile au fost efectuate în duplicat iar fiecare placă a conținut un martor pozitiv (*E. coli*) și unul negativ (apă).

8.2 DETECȚIA AGENȚILOR BACTERIENI ȘI PARAZITARI ÎN PROBELE DE ADN

În cadrul sistemului BioMark™ au fost testate 144 de probe ce au fost pozitive pentru infecția cu *Borrelia* spp. într-o prealabilă reacție *real time*-PCR. Aceste probe au fost analizate pentru 39 de patogeni transmiși de către căpușele dure, 27 agenți bacterieni (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. bissetti*, *B. miyamotoi*, *Anaplasma marginale*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. canis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia conorii*, *R. slovaca*, *R. masilliae*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*) și 12 agenți parazitari (*Babesia divergens*, *B. microti*, *B. canis*, *B. vogeli*, *B. bovis*, *B. caballi*, *B. EU1*, *B. bigemina*, *B. major*, *B. ovis*, *Theileria equi*, *T. annulata*). În urma testării, nu au fost obținute probe pozitive pentru 15 agenți bacterieni și 9 agenți parazitari (Figurile 8.1; 8.2). Numărul de probe pozitive este prezentat în tabelul 8.1.

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%). *Borrelia valaisiana* și *B. lusitaniae* au fost identificate în 26 (26/144; 18%) de probe distribuite în toate cele trei zone luate în studiu (Tabel 8.1). În probele de ADN au fost identificate, cu o prevalență scăzută, *Anaplasma phagocytophilum* și *C. N. mikurensis* (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% (17/144). 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 rată a infecției de 0.6% (1/144), 1.3% (2/144) și respectiv 2% (3/144) (Tabel 8.1).

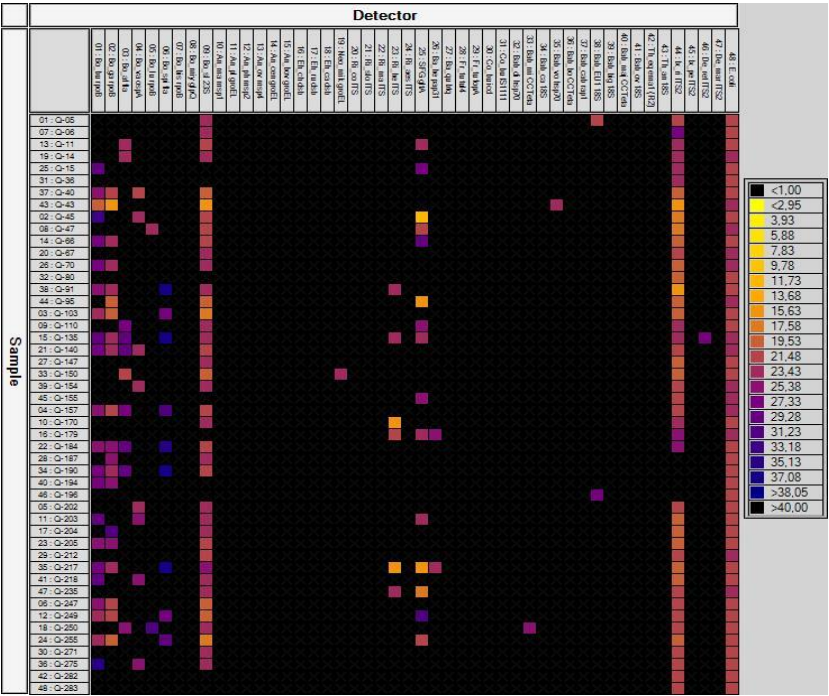


Figura 8.1 Sistemul BioMark™ dynamic array (cip 48.48)

Figure 8.1 BioMark™ dynamic array system

Fiecare căsuță corespunde unei singure reacții PCR în timp real; rândurile corespund probelor testate iar coloanele indică agenții patogeni testați. Valorile CP pentru fiecare reacție sunt indicate de către intensitatea culorii, scala fiind prezentată în legenda din dreapta figurii. Nuanțele de albastru închis și căsuțele negre corespund unei reacții negative, având CP > 30.

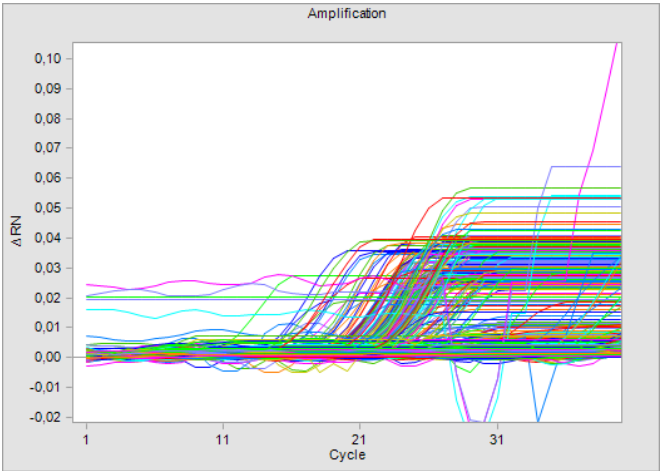


Figura Curba de amplificare pentru probele de ADN testate

Figure 8.2 Amplification curve for tested DNA samples

Tabel 8.1/Table 8.1

Numărul probelor pozitive distribuite pe zona de studiu
Number of positive samples distributed by sampling area

Agenți patogeni	Zona 1			Zona 2			Zona 3			Total		
	A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total
<i>B. burgdorferi</i> ss		1	1		1	1				2		2
<i>B. garinii</i>	2	9	11	9	17	26	2	40	42	13	66	79
<i>B. afzelii</i>	1	9	10	4	16	20	1	15	16	6	40	46
<i>B. valaisiana</i>		1	1	4	5	9		16	16	4	22	26
<i>B. lusitaniae</i>	1	1	1	2	3	5	1	18	19	4	22	26
<i>B. spielmanii</i>				1	2	3		3	3	1	5	6
<i>B. bissetti</i>		1	1								1	1
<i>A. phago</i>								2	2		2	2
<i>C. N. miku</i>					3	3		1	1		4	4
<i>R. helvetica</i>		1	1	1	5	6		10	10	1	16	17
<i>Rickettsia</i> spp.	1	5	6	7	13	20		34	34	8	52	60
<i>B. henselae</i>		1	1		3	3		8	8		12	12
<i>F. tularensis</i>								3	3		3	3
<i>Bab. microti</i>					1	1					1	1
<i>Bab. vogeli</i>				1	1	2				1	1	2
<i>Bab EU1</i>		1	1		1	1		1	1		3	3

Infecțiile multiple cu agenți patogeni au fost identificate în 90 de probe din cele 144 testate, având o prevalență de 62.5%.

Au fost observate 43 de asocieri diferite, între agenții patogeni analizați în căpușele nehrănite (Tabel 8.2). Un număr de 23 de probe (23/144; 15.9%) au prezentat asocierea a câte două genospecii din grupul *Borrelia burgdorferi* s.l., cea mai frecventă asociere fiind între *B. garinii* și *B. afzelii* (11/144; 7.6%) fiind urmată de *B. garinii* și *B. lusitaniae*, cu nouă probe pozitive (9/144; 6.2%).

Au existat asocieri formate din trei specii diferite ale genului *Borrelia*, acestea fiind detectate în trei probe (3/144; 2%) (Tabel 8.2).

Coinfecții cu doi agenți patogeni au fost observate în 22 de probe (22/144; 15.2%). Un număr de 21 de probe (21/144; 14.5%) au fost coinfectate cu o specie din genul *Borrelia* și un alt agent patogen iar o probă a fost pozitivă pentru asocierea dintre *Rickettsia helvetica* și *Bartonella henselae*.

Căpușele nehrănite au răspuns pozitiv pentru asocierea a trei agenți patogeni. Din totalul celor 29 de probe (29/144; 20.1%) identificate, 10 probe (10/144; 6.9%) au fost pozitive pentru infecția cu *Borrelia garinii*, *B. afzelii* și *Rickettsia* spp. (Tabel 8.2).

Coinfecții cu mai mult de trei agenți au fost semnalate în 13 probe (13/144; 9%). Un număr de 12 căpușe (12/144; 8.3%) au avut coinfecții cu patru agenți iar o probă a fost pozitivă pentru *Borrelia garinii*, *B. spielmanii*, *Rickettsia helvetica*, *Bartonella henselae* și *Babesia vogeli* (Tabel 8.2).

Tabel 8.2/ Table 8.2

Infecții multiple în căpușele *Ixodes ricinus*
Multiple pathogen infections in *Ixodes ricinus* ticks

Nr.	Asocierea agenților patogeni	Zona 1			Zona 2			Zona 3			Nr. total		
		A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total
1	<i>B. afzelii</i> + <i>B. bissetti</i>		1	1							0	1	1
2	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i>		2	2	1	5	6	1	2	3	2	9	11
3	<i>B. garinii</i> + <i>B. lusitaniae</i>	1		1		1	1		7	7	1	8	9
4	<i>B. garinii</i> + <i>B. spielmanii</i>					1	1		1	1	0	2	2
5	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. lusitaniae</i>		1	1							0	1	1
6	<i>B. garinii</i> + <i>B. valaisiana</i> + <i>B. lusitaniae</i>				1		1				1	0	1
7	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i>					1	1				0	1	1
8	<i>B. afzelii</i> + <i>B. EU1</i>		1	1							0	1	1
9	<i>B. burgdorferi</i> ss + <i>Rickettsia</i> spp.		1	1							0	1	1
10	<i>B. valaisiana</i> + <i>Rickettsia</i> spp.				1	2	3				1	2	3
11	<i>B. lusitaniae</i> + <i>Rickettsia</i> spp.				1		1		1	1	1	1	2
12	<i>B. garinii</i> + <i>Rickettsia</i> spp.				1	2	3		3	3	1	5	6
13	<i>B. afzelii</i> + <i>R. helvetica</i>					1	1		1	1	0	2	2
14	<i>B. afzelii</i> + <i>C.N. miku</i>					1	1				0	1	1
15	<i>B. afzelii</i> + <i>Rickettsia</i> spp.					1	1				0	1	1
16	<i>B. spielmanii</i> + <i>A. phago</i>								1	1	0	1	1
17	<i>B. garinii</i> + <i>B. henselae</i>								1	1	0	1	1
18	<i>B. garinii</i> + <i>R. helvetica</i>								1	1	0	1	1
19	<i>B. valaisiana</i> + <i>C.N. miku</i>								1	1	0	1	1
20	<i>R. helvetica</i> + <i>B. henselae</i>					1	1				0	1	1
21	<i>B. garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>Rickettsia</i> spp.	1	2	3	1	3	4		3	3	2	8	10

Tabel 8.2/ Table 8.2 (Continuare/Continuation)

Nr.	Asocierea agenților patogeni	Zona 1			Zona 2			Zona 3			Nr. total		
		A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total	A	N	Total
22	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>R. helvetica</i>		1	1	1	1	2		2	2	1	4	5
23	<i>B. afzelii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + <i>B. microti</i>					1	1				0	1	1
24	<i>B. afzelii</i> + <i>C.N. miku</i> + <i>B. henselae</i>					1	1				0	1	1
25	<i>B. afzelii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + <i>B. henselae</i>							1	1	2	1	1	2
26	<i>B.garinii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + <i>Rickettsia</i> spp.							4	4		0	4	4
27	<i>B.garinii</i> + <i>B. valaisiana</i> + <i>R. helvetica</i>							1	1		0	1	1
28	<i>B.garinii</i> + <i>B. valaisiana</i> + <i>Rickettsia</i> spp.							2	2		0	2	2
29	<i>B. lusitaniae</i> + <i>Rickettsia</i> spp. + <i>F. tularensis</i>							1	1		0	1	1
30	<i>B. valaisiana</i> + <i>Rickettsia</i> spp. + <i>B. henselae</i>							1	1		0	1	1
31	<i>B.garinii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + <i>F. tularensis</i>							1	1		0	1	1
32	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>Rickettsia</i> spp.+ <i>B. henselae</i>		1	1							0	1	1
33	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + <i>C.N. miku</i>					1	1				0	1	1
34	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. spielmanii</i> + <i>Rickettsia</i> spp.				1		1				1	0	1
35	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>R. helvetica</i> + <i>B. henselae</i>							1	1		0	1	1
36	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>Rickettsia</i> spp. + <i>B. henselae</i>							1	1		0	1	1
37	<i>B. valaisiana</i> + <i>B. spielmanii</i> + <i>Rickettsia</i> spp. + <i>F. tularensis</i>							1	1		0	1	1
38	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> + <i>B. EU1</i>							1	1		0	1	1
39	<i>B.garinii</i> + <i>B. lusitaniae</i> + <i>Rickettsia</i> spp. + <i>B. henselae</i>							2	2		0	2	2
40	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>Rickettsia</i> spp. + <i>A. phago</i>							1	1		0	1	1
41	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> + <i>B. henselae</i>							1	1		0	1	1
42	<i>B.garinii</i> + <i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> + <i>Rickettsia</i> spp.							1	1		0	1	1
43	<i>B. garinii</i> + <i>B. spielmanii</i> + <i>R. helvetica</i> + <i>B. henselae</i> + <i>B. vogeli</i>					1	1				0	1	1
Total		2	10	12	8	24	32	2	44	46	12	78	90

8.3 DETECȚIA VIRUSURILOR ÎN PROBELE DE ADN COMPLEMENTAR

Cele 34 de amestecuri de ADN complementar (formate în urma asocierii a 557 probe de ARN) 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 Schmallerberg).

În urma testării au fost obținute două probe pozitive pentru doi agenți virali diferiți (Figurile 8.3; 8.4). 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* (Figurile 8.3; 8.4). Acest virus a fost prima dată izolat în 2014, de la un pacient din Statele Unite ale Americii [Kosoy și colab., 2015].

Probele incluse în amestecul de ADNc pozitiv pentru infecția cu virusul Bourbon în cadrul sistemului BioMark™ dynamic array Fluidigm au fost utilizate mai apoi pentru a confirma prezența acestui agent în căpușele din România.

Pentru confirmare, cele 16 probe din amestecul de ARN (Tabel 8.3) au fost incluse într-o reacție rRT-PCR în care au fost utilizate două seturi de primeri și sonde (un set de primeri specific segmentului 2- PB1 polymerase subunit al virusului Bourbon și un alt set specific segmentului 5 ce codifică nucleoproteina NP) (Tabel 8.4). Reacțiile rRT-PCR Taqman au fost efectuate în 20 μ l volum final de reacție, utilizând LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes master mix (Roche Applied Science, Germania) la concentrație finală de 1x, cu 0.5 μ M amorse specifice, 0.25 μ M sonde, 3.25 mM acetat de mangan [Mn(OAc)₂] și 2 μ l ARN de testat. Toate reacțiile au inclus un martor negativ. Condițiile termice pentru rRT-PCR au fost: 63 °C pentru 3 min, 95 °C pentru 30 s, 45 cicluri la 95 °C pentru 10 s apoi 56 °C pentru 30 s, urmând apoi o etapă de răcire la 40 °C timp de 10 s.

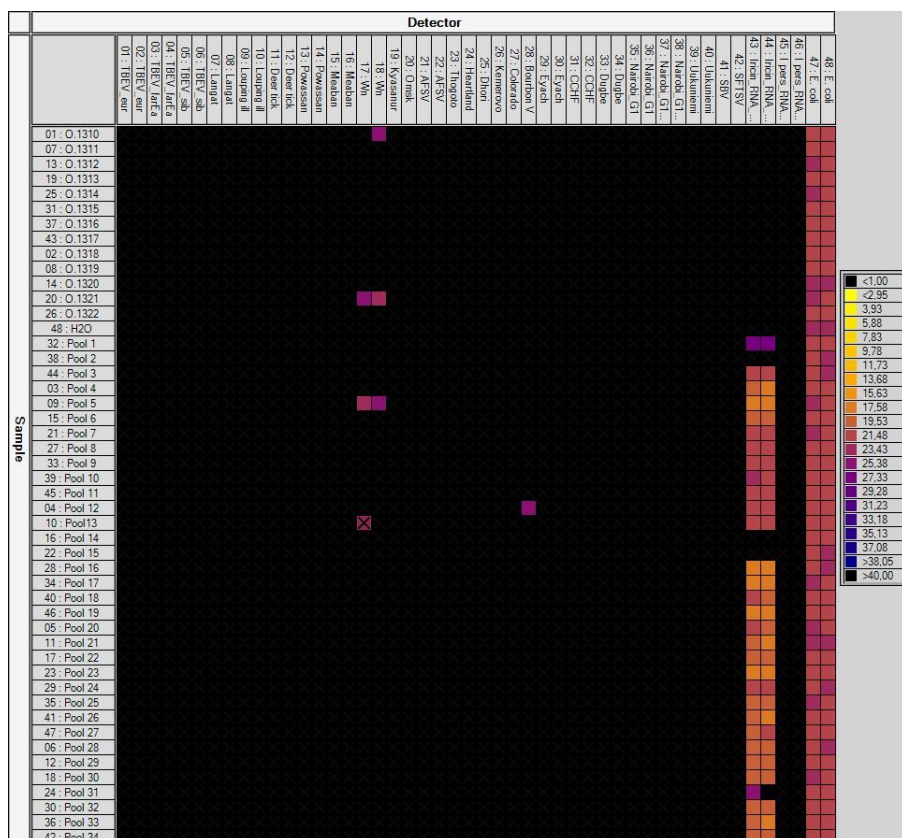


Figura 8.3 Detecția virusurilor prin intermediul Sistemului BioMark™ dynamic array (cip 48.48)

Figure 8.3 Viruses detection by BioMark™ dynamic array system

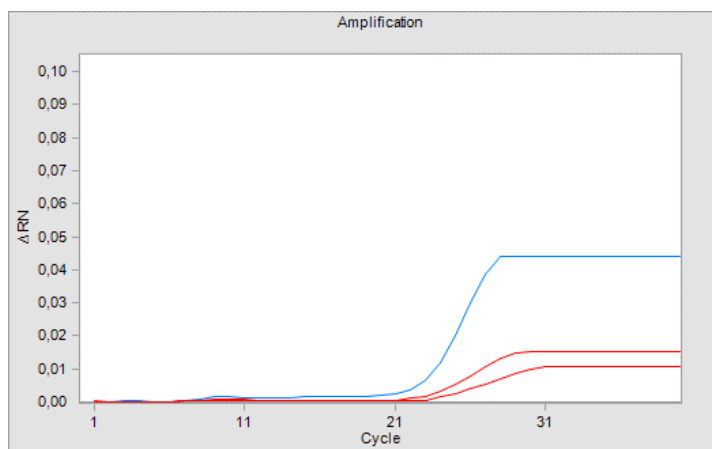


Figura 8.4 Curba de amplificare pentru probele pozitive de ARN

Figure 8.4 Amplification curve for the positive RNA samples

Tabel 8.3/Table 8.3

Probe pozitive pentru infecția cu virusul Bourbon
Positive tested samples for Bourbon virus

Nr. probei	Zona	Data colectării	Specia	Stadiul
Q-151	BUCIUM	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-152	BUCIUM	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-153	BUCIUM	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-154	BUCIUM	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-155	BUCIUM	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-156	BUCIUM	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-157	BUCIUM	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-158	BUCIUM	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-159	BUCIUM	29.04.14	<i>H. punctata</i>	N
Q-160	BUCIUM	29.04.14	<i>H. punctata</i>	N
Q-161	BUCIUM	29.04.14	<i>H. punctata</i>	N
Q-162	BUCIUM	29.04.14	<i>H. punctata</i>	N
Q-163	BUCIUM	29.04.14	<i>H. punctata</i>	N
Q-164	CETĂȚUIA	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	F
Q-165	CETĂȚUIA	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N
Q-166	CETĂȚUIA	29.04.14	<i>I. ricinus</i>	N

I. ricinus: *Ixodes ricinus*; *H. punctata*: *Haemaphysalis punctata*; N: Nimfă; F: Femelă

Tabel 8.4/Table 8.4

Primeri utilizați în cadrul reacției rRT-PCR pentru detecția virusului
Bourbon [Lambert și colab., 2015]

Real-time primers for the detection of Bourbon virus RNA

Segment	Nume	Poziția	Secvența
2	PBI1_F	742–761	AACCGAAGGACCATTGCTAC
2	PBI1_R	832–851	ACAGGGACTCCAGAACTTGG
2	PBI_probe	794–815	ACCCTTGCTGCATCTTCCACCA
5	NPI1_F	1150–1169	GCAAGAAGAGGCCAGATTTTC
5	NPI1_R	1276–1295	TCGAATTCAGCATTTCAGAGC
5	NP_probe	1177–1197	CCTCACACCACGGAAGCTGGG

De asemenea, am construit primeri specifici (primeri externi și interni) pentru segmentul 1 (Original polymerase subunit gene-PB2), segmentul 3 (Original envelope glycoprotein gene) și segmentul 6 (M protein gene) al virusului Bourbon, ce au fost incluși în cadrul unei reacții *nested-PCR* (Tabel 8.5). Prin intermediul acestei reacții am urmărit detectarea secvențelor specifice acestui agent viral.

Am încercat apoi izolarea virusului Bourbon prin inocularea intracerebrală a trei șoareci nou-născuți IFNAR^{-/-} (type I interferon receptor knock-out mice) cu extracte din căpușele pozitive la infecția cu virusul Bourbon. Experimentarea s-a desfășurat în cadrul ANSES (Maisons-Alfort, Franța), în concordanță cu practicile de bunăstare animală. Protocolul de lucru a fost aprobat de către Comitetul de Etică pentru Experimentare Animală ANSES-ENVA-UPEC.

Tabel 8.5/Table 8.5

Primeri construiți pentru detecția prin *nested-PCR* a virusului Bourbon
Designed primers for detection of Bourbon virus by *nested-PCR*

Segment		Amplicon (pb)	Secvența
1	Primeri externi		
	Primer F	2.187	ACA AAG AAC TGT CAA ATG
	Primer R		TGG CCT TTA TCA TGC TTT GT
1	Primeri interni		
	Primer F	702	GAA CCA AAG AAG AAG CTA CT
	Primer R		CAG CTT GTG TTT GGA ATG TT
4	Primeri externi		
	Primer F	1.356	ATT GTC CAA AGA TGA ATG CC
	Primer R		TGC TGT TTG CTA CAA ATG TC
4	Primeri interni		
	Primer F	529	ACC AGA AGT GCA AGA TGC TT
	Primer R		GGG GTG CAA TAG ATT GTT
6	Primeri externi		
	Primer F	874	ACA AGA GAA ATG GCT CAC CA
	Primer R		TAA GAA GGT TGT TAG AGG TT
6	Primeri interni		
	Primer F	443	CTC CAG AAG CAT TTA TTT TG
	Primer R		CAT CTT TTC TAG CTC CAT AA

Testul 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. Șoarecii inoculați intracranian au fost urmăriți zilnic și în urma măsurătorilor s-a putut observa o dezvoltare redusă a

acestora, asociată cu o greutate mică. În ziua 21 șoarecii au fost sacrificați și s-au recoltat probe de creier, ficat, cord, splină în vederea amplificării prin rRT-PCR a ARN-ului specific virusului Bourbon. În cele din urmă, nu s-a reușit obținerea de rezultate pozitive.

8.4 DISCUȚII

Această metodă de detecție pe scară largă a fost aplicată pentru a reuși identificarea unui număr mare de agenți patogeni în căpușele colectate din zona de est a României. Sistemul BioMark™ dynamic array a permis detecția unor agenți patogeni ce au fost mai puțin frecvent descriși în căpușele Ixodidae. Totodată, prin această tehnică s-a putut estima prevalența agenților identificați, generând astfel o imagine de ansamblu a rolului căpușelor în transmiterea agenților patogeni bacterieni, parazitari și virali.

Coinfecțiile pot avea un impact deosebit în tentativa de stabilire a diagnosticului. Spre exemplu, în România, diagnosticul bolilor transmise de căpușe se limitează aproape exclusiv la boala Lyme. După cum se poate observa, analizând rezultatele din cadrul acestui studiu și din alte numeroase publicații [Maggi și colab., 2013, Moniuszko și colab., 2014, Qurollo și colab., 2014, Tjisse-Klasen și colab., 2013], coinfecțiile reprezintă evenimente destul de frecvente atât la animale cât și la om. Detecția diferitelor specii de agenți patogeni indică faptul că uneltele utilizate în diagnostic ar trebui să se suprapună gamei de agenți patogeni prezentă în căpușele dintr-o anumită regiune geografică. Coinfecțiile pot avea un rol important pentru sănătatea publică, ca urmare a accentuării simptomatologiei la pacienți sau prin evoluția unor forme atipice de boală ce pot împiedica stabilirea unui diagnostic corect [Krause și colab., 1996]. De asemenea, coinfecțiile pot afecta tratamentul bolilor transmise de căpușe, din moment ce antibioterapia prescrisă pentru boala Lyme nu este eficientă în tratarea infecțiilor virale și parazitare [Moutailler și colab., 2016b].

Agenții patogeni cu prevalența cea mai mare au fost genospeciile din grupul *Borrelia burgdorferi* s.l. ca urmare a includerii în studiu a probelor detectate anterior pozitive pentru genul *Borrelia*.

Borrelia garinii și *B. afzelii* au fost cele mai abundente specii, confirmând astfel rezultatele prezentate anterior (Cap. VIII) dar și cercetări întreprinse de alți autori [Coipan și colab., 2011].

Este de remarcat prezența în căpușele *Ixodes ricinus* a agenților parazitari din genul *Babesia*, cu o rată de infecție scăzută, ce poate fi explicată prin absența gazdelor rezervor natural în zonele studiate.

În cele 144 de căpușe analizate au fost observate 43 de asocieri diferite între agenții patogeni identificați, fiind asocieri dintre doi, trei, patru și cinci agenți patogeni. S-a remarcat asocierea puternică dintre speciile *B. garinii* și *B. afzelii*, ceea ce poate semnala o posibilă interacțiune între aceste genospecii.

Cele 34 de amestecuri ARN testate pentru 24 agenți virali au oferit răspuns pozitiv la infecția cu doi agenți virali, ceea ce indică o implicare a căpușelor nehrănite în transmiterea infecțiilor virale. Virusul West Nile a fost detectat într-un amestec constituit din probe de ARN din zona 1 (NE României). Virusul West Nile deține o bogată istorie în ceea ce privește infecțiile provocate la om în România. Cel mai sever focar de infecție cu virusul West Nile la om, forma neuroinvasivă, a evoluat în anul 1996, înregistrând 393 de cazuri confirmate [Tsai și colab., 1998]. În 2010 au fost declarate 57 de cazuri, pacienții fiind distribuiți pe raza a 19 județe din sudul, vestul, centrul și estul țării [Kolodziejek și colab., 2014]. În România nu există date suficiente care să confirme rolul căpușelor în menținerea și transmiterea infecției cu virusul West Nile. Un singur studiu a raportat identificarea agentului viral în căpușele *Hyalomma marginatum marginatum* colectate de pe păsări [Kolodziejek și colab., 2014]. Sunt necesare acțiuni suplimentare de supraveghere în ceea ce privește rolul căpușelor Ixodidae în circulația virusului West Nile pe teritoriul României.

Un amestec format din 16 probe de ARN extrase din căpușele din zona 2 a fost pozitiv pentru infecția cu virusul Bourbon. Până în anul 2015, genul *Thogotovirus* (familia *Orthomyxoviridae*) era format din 6 virusuri distincte (Araguari, Aransas Bay, Dhori, Jos, Thogoto și Upolu). Acești agenți au fost asociați căpușelor moi și dure, având o răspândire geografică largă. Două specii ale genului *Thogotovirus* (virusurile Thogoto și Dhori) au fost recunoscute ca fiind patogene pentru om; au fost identificați anticorpi specifici acestor agenți la persoane din Europa, Asia și Africa [Kosoy și colab., 2015].

Virusul Bourbon a fost izolat în 2014 de la un pacient din Kansas, SUA, ce a fost parazitat de o căpușă, dezvoltând apoi un sindrom febril, însoțit de trombocitopenie și leucopenie, ce a evoluat fatal. Încadrarea acestui virus în genul *Thogotovirus* s-a realizat în urma secvențierii de ultimă generație și a analizei filogenetice [Kosoy și colab., 2015]. Având în vedere gradul ridicat de patogenitate a acestui virus (evoluția fatală a pacientului), este necesar a se realiza confirmarea prezenței acestui virus în căpușele din România prin implementarea unor acțiuni sistematice de supraveghere a căpușelor nehrănite.

8.5 CONCLUZII PARȚIALE

1. În căpușele testate pentru agenții bacterieni și parazitari s-au înregistrat **pentru prima dată numeroase asocieri ale patogenilor, de câte doi, trei, patru și cinci specii diferite pe același individ vector**. Se generează astfel noi abordări privind co-transmiterea acestor agenți la oameni și/sau la animale și **efectul coinfectiilor** asupra severității simptomelor și eficacității tratamentului.
2. O parte din căpușele Ixodidae cercetate au fost **pozitive pentru secvențele specifice virusului West Nile**, un agent important pentru țara noastră prin prisma numeroaselor cazuri înregistrate la om.
3. **Prezența virusului Bourbon, semnalată pentru prima dată în România**, va trebui confirmată, având în vedere faptul că acesta este un agent cu implicații importante pentru patologia umană.
4. Acest studiu demonstrează **utilitatea unei metode rapide de detecție** (Sistemul BioMark *real time*-PCR) 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 METODA SECVENȚIERII DE ULTIMĂ GENERAȚIE

CHAPTER IX

CHARACTERIZATION OF TICK MICROBIAL COMMUNITIES USING NEXT-GENERATION SEQUENCING

Vectorii biologici ai infecțiilor umane și animale sunt în principal specii de artropode capabile să transmită agenți infecțioși la om dar și la alte gazde. Printre aceștia, căpușele transmit cea mai mare varietate de agenți patogeni, la animale și la om, comparativ cu orice alt artropod. *Ixodes ricinus* (căpușa oii) este cea mai răspândită specie din Europa, fiind vector pentru numeroși agenți bacterieni inclusiv pentru *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), agentul etiologic al bolii Lyme. *Ixodes ricinus* este de asemenea vector competent pentru unele specii patogene din genul *Rickettsia*, *Anaplasma* și *Ehrlichia* [Parola și colab., 2001a].

Exceptând agenții patogeni, în căpușe coexistă și alte microorganisme, cum ar fi endosimbionți, comensali sau agenți microbieni preluați în urma hrănirii pe animalele gazdă. Totalitatea acestor categorii ce ocupă diferite nișe ale organismului poartă denumirea de microbiomă, un termen introdus de către Joshua Lederberg [Narasimhan și colab., 2015]. Metagenomica permite identificarea tuturor comunităților microbiene asociate gazdelor, fiind aplicată anterior cu succes în domenii de ecologie, pentru caracterizarea comunităților microbiene din cadrul unor ecosisteme complexe (sol, ape oceanice) [Venter și colab., 2004] dar și pentru investigarea unor agenți infecțioși cu importanță medicală și veterinară [Cox-Foster și colab., 2007, Nakamura și colab., 2008]. Metagenomica a beneficiat în ultimii ani de numeroase investiții de ordin financiar dar și intelectual, ce au permis extinderea ariei de utilizare a acestei

aplicații în cercetarea ecologiei, evoluției și diversității microorganismelor [Thomas și colab., 2012].

În cadrul acestui studiu, am evaluat potențialul abordării metagenomice, prin utilizarea secvențierii de ultimă generație pentru detecția agenților patogeni cunoscuți dar și a celor potențial patogeni în căpușele nehrănite colectate în Estul României. De asemenea, am urmărit descrierea diversității populației microbiene prezente în aceste căpușe.

9.1 PROFILUL METAGENOMIC AL COMUNITĂȚILOR BACTERIENE ASOCIATE CĂPUȘELOR NEHRĂNITE DIN ESTUL ROMÂNIEI

9.1.1 Obiectivele studiului

Componența comunităților microbiene în căpușele din România a fost descrisă prin aplicarea metodelor clasice de biologie moleculară, ce a permis identificarea unui număr redus de agenți patogeni. Metodele de cultivare sau amplificare genică au permis caracterizarea unei părți mici din microbioma căpușelor. Tehnologiile de metagenomică au depășit aceste limitări, dând posibilitatea identificării întregii comunități microbiene asociată căpușelor. Rapida dezvoltare a metodelor de secvențiere de ultimă generație (NGS), combinată cu analiza bioinformatică, a dus la revoluționarea cercetării în domenii precum epidemiologia și diagnosticul bolilor infecțioase.

În acest context, am efectuat un studiu având drept scop inventarierea agenților bacterieni prezenți în cele trei mixuri de căpușe nehrănite. Pentru descrierea microbiomei din căpușe a fost aplicată secvențierea ARN-ului ribozomal, o metodă utilizată în cadrul studiilor de filogenie [Tremblay și colab., 2015].

9.1.2 Materiale și metode

Secvențierea de ultimă generație a fost realizată în cadrul *PathoQuest* (Paris, Franța) utilizând platforma NextSeq Illumina. După extracția ARN-ului din fiecare probă, din cele 557 de căpușe colectate am obținut trei mixuri de probe. Mixul de probe a fost constituit fără a lua în considerare zona de colectare, specia sau stadiul de dezvoltare al căpușelor. Mixurile au fost obținute prin adăugarea a câte 2 μ l de ARN din fiecare probă, fiind constituite prin distribuirea egală a celor 557 de probe. Cele trei mixuri, conținând

extractele de ARN au fost incluse într-un studiu ce a vizat descrierea populațiilor de bacterii din căpușe prin analiza ARN-ului.

9.1.3 Rezultate și discuții

Microbioma asociată căpușelor conține specii simbiote și parazitare dar și agenți infecțioși transmiși gazdelor vertebrate. În cadrul acestui studiu s-a realizat o descriere a comunităților bacteriene asociate căpușelor nehrănite colectate din estul României (*I. ricinus*, *H. punctata*, *D. reticulatus*). Citirile, asamblate în secvențe ce au putut fi atribuite specific, au fost încadrate într-un procent foarte mare eucariotelor, în special căpușelor *Ixodes* și altor artropode strâns înrudite cu acestea (98% în mixul-1, 99% în mixul-2 și 97% în mixul-3) (Figurile 9.1; 9.2; 9.3). Dintre citirile atribuite, cele specifice bacteriilor au reprezentat 2% din numărul total în mixul-1, 1% în mixul-2 și 3% în mixul-3. În toate cele trei mixuri, au dominat bacteriile din Încregătura *Proteobacteria*, urmate de agenții încadrați în *Actinobacteria* și *Firmicutes* (Figurile 9.4; 9.5; 9.6).

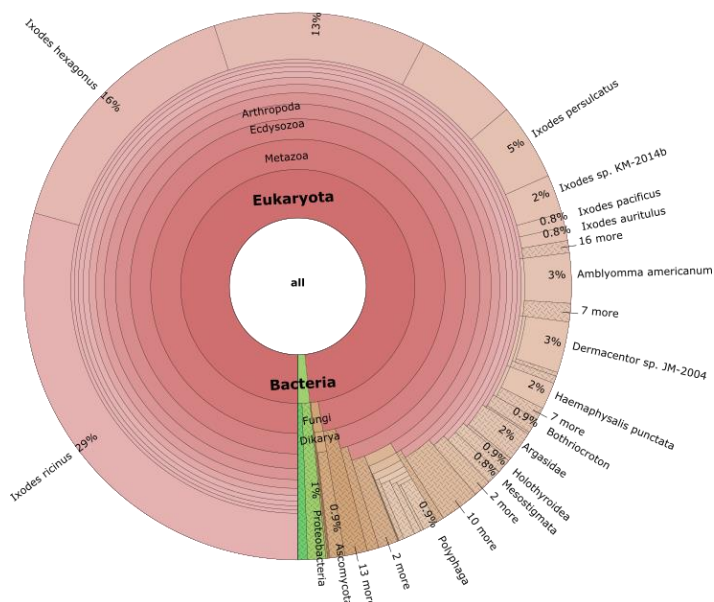


Figura 9.1 Proportia citirilor asamblate în secvențe specifice bacteriilor în mixul-1

Figure 9.1 Assigned sequence reads that matched to bacteria from pool-1

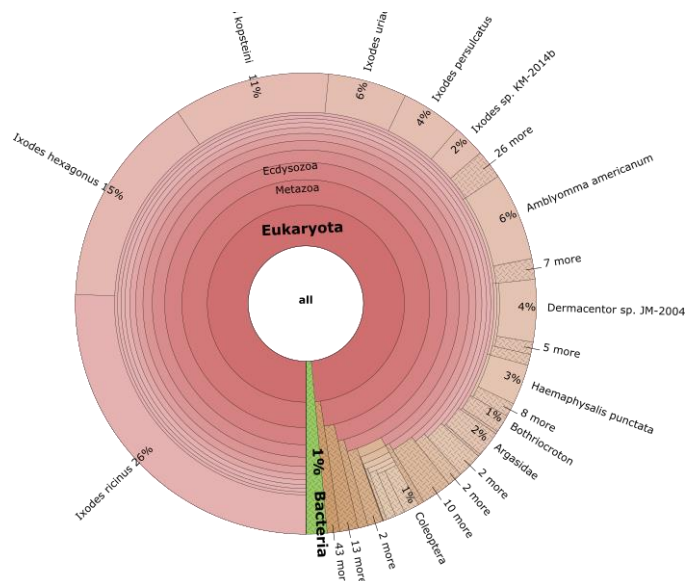


Figura 9.2 Proportia citirilor asamblate în secvențe specifice bacteriilor în mixul-2
Figure 9.2 Assigned sequence reads that matched to bacteria from pool-2

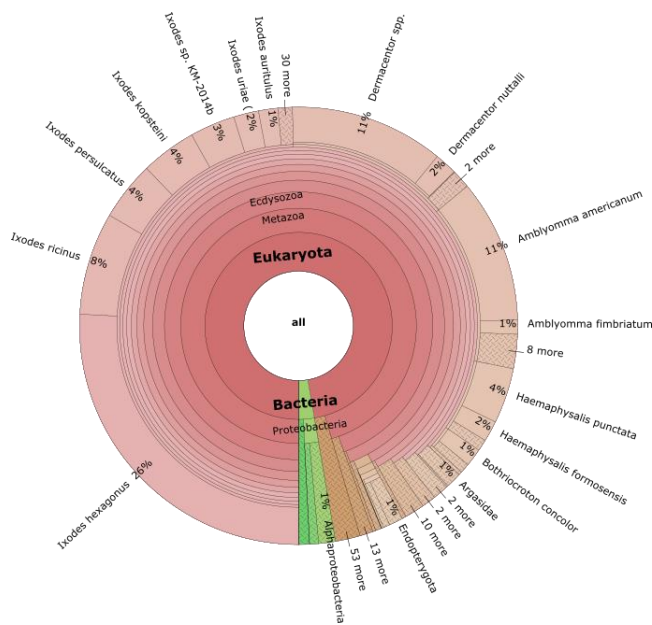


Figura 9.3 Proportia citirilor asamblate în secvențe specifice bacteriilor în mixul-3
Figure 9.3 Assigned sequence reads that matched to bacteria from pool-3

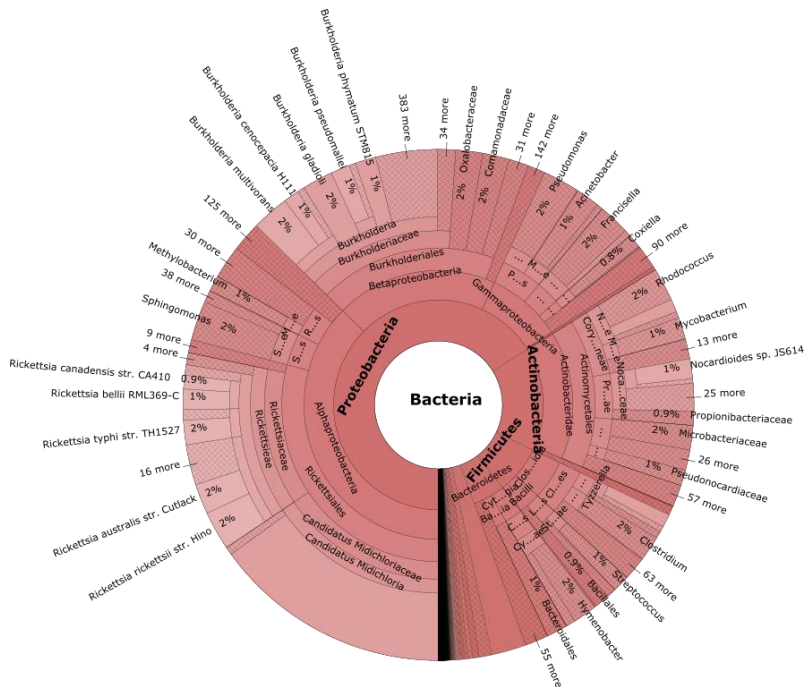


Figura 9.4 Încręgăturile bacteriene dominante în mixul-1
Figure 9.4 Overall dominant bacteria phylum in pool-1

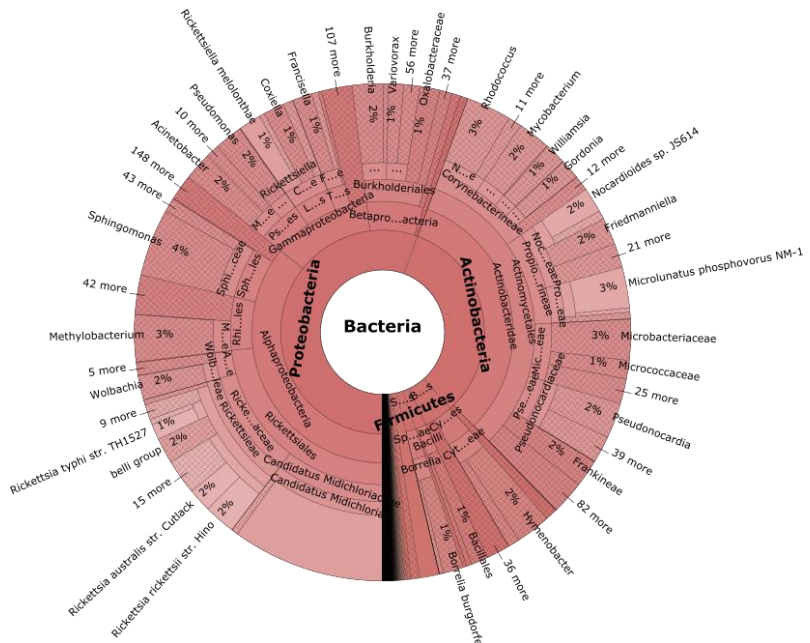


Figura 9.5 Încrângăturile bacteriene dominante în mixul-2
Figure 9.5 Overall dominant bacteria phylum in pool-2

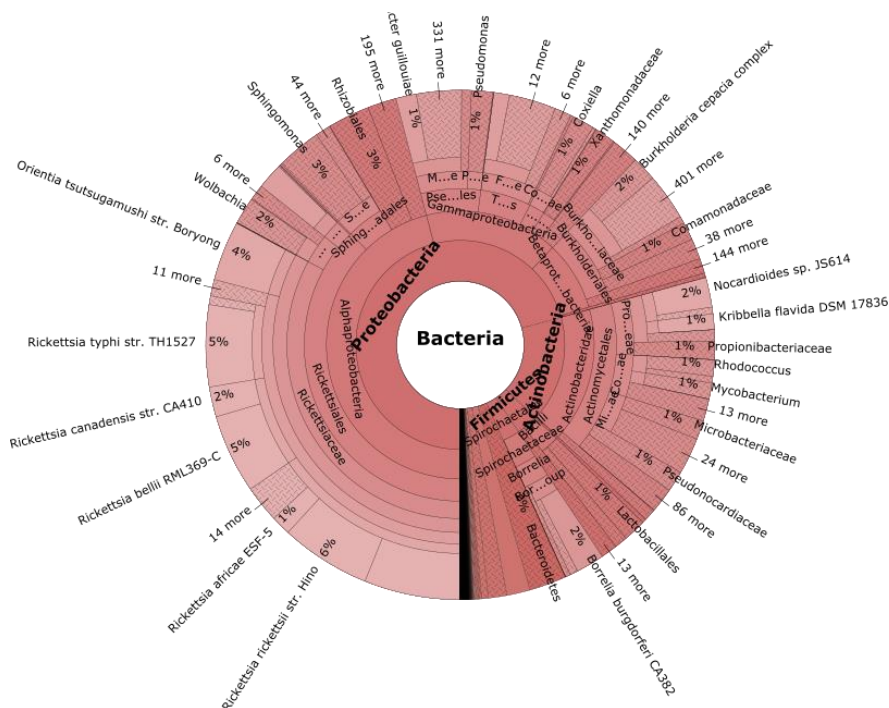


Figura 9.6 Încręgăturile bacteriene dominante în mixul-3
Figure 9.6 Overall dominant bacteria phylum in pool-3

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 (Figurile 9.7; 9.8; 9.9).

Cu toate că, premergător etapei de extracție a ARN-ului, căpușele au trecut printr-o etapă de spălare, unele genuri bacteriene detectate în cadrul acestui studiu sunt regăsite în mod obișnuit în sol, pe suprafața plantelor sau asociate tractului digestiv al insectelor. Nu se poate exclude posibilitatea ca aceste bacterii identificate într-o proporție redusă în căpușe să constituie o componentă a exoscheletului. În cele trei mixuri analizate, au fost identificate nouă genuri bacteriene cu potențial patogen (Figurile 9.10; 9.11; 9.12; 9.13). 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. Aceste bacterii au fost identificate și descrise în numeroase studii din Europa.

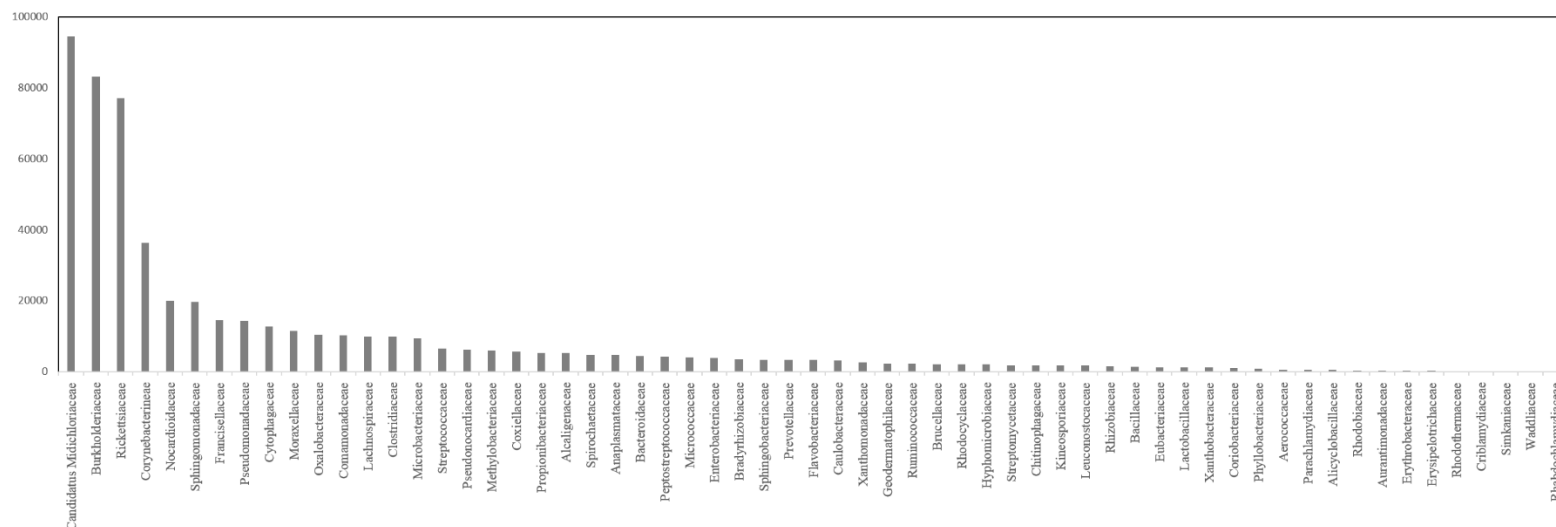


Figura 9.7 Numărul de citiri din Mixul-1 ce au corespuns familiilor bacteriene
Figure 9.7 Number of reads in pool-1 corresponding to bacterial families

Citirile asamblate în secvențe continue au corespuns unui număr mare de familii bacteriene (peste 60 de familii în cele trei mixuri reprezentate de specii bacteriene cu potențial patogen, agenți comensali și endosimbionți, bacterii asociate solului și plantelor).

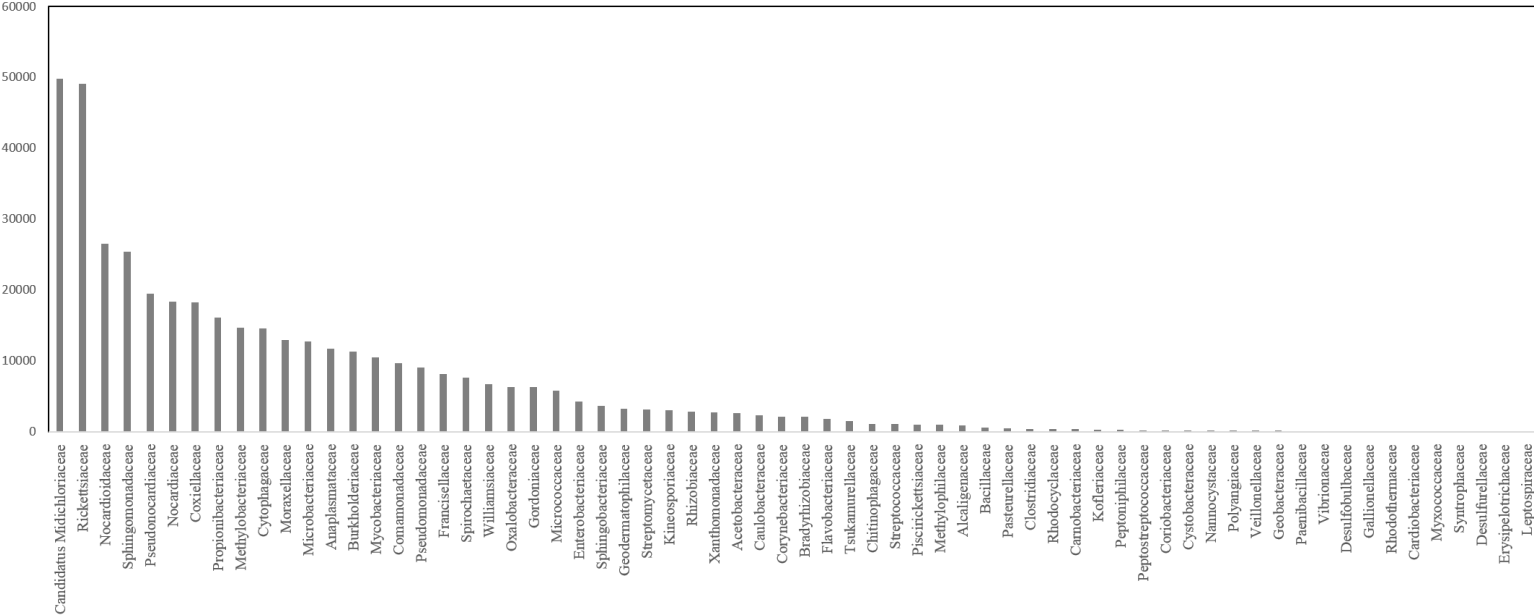


Figura 9.8 Numărul de citiri din Mixul-2 ce au corespuns familiilor bacteriene
Figure 9.8 Number of reads in pool-2 corresponding to bacterial families

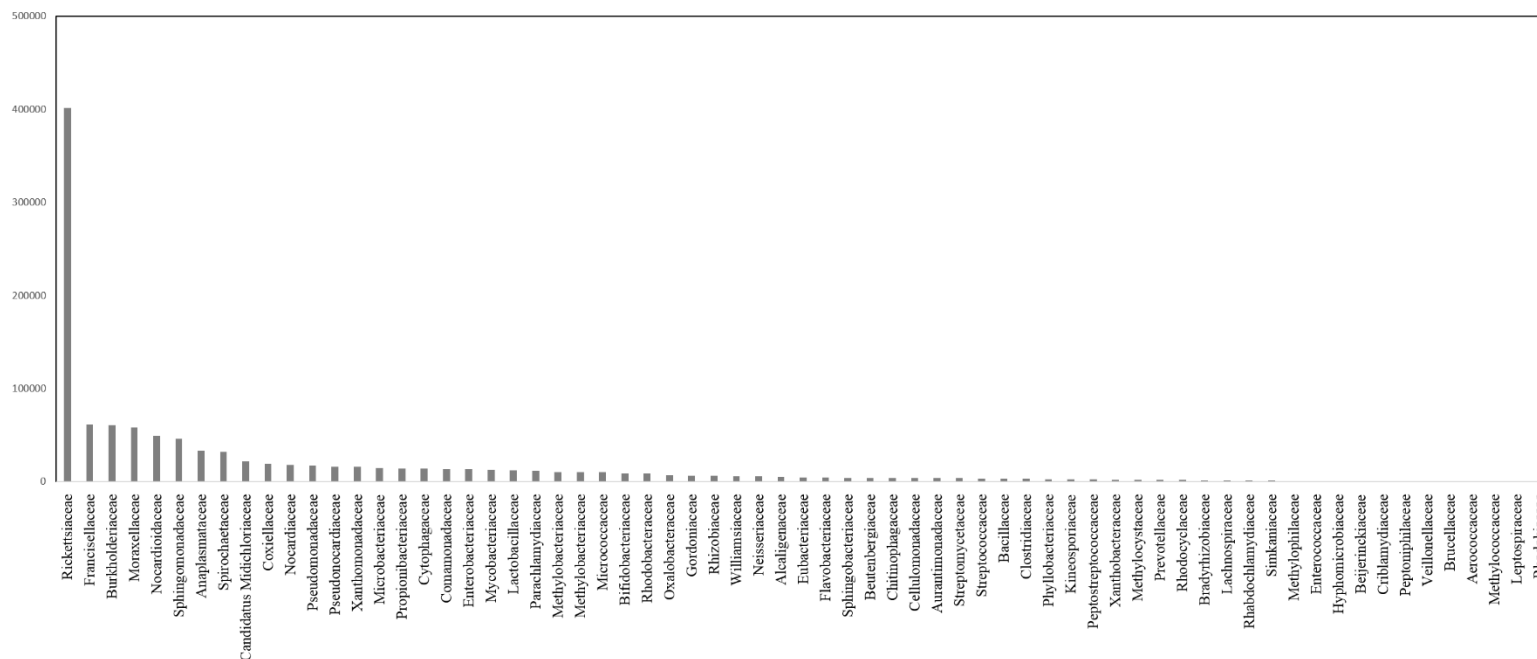


Figura 9.9 Numărul de citiri din Mixul-3 ce au corespuns familiilor bacteriene
Figure 9.9 Number of reads in pool-3 corresponding to bacterial families

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 (Figurile 9.10; 9.11; 9.12; 9.13). Genul *Rickettsia*, alături de genul *Borrelia*, cuprinde numeroase specii patogene ce sunt vectorizate de către căpușele Ixodidae.

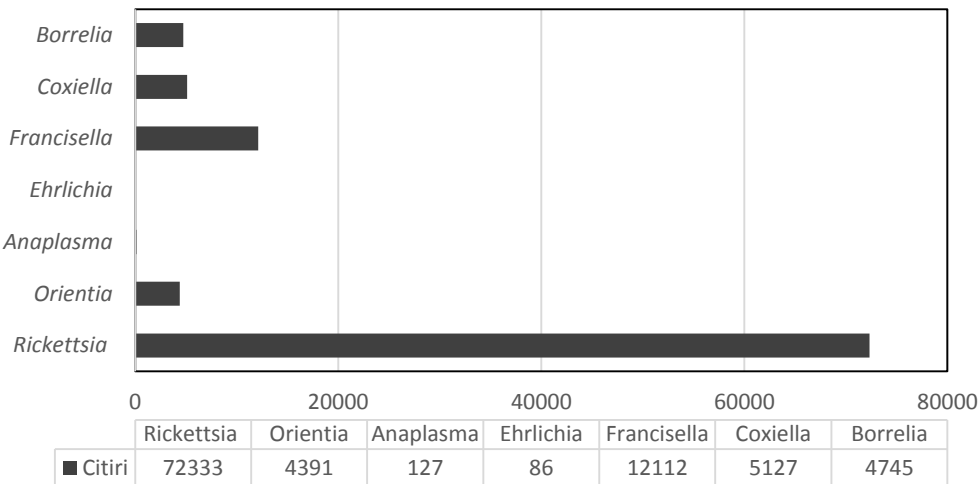


Figura 9.10 Numărul de citiri identificate în mixul – 1 ce au corespuns genurilor bacteriene
Figure 9.10 Number of bacterial reads in pool-1

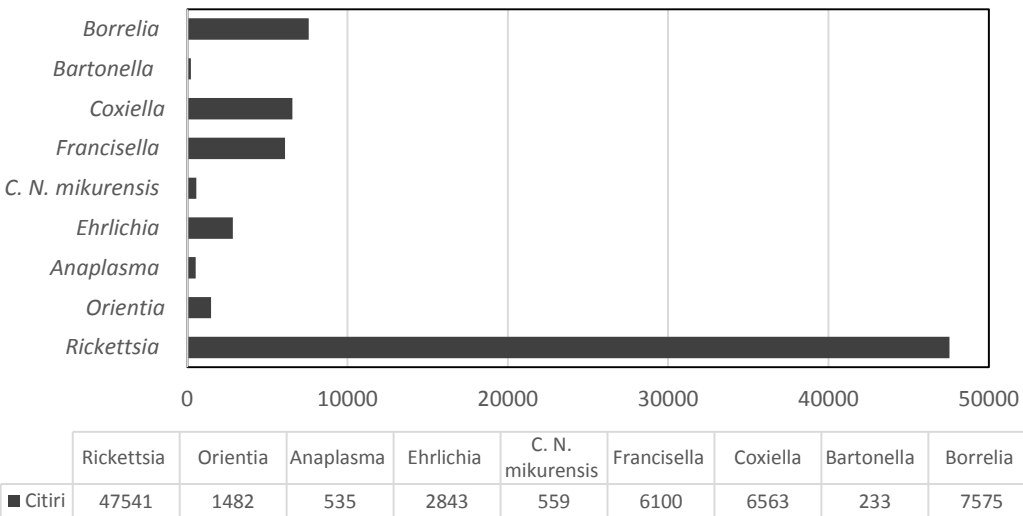


Figura 9.11 Numărul de citiri identificate în mixul – 2 ce au corespuns genurilor bacteriene
Figure 9.11 Number of bacterial reads in pool-2

Candidatus Neoehrlichia mikurensis a avut un număr foarte redus de citiri, fiind identificat în mixul-2 și 3 (Figurile 9.10; 9.11; 9.12; 9.13). Am reușit identificarea acestui agent patogen și prin intermediul tehnicilor de biologie moleculară clasice, respectiv prin PCR cantitativ în căpușele nehrănite testate individual. Prevalența generală a infecției cu *C. N. mikurensis*, în căpușele nehrănite s-a încadrat în valorile raportate de alte studii efectuate în Europa (3.5-7%) [Lommano și colab., 2012].

Prima semnalare a prezenței acestui agent patogen în România a fost raportată în anul 2014, în urma testării prin PCR cantitativ a unei căpușe *Ixodes ricinus* colectată de pe un pacient [Andersson și colab., 2014].

Pe locul secund în ceea ce privește numărul de citiri s-a clasat genul *Francisella*, fiind urmat de genul *Borrelia* (Figurile 9.10; 9.11; 9.12; 9.13). Genul *Bartonella* ce cuprinde specii vectorizate de către căpușele Ixodidae, a avut o abundență redusă în cele trei mixuri testate.

De remarcat este identificarea în cele trei mixuri a speciei *Orientia tsutsugamushi*, agentul etiologic al tifosului exfoliant. Agentul este transmis la om prin mușcătura speciilor de acarieni *Leptotrombidium*.

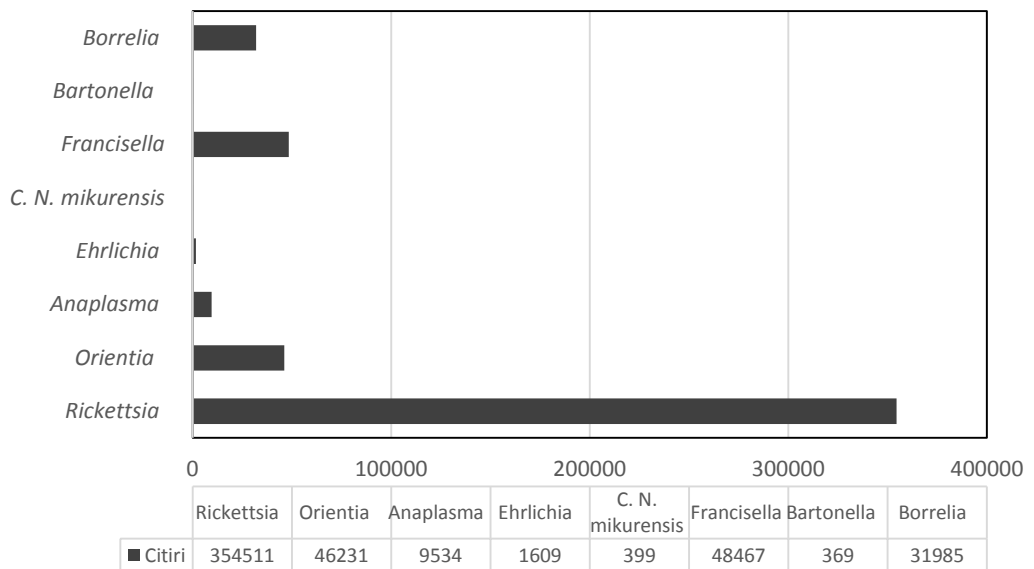


Figura 9.12 Numărul de citiri ale genurilor bacteriene identificate în mixul – 3

Figure 9.12 Number of bacterial reads in pool-3

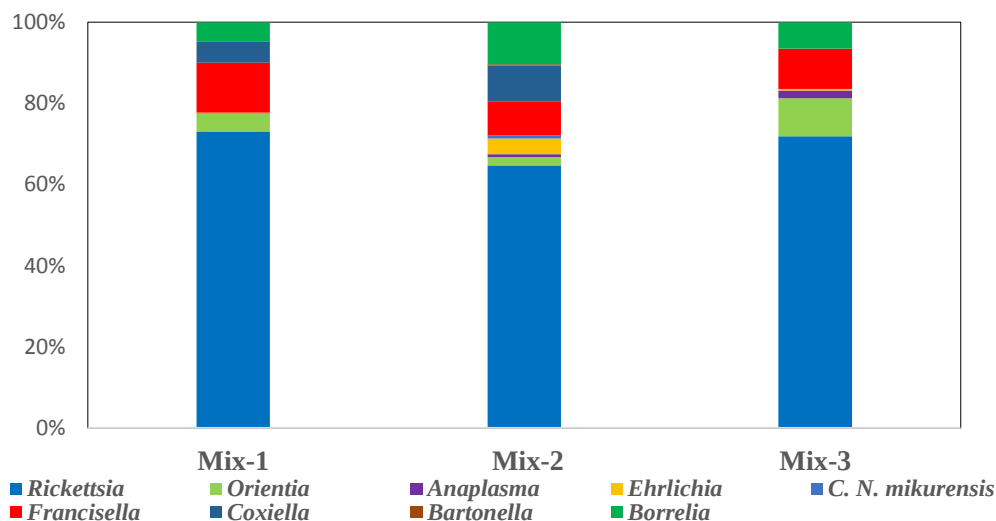


Figura 9.13 Abundența relativă a genurilor bacteriene cu potențial patogen identificate în cele trei mixuri de probe

Figure 9.13 Relative abundance of potential pathogenic bacteria identified in all three pools

Această bacterie produce anual numeroase cazuri de infecție în Asia, peste un milion de cazuri fiind raportate până în prezent. De asemenea, tifosul exfoliant reprezintă o infecție frecvent nediagnosticată. Tabloul clinic este caracterizat printr-un sindrom febril, ce necesită spitalizare, infecția având un grad de letalitate de 10% dacă nu este tratată corespunzător [Razzauti și colab., 2015]. Rezervorul natural este reprezentat de rozătoare, *O. tsutsugamushi* fiind recent identificată pe teritoriul Europei, în cadrul unui studiu de metagenomică ce a testat probe de splină de la 1334 de rozătoare [Cosson și colab., 2015]. Viitoare studii sunt necesare pentru a confirma prezența acestui patogen în căpușele din România, plecând de la rezultatele obținute în cadrul acestui studiu.

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*).

9.1.3.1 Genul *Borrelia*

Agenții patogeni din cadrul genului *Borrelia* au fost descriși în numeroase studii în căpușele Ixodidae, *I. ricinus* fiind un vector competent în

transmiterea diferitelor specii de *Borrelia*. Analiza datelor obținute prin NGS a permis identificarea unui număr mare de specii din cadrul acestui gen. Cea mai mare abundență au înregistrat-o genospeciile din grupul Lyme, respectiv 74% în mixul-1, 83% în mixul-2 și 88% în mixul-3. *Borrelia miyamotoi* (grupul febrei recurente) s-a aflat pe al doilea loc în ceea ce privește numărul de citiri, fiind observată în toate cele trei mixuri (Figurile 9.14; 9.15; 9.16). *B. miyamotoi* este transmisă de aceleași specii ale genului *Ixodes*, capabile de a vectoriza spirochetele responsabile de producerea bolii Lyme. Un studiu recent, efectuat în România, a raportat prezența *B. miyamotoi* în căpușe nehrănite *I. ricinus* cu o prevalență de 1.5% [Kalmár și colab., 2015]. Până în prezent, în țara noastră nu au fost înregistrate evoluții clinice la om.

Fiecare mix a conținut un număr ridicat de specii ale genului *Borrelia* (Figurile 9.14; 9.15; 9.16). Această situație, din punct de vedere medical, are o semnificație aparte deoarece speciile din grupul Lyme pot fi întâlnite în organismul aceleași căpușe, determinând astfel o agravare a simptomatologiei sau evoluția bolii cu semne atipice ce îngreunează stabilirea corectă a diagnosticului.

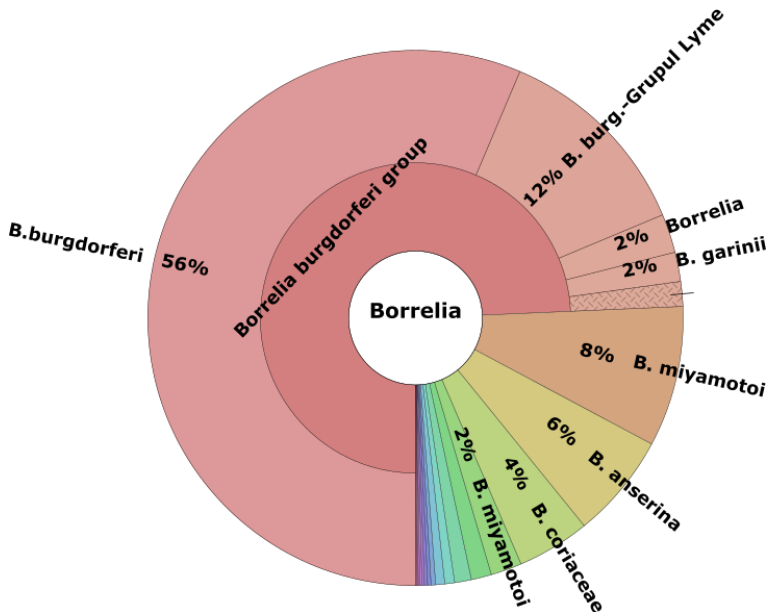


Figura 9.14 Speciile din genul *Borrelia* identificate în mixul-1
Figure 9.14 *Borrelia* species identified in pool-1

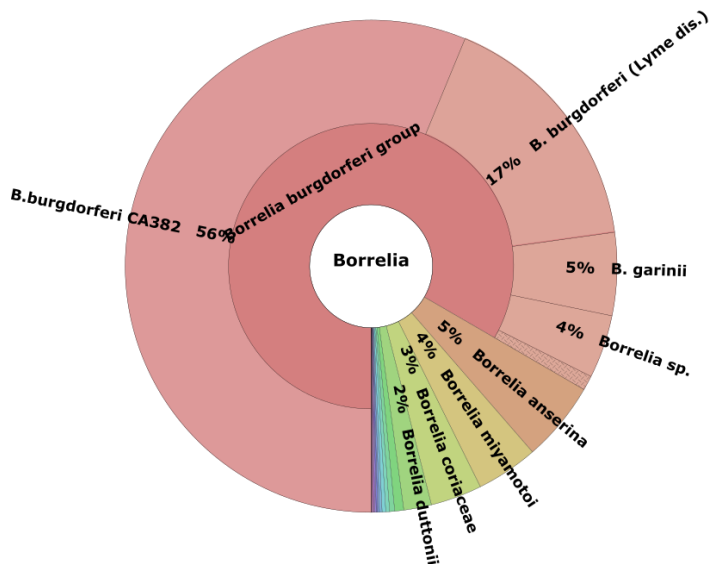


Figura 9.15 Speciile din genul *Borrelia* identificate în mixul-2
Figure 9.15 *Borrelia* species identified in pool-2

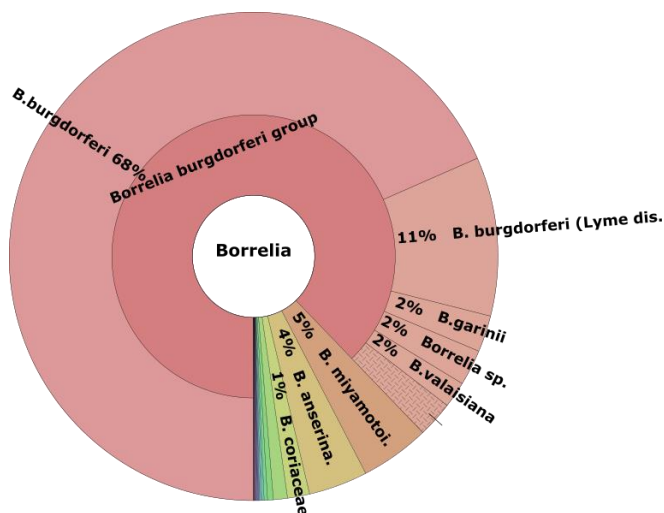


Figura 9.16 Speciile din genul *Borrelia* identificate în mixul-3
Figure 9.16 *Borrelia* species identified in pool-3

9.1.3.2 Genul *Rickettsia*

Dintre agenții cu potențial patogen observați în cele trei mixuri, genul *Rickettsia* a înregistrat numărul cel mai mare de citiri. Au fost identificate specii din toate cele trei grupuri de rickettsii: grupul febrei pătate, grupul tifosului și

grupul belli (Figurile 9.17; 9.18; 9.19). Acest fapt poate ilustra o prevalență ridicată a rickettsiilor în căpușele nehrănite din România. De altfel, anterior secvențierii de ultimă generație, căpușele colectate au fost testate individual prin PCR, utilizând primeri specifici genei *gltA* pentru detecția indivizilor pozitivi la infecția cu *Rickettsia*. Prevalența generală înregistrată a avut un nivel ridicat, de 14.6%. Secvențierea ampliconilor a permis identificarea a doar trei specii de rickettsii (*R. monacensis*, *R. helvetica* și *R. raoultii*). Prin aplicarea tehnologiei NGS, au fost identificate 12 specii diferite de rickettsii, demonstrând în acest mod capacitatea de detecție *de novo* a secvențierii de ultimă generație.

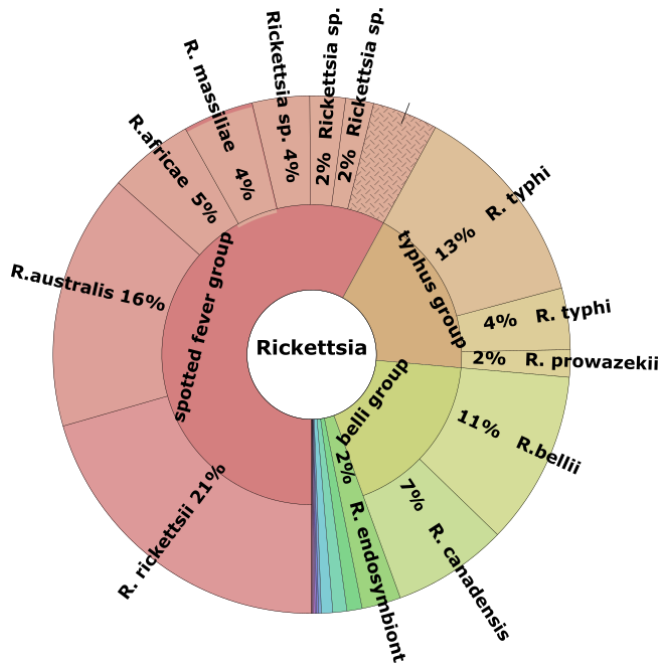


Figura 9.17 Speciile din genul *Rickettsia* identificate în mixul-1

Figure 9.17 *Rickettsia* species identified in pool-1

Dintre speciile identificate în acest studiu, *Rickettsia conorii*, agentul etiologic al febrei pătate mediteraneene (Mediterranean spotted fever - MSF), a fost singura specie descrisă în infecții la om. De altfel, această infecție are o evoluție endemică în sud-estul României, având, în urma unei anchete seroepidemiologice efectuată în anul 2009, o incidență globală de 0.7/100.000 locuitori [Pitigoi și colab., 2013]. Infecțiile determinate de speciile din genul *Rickettsia* la om sunt bine cunoscute în România, însă există un număr limitat de cazuri înregistrate [Ionita și colab., 2016].

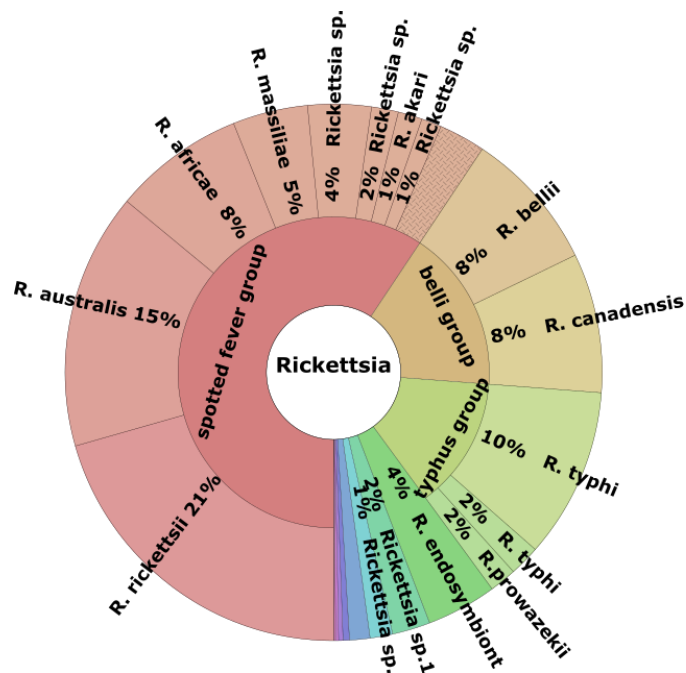


Figura 9.18 Speciile din genul *Rickettsia* identificate în mixul-2
Figure 9.18 *Rickettsia* species identified in pool-2

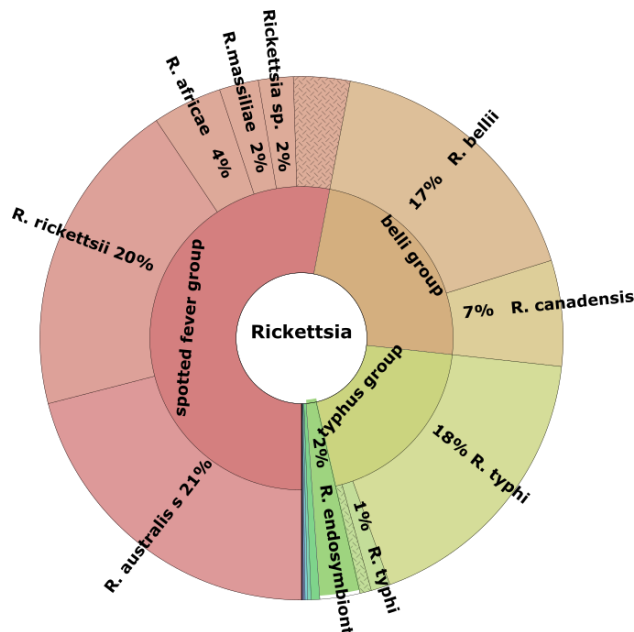


Figura 9.19 Speciile din genul *Rickettsia* identificate în mixul-3
Figure 9.19 *Rickettsia* species identified in pool-3

9.1.3.3 Genul *Anaplasma*

Anaplasma phagocytophilum reprezintă singura specie din genul *Anaplasma* studiată până acum în căpușele nehrănite din România, rata de infecție a căpușelor având o valoare de 3.4%, similară celei raportată la nivel european [Matei și colab., 2015]. Tehnologia NGS ne-a oferit rezultate ce au corespuns genului *Anaplasma*, proporția cea mai mare a citirilor având-o specia *Anaplasma phagocytophilum*, în toate cele trei mixuri (Figurile 9.20; 9.21; 9.22). Au fost identificate secvențe similare și altor specii de *Anaplasma*.

Anaplasma marginale a fost a doua cea mai abundentă specie în cele trei mixuri. Această specie este responsabilă pentru producerea anaplasmozei bovine, prezintă o distribuție globală și este transmisă prin intermediul vectorilor competenți (căpușe Ixodidae) [Howden și colab., 2010]. În România nu au fost raportate infecții produse de această specie, probabil ca urmare a stabilirii unui diagnostic greșit sau din cauza lipsei unui sistem de înregistrare și cuantificare a cazurilor existente.

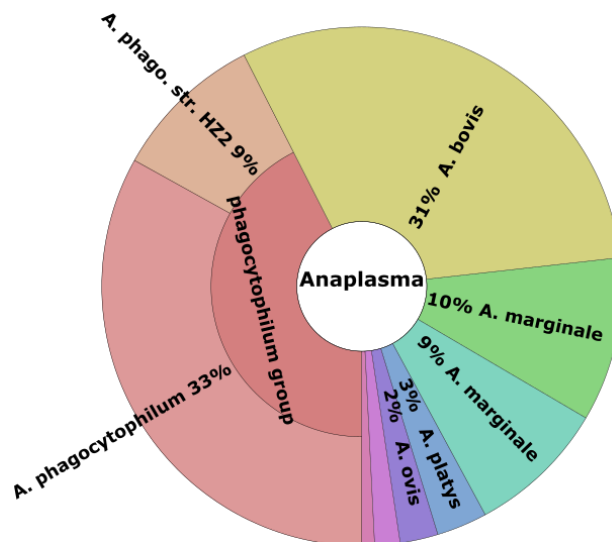


Figura 9.20 Speciile din genul *Anaplasma* identificate în mixul-1

Figure 9.20 *Anaplasma* species identified in pool-1

De asemenea, în România nu există date cu privire la numărul de cazuri de anaplasmoză granulocitară la om (infecție produsă de *Anaplasma phagocytophilum*), însă numeroase studii au indicat circulația acestei specii pe teritoriul țării noastre [Dumitrache și colab., 2013, Ionita și colab., 2013, Kiss și colab., 2014, Mircean și colab., 2012, Pastiu și colab., 2012].

Analiza NGS a evidențiat, totuși, un număr redus de citiri în cele trei mixuri pentru genul *Anaplasma* (127 în mixul-1, 535 în mixul-2 și 9.534 în mixul-3). Pe baza numărului redus de citiri, se poate afirma faptul că probabil există un risc redus în ceea ce privește infecția cu speciile *Anaplasma* în urma mușcăturii căpușelor din estul României.

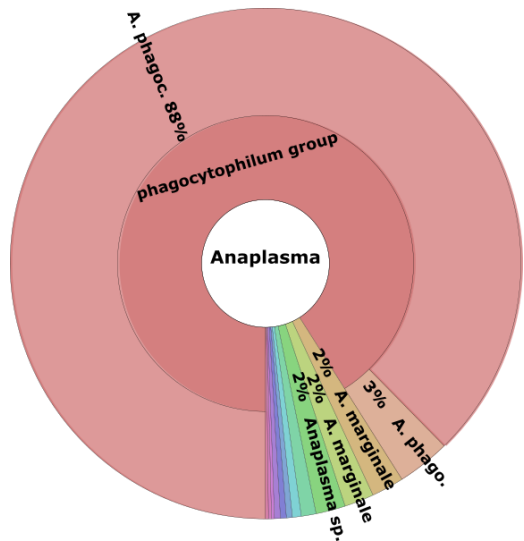


Figura 9.21 Speciile din genul *Anaplasma* identificate în mixul-2
Figure 9.21 *Anaplasma* species identified in pool-2

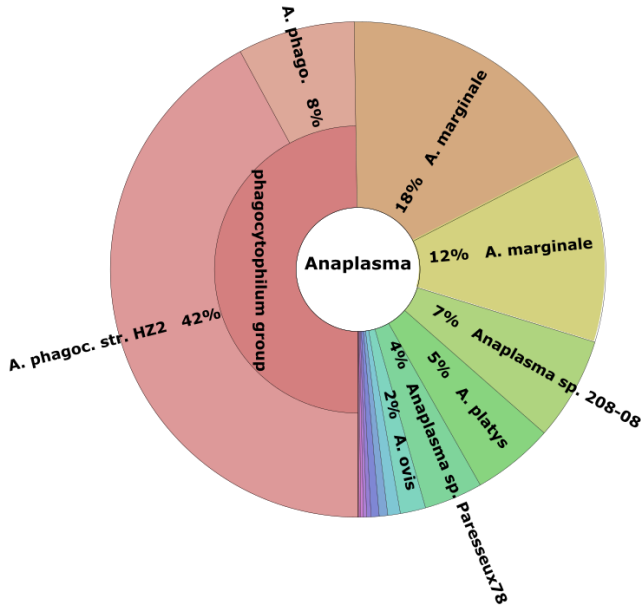


Figura 9.22 Speciile din genul *Anaplasma* identificate în mixul-3
Figure 9.22 *Anaplasma* species identified in pool-3

9.1.3.4 Genurile *Bartonella*, *Francisella* și *Coxiella*

Numeroase studii au raportat prezența *Bartonella* spp. în căpușe colectate de pe vegetație, acesta fiind un argument în favoarea capacității de transmitere a bacteriei de către căpușele ixodide. În cadrul genului *Bartonella*, au fost identificate trei specii cu importanță pentru sănătatea publică: *B. quintana* (agentul etiologic al febrei Trench, vectorizat de către purici), *B. bacilliformis* (agentul etiologic al febrei Oroya la om transmis prin intermediul flebotomilor) și *B. henselae* (boala zgârieturii de pisica, vectorul competent fiind *Ctenocephalides felis*) [Telford și colab., 2010].

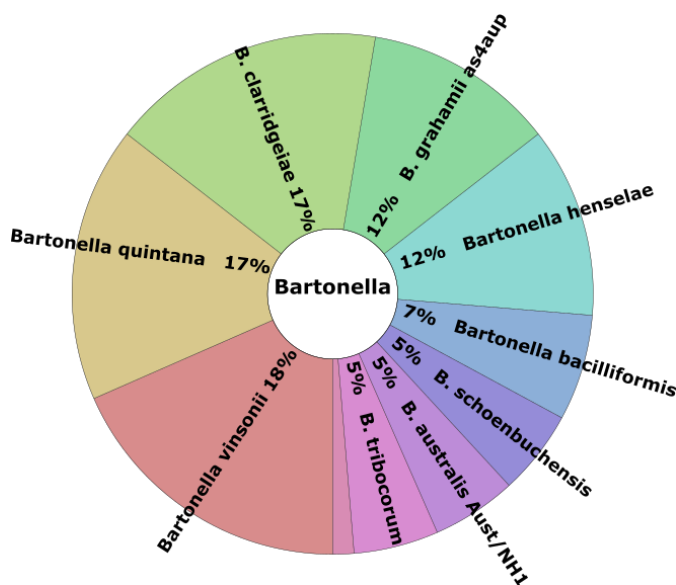


Figura 9.23 Speciile din genul *Bartonella* identificate în mixul-1
Figure 9.23 *Bartonella* species identified in pool-1

Capacitatea de transmitere a acestor specii a fost demonstrată în condiții de laborator, însă există îndoieli ce planează asupra competenței căpușelor ixodide de a transmite *Bartonella* spp. în mod natural [Cotte și colab., 2008, Picascia și colab., 2015].

Cele trei specii ale genului *Bartonella* au fost identificate de către noi prin NGS în cele trei mixuri de căpușe ixodide, alături de alte numeroase specii (Figurile 9.23; 9.24; 9.25). Desigur, studii viitoare vor trebui să stabilească competența vectorială a căpușelor dure pentru speciile de *Bartonella*.

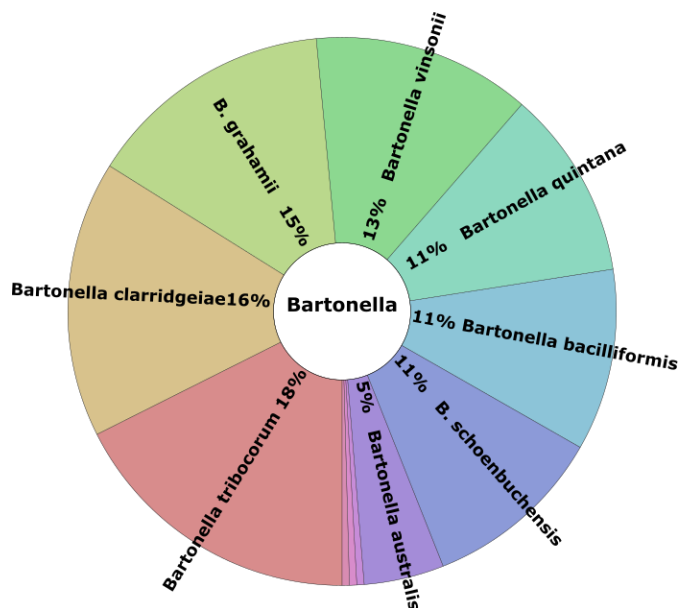


Figura 9.24 Speciile din genul *Bartonella* identificate în mixul-2
Figure 9.24 *Bartonella* species identified in pool-2

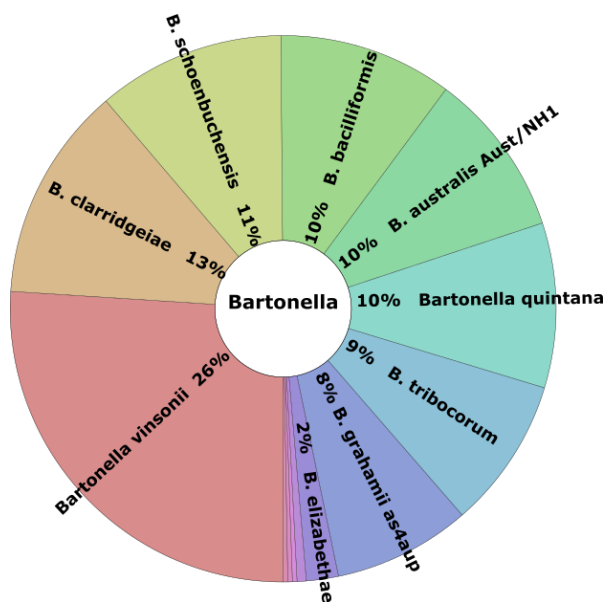


Figura 9.25 Speciile din genul *Bartonella* identificate în mixul-3
Figure 9.25 *Bartonella* species identified in pool-3

Artropodele (în special căpușele ixodide) dețin un rol important în menținerea infecțiilor cu *Francisella tularensis* în natură. De asemenea, capacitatea de vector a acestora a fost demonstrată prin transmiterea agentului tularemiei atât la animale cât și la om. Speciile de căpușe cel mai des implicate în transmiterea tularemiei la om sunt *Ixodes ricinus* și *Dermacentor reticulatus*, acestea având și capacitatea de rezervor, ca urmare a menținerii infecției transstadial (larvă-nimfă-adult). Transmiterea transovariană a infecției (femelă-ou) este încă larg dezbătută [Genchi și colab., 2015]. O problemă în detecția *F. tularensis* o constituie prezența endosimbionților *Francisella*-like în căpușe, strâns înrudiți cu agentul tularemiei; acest aspect îngreunează supravegherea prin PCR a acestui patogen, clasat drept un agent de bioterorism categoria A [Kugeler și colab., 2005].

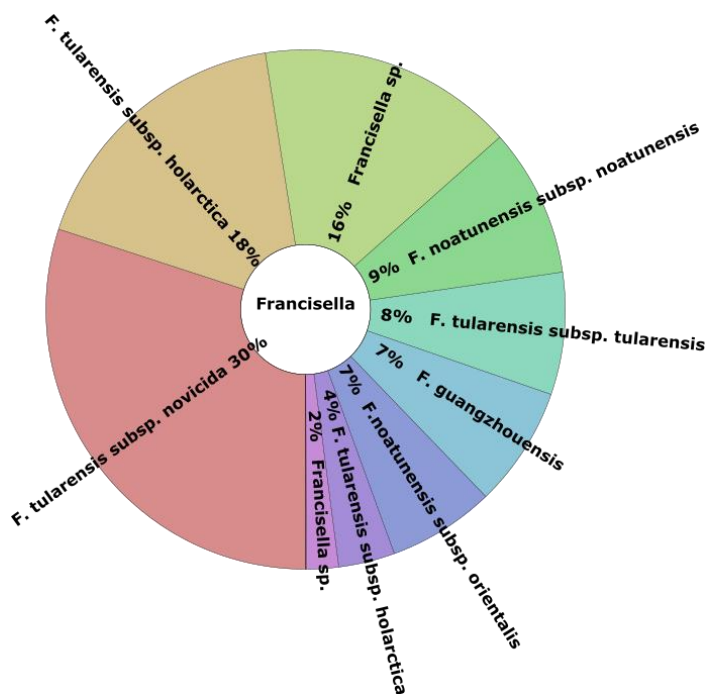


Figura 9.26 Speciile din genul *Francisella* identificate în mixul-1
Figure 9.26 *Francisella* species identified in pool-1

Secvențierea de ultimă generație realizată în acest studiu a identificat citiri aparținând genului *Francisella* în toate cele trei mixuri, mixul-3 având numărul cel mai mare de citiri – 48.467, mixul-1 a avut 12.112 iar mixul-2 a înregistrat 6.100 de citiri.

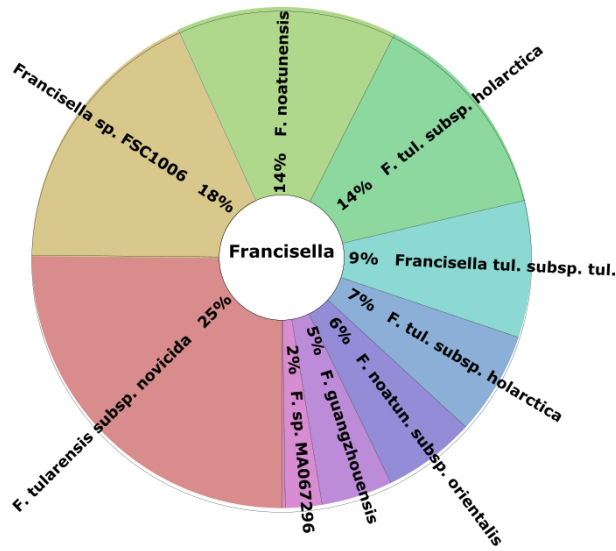


Figura 9.27 Speciile din genul *Francisella* identificate în mixul-2
Figure 9.27 *Francisella* species identified in pool-2



Figura 9.28 Speciile din genul *Francisella* identificate în mixul-3
Figure 9.28 *Francisella* species identified in pool-3

Citirile au corespuns în majoritate speciei *F. tularensis*, agent patogen atât pentru om cât și pentru animale, fiind anterior descris în România în

căpușele *I. ricinus* colectate de pe gazde (Figurile 9.26; 9.27; 9.28) [Paduraru și colab., 2012].

Coxiella burnetii este reprezentantul cel mai de seamă din cadrul genului *Coxiella*, fiind responsabil de producerea febrei Q la om. Principalul mod de transmitere a bacteriei se realizează prin intermediul aerosolilor. Un rol secundar în transmitere îl au căpușele ixodide, capabile să transmită infecția și vertical (transsdial și transovarian), în acest mod având și rol de rezervor. Se cunosc peste 40 de specii de căpușe capabile să găzduiască *C. burnetii*, vectorii fiind și un indicator al circulației acestui agent în natură [Toledo și colab., 2009].

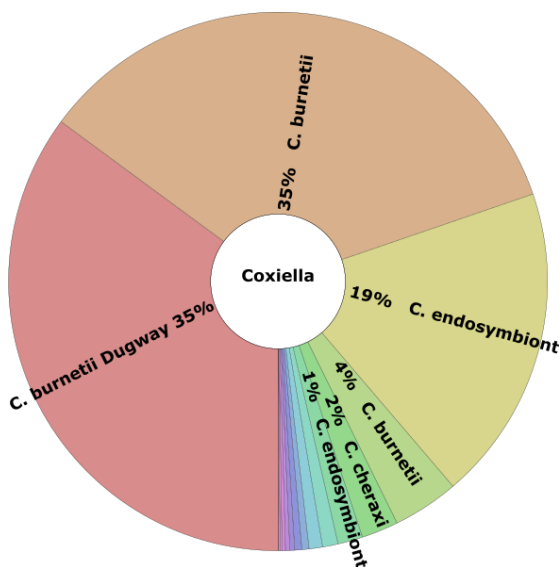


Figura 9.29 Speciile din genul *Coxiella* identificate în mixul-1
Figure 9.29 *Coxiella* species identified in pool-1

În cadrul genului *Coxiella*, analiza NGS a oferit numărul cel mai mare de citiri agentului febrei Q, fiind specia dominantă, însoțită de agenți endosimbionți ai căpușelor (Figurile 9.29; 9.30; 9.31).

În România, *Coxiella burnetii* a fost raportată într-un singur studiu. Căpușele *Hyalomma aegyptium* colectate de pe țestoase au înregistrat o prevalență de 10% pentru infecția cu *C. burnetii* [Pastiu și colab., 2012]. Chiar dacă nu reprezintă sursa principală de transmitere, vectorizarea de către căpușe a agentului febrei Q ar trebui luată în considerare în momentul evaluării riscului reprezentat de acest patogen.

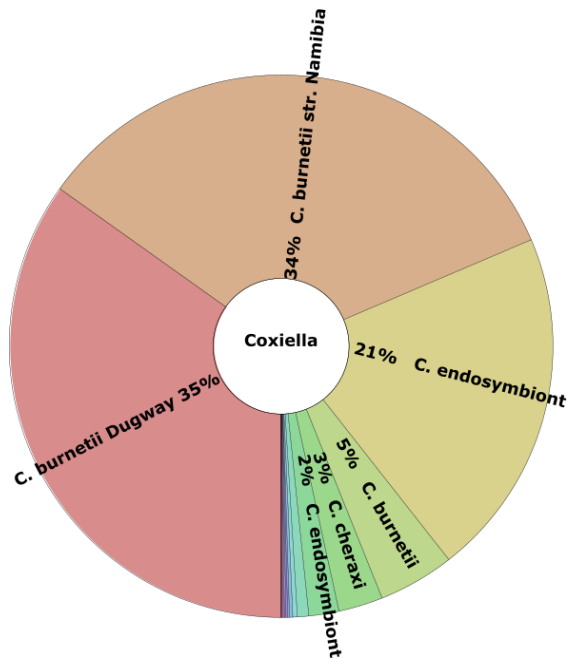


Figura 9.30 Speciile din genul *Coxiella* identificate în mixul-2
Figure 9.30 *Coxiella* species identified in pool-2

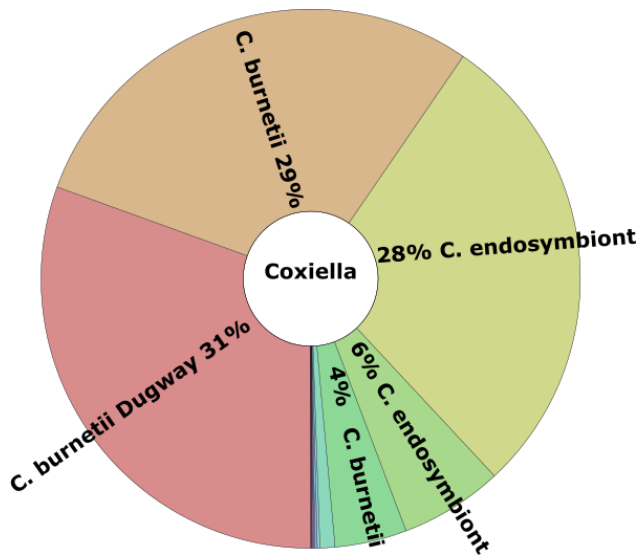


Figura 9.31 Speciile din genul *Coxiella* identificate în mixul-3
Figure 9.31 *Coxiella* species identified in pool-3

9.2 PROFILUL METAGENOMIC AL COMUNITĂȚILOR VIRALE ASOCIATE CĂPUȘELOR NEHRĂNITE DIN ESTUL ROMÂNIEI

9.2.1 Obiectivele studiului

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 [Raileanu și colab., 2016].

În cadrul acestui studiu, am 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.

9.2.2 Materiale și metode

După extracția ARN-ului din fiecare probă, din cele 557 de căpușe colectate am obținut trei mixuri de probe. Mixul de probe a fost efectuat fără a ține cont de zona de colectare, specia sau stadiul de dezvoltare al căpușelor. Au fost obținute în trei mixuri constituite prin distribuirea egală a celor 557 de probe. Fiecare mix a fost obținut prin adăugarea a câte 2 μ l de ARN din fiecare probă. Cele trei mixuri au fost mai apoi analizate prin HTS, pe platforma NextSeq Illumina (Tabel 9.1).

Tabel 9.1/Table 9.1

Distribuția probelor de ARN în cele trei mixuri analizate prin HTS
Distribution of RNA samples in pools included in HTS analysis

ID (HTS)	Probe	Nr. de căpușe
Mix 1	Q31 - Q110	160
	Q140 - Q220	
Mix 2	Q221 - Q380	160
	Q401 - Q520	
Mix 3	Q01 - Q30	237
	Q111 - Q140	
	Q381 - Q400	
	Q521 - Q557	

Toate etapele analizei (prepararea ARN-ului total, pregătirea bibliotecilor,

secvențierea pe platforma NextSeq Illumina, analiza bioinformatică) au fost efectuate în cadrul companiei *PathoQuest* (Paris, Franța).

9.2.2.1 Secvențierea pe scară largă (HTS)

Cele trei amestecuri obținute din probele de ARN au fost retro-transcrise în ADN complementar și apoi amplificate aleatoriu prin intermediul protocolului MDA (multiple displacement amplification), a polimerazei phi29 și a hexamerilor random [Moutailler și colab., 2016a].

Analiza bioinformatică efectuată în cadrul *PathoQuest* a fost divizată în trei etape principale: filtrare calitativă, asamblare și atribuirea taxonomică a citirilor continue (*contigs*) și singulare (*singletons*).

Filtrarea calitativă

Citirilor obținute li s-au aplicat succesiv patru filtre de calitate (Figura 9.32):

- Supresia duplicatelor, a citirilor de calitate scăzută și a homopolimerilor
- Eliminarea secvențelor adăugate în cadrul tehnologiei de secvențiere (adaptorii, primeri);
- Filtrarea citirilor gazdei: citirile au fost aliniate genomului complet *Homo sapiens*: hg19, GRCh37 - Genome Reference Consortium Human Reference 37 (GCA_000001405.1);
- Eliminarea citirilor similare ARN-ului ribozomal utilizând o bază de date dedicată ARN-ului ribozomal.

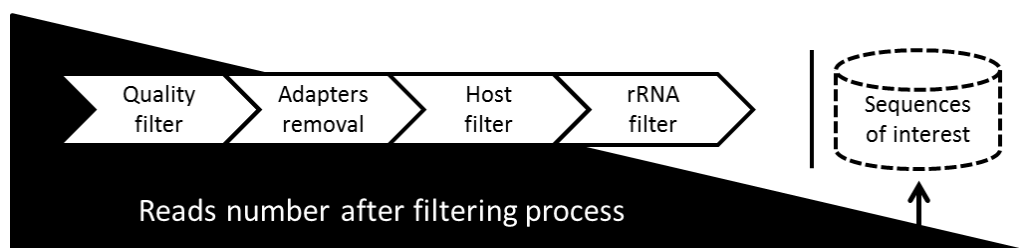


Figura 9.32 Numărul de citiri obținute după procesul de filtrare
Figure 9.32 Number of reads after filtering process

Asamblarea

Citirile ce prezintă extremități similare se suprapun permițând asamblarea lor în *contig*-uri. Așadar, *contig*-urile reprezintă secvențe consens de dimensiuni mai mari citirilor corespondente. Lungimea *contig*-urilor generate a fost setată la un minim de 100 de nucleotide. Citirile rămase neasamblate sunt denumite *singletons*.

Atribuirea taxonomică a citirilor continue (contigs) și singulare (singletons).

Atribuirea taxonomică s-a efectuat prin utilizarea algoritmului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). *Contig*-urile au fost mai întâi aliniate în baza de date de secvențe nucleotidice EMBL-EBI. *Contig*-urile ce nu au fost încadrate au fost mai apoi comparate într-o bază de date cu secvențe proteice UniRef100. Atribuirea taxonomică a fost determinată pe baza rezultatului cel mai exact (gradul cel mai mare de identitate a *contig*-urilor). *Contig*-urile ce nu au fost încadrate după cele două runde de aliniere, au fost catalogate drept necunoscute. După cum este descris și în figura 9.33, *contig*-urile au fost considerate apropiate de secvențele de referință cunoscute atunci când au îndeplinit următoarele caracteristici: identitate de cel puțin 90% și identitate între cel puțin 100 de nucleotide.

Contig-urile ce au fost distribuite unui virus, însă nu au îndeplinit criteriile de mai sus, au fost considerate îndepărtate de secvențele de referință cunoscute. Pentru o anumită specie de virus îndepărtată, au fost însumate toate *contig*-urile similare. Dacă această sumă depășea 500 de nucleotide, *contig*-urile corespondente erau mai apoi analizate.

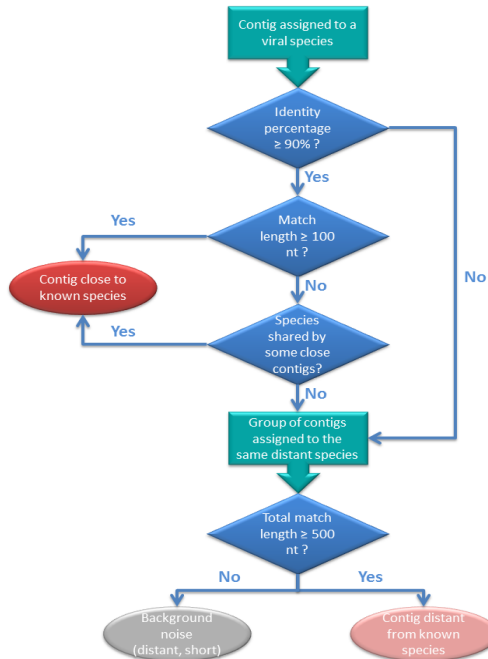


Figura 9.33 Atribuirea taxonomică a *contig*-urilor

Figure 9.33 Flowchart of the taxonomic assignment of contigs showing a viral taxonomic assignment as best hit

Singletons (citiri singulare) cu lungimea de cel puțin 60 nucleotide au fost comparate în cadrul unei baze de date pentru agenți virali. Citirile cu identitate virală au fost ulterior aliniate bazei de date pentru nucleotide. Încadrarea taxonomică virală a fost validată după o ultimă filtrare: încadrarea virală să corespundă identității celei mai mari și lungimea identității virale să fie de minimum 60 nucleotide. *Singletons* au fost considerate apropiate de secvențele de referință cunoscute atunci când procentul de identitate cu secvențele virale depășea 90%, în caz contrar au fost încadrate îndepărtate de aceste secvențe de referință.

9.2.2.2 Screening pentru detecția virusurilor Bunyavirus-like

Pentru a determina prevalența secvențelor virale în căpușe, am efectuat testarea prin PCR, plecând de la probele de ARN. Secvențele obținute prin HTS aparținând agenților virali cunoscuți și a unor virusuri potențial noi, au fost utilizate drept model pentru crearea de primeri specifici (Tabel 9.2); probele identificate ca fiind pozitive au fost mai apoi secvențiate pentru confirmare.

1. RT-PCR

Probele individuale de ARN (557) au fost supuse unei reacții RT-PCR pentru obținerea ADN-ului complementar (ADNc) ce a fost inclus ulterior în analiza de determinare a prevalenței secvențelor virale.

Am utilizat *kitul* SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) pentru obținerea unui volum final de 20μl ADNc, parcurgând următorii pași:

I. Adăugarea într-un tub de 200 μl:

- 8 μl ARN total
- 1 μl hexameri random (50 ng/ μl)
- 1 μl mix dNTP (10 mM)

Volumul final obținut de 10 μl a fost incubat la 65°C timp de 5 minute iar imediat după, tubul a fost menținut pe gheață timp de 2 min.

II. *Prepararea mixului în următoarea ordine:*

- 2 μl 10xRT Tampon
- 4 μl MgCL₂ (25mM)
- 2 μl DTT (0.1M)
- 1 μl RnaseOUT (40U/μl)
- 1 μl SuperScript III RT (200U/μl)
- Volum final: 10 μl

Tabel 9.2/Table 9.2

Primeri construiți pentru *contig*-urile ce au avut identitate cu agenți virali
Designed primers for the *contigs* that matched with viral agents

Mixul	Agent viral	Contig-uri	Identitate (%)	Primeri construiți (sens și antisens)
Mix - 1	Virusul South Bay	contig_340060	78.07	CTAGATAATGAGCTGTTCCA CAC CTA CCT GAC ATG TTT GT
		contig_13638	80.16	TTC GTG GTG AAG AAC TCC CA CCA TGC TGA GCC TTT TTA AA
	Blacklegged tick phlebovirus-2	contig_62988	75.97	TAC AGA AGA GTT AAT GTC CG TAG AAC TCT AGC CAG TAC GA
		contig_105778	82	TTCTTCACCACGAATTCTAC TTG TGT CCT GTT TCT ACT TG
		contig_257351	71.95	TCATACAACTCATCCAGAAC AGA TAG TGA GAA GGC TGA AA
		contig_417345	76.1	TCAAGACCTCAGGCAGTTTT TGA AGT TCT GGG AAG TGA AA
	Virusul South Bay	contig_145462	74.92	AGA AAA CCT CAG TAA CAG CA ACA GGA CTA TGA CTT TTC TC
		contig_163739	73.23	CTTATCAAGTTCAGGACAGT CTA CCG GGA AAA TGA AAT GT
		contig_223402	73.36	ATTTTACAGTGTAGACCAGG TGG AAA CCA TTA GTT CAG GA
		contig_298658	77.34	GAACTTCCTTTTGCCGTACT TTG ATG AAA GCA AGA GTG AG
		contig_222467	80.75	GACACTATGTGAGCAAGTTT ATC TAG CCT CAA TCA AGT CT
		contig_305653	73.77	TTAGATCCTCCTTCCAAGTT GTT CTC TAT GAA AAG GCT CA
		contig_308662	77.24	ACACAAATCTCAAGCCTCAT TTG AGA CAA CTG GAC ATT TG
		contig_337595	77.98	TCTTAGTGGTCGCAAACTCA TCT CAC ACT TAA GGC ATG AT
	Blacklegged tick phlebovirus-1	contig_642429	80.39	TCT TGT ACT TGA GTC CCA AC ATC CCT TGG GTT TTT CCT TT

III. Adăugarea celor 10 μ l de mix peste 10 μ l de ARN/hexameri random; omogenizare prin pipetaj – obținerea unui volum final de 20 μ l.

IV. Incubare la următorul program:

- 25°C – 10 min
- 50°C – 50 min
- 85°C – 5 min

La finalul programului, probele se depun pe gheață fiind apoi adăugat 1 μ l Rnase H pentru digestia ARN-ului asociat ADN-ului complementar cu incubare la 37°C timp de 20 min. ADN-ul complementar poate fi mai apoi inclus în reacția PCR sau depozitat la -20°C.

2. Reacția în lanț a polimerazei - PCR

Probele de ADNc au fost analizate prin PCR utilizând *kitul* Taq Core Kits 10 (MPBiomedicals) pentru detecția secvențelor virale obținute prin HTS.

Mixul PCR pentru o probă a conținut:

- Apă – 13.25 μ l
- dNTP (10mM) – 0.5 μ l
- Tampon 10x fără MgCl₂ – 2.5 μ l
- Primer sens (50 μ M) – 0.25 μ l
- Primer antisens (50 μ M) – 0.25 μ l
- Taq polimerază (5U/ μ l) – 0.25 μ l
- Volum final: 21 μ l.

Programul PCR s-a desfășurat în cadrul unui Thermocycler Biorad:

- 94°C – 4 min
- 40 cicluri: 94°C – 35 sec.; 49°C – 30 sec.; 72°C – 40 sec.
- 72°C – 10 min
- 10°C - ∞

Produșii PCR au fost supuși migrării orizontale, pe agaroză 2% timp de 1 h la 130V, probele pozitive fiind apoi secvențiate.

9.2.3 Rezultate și discuții

Am inclus în analiza prin HTS cele 557 de căpușe nehrănite împărțite randomizat în 3 mixuri. Datele obținute în urma secvențierii au identificat secvențe similare virusurilor asociate 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.

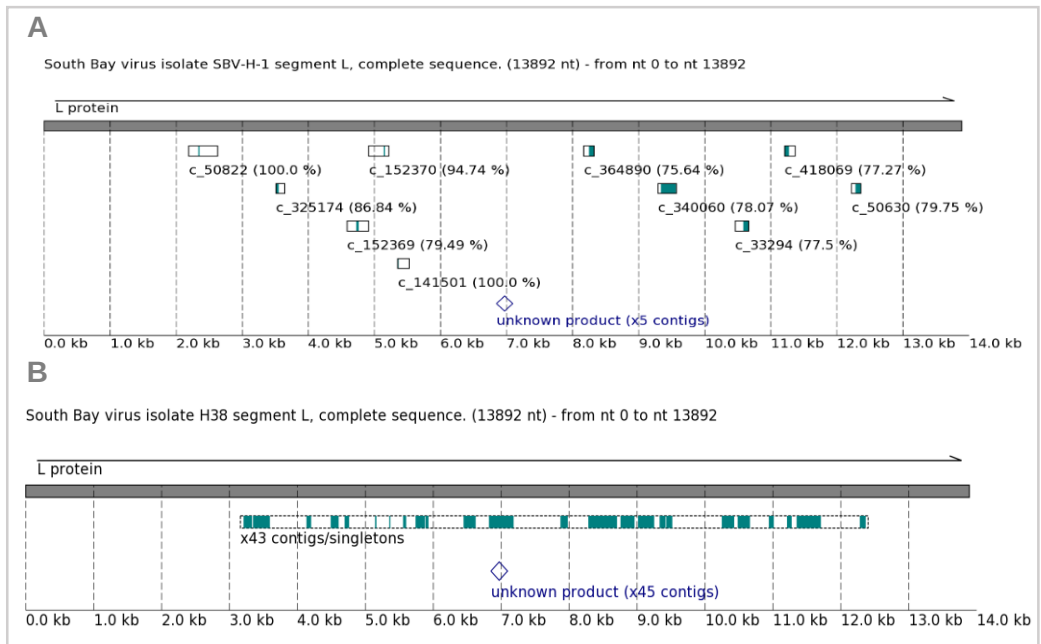


Figura 9.34 Contig-uri atribuite taxonomic virusului South Bay

(A – rezultate obținute în mixul-1; B – rezultate obținute în mixul-2. Contig-urile sunt reprezentate de casete iar zonele colorate reprezintă omologia cu secvența de referință)

Figure 9.34 Mapping results on South Bay virus

(A – results obtained in pool-1; B – results obtained in pool -2. Contigs and/or singletons are represented by boxes, and the region sharing homology with the reference sequence is darkly colored. Name and identity percentage (compared to the reference sequence) are indicated near the box when the number is limited)

Blacklegged tick phlebovirus-1 isolate H12 segment L, complete sequence. (6733 nt) - from nt 0 to nt 6733

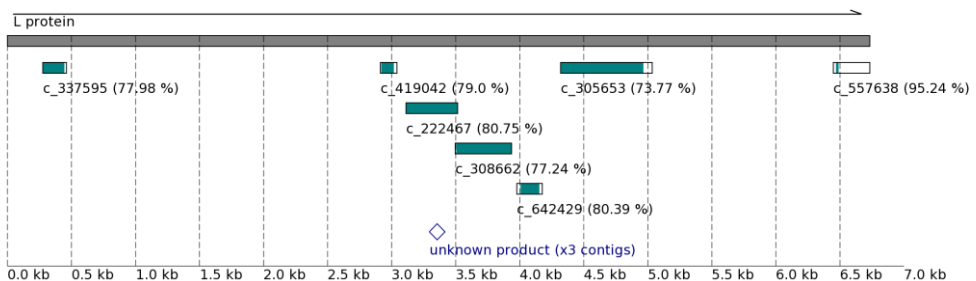


Figura 9.35 Contig-uri atribuite taxonomic virusului

Blacklegged tick phlebovirus-1

Figure 9.35 Mapping results on Blacklegged tick phlebovirus-1

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 (Tabel 9.2, Figurile 9.34; 9.35; 9.36). *Contig*-urile au corespuns segmentului L al genomului viral.

Blacklegged tick phlebovirus-2 isolate RTS2 segment L, complete sequence. (6733 nt) - from nt 0 to nt 6733

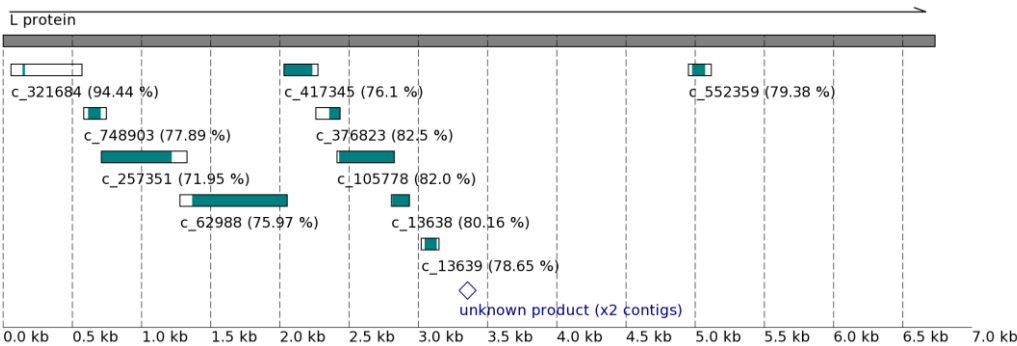


Figura 9.36 Contig-uri atribuite taxonomic virusului Blacklegged tick phlebovirus-2

Figure 9.36 Mapping results on 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. În acest scop, am selectat câte un *contig* ce a prezentat omologie cu agenții virali (virusul South Bay, Blacklegged tick phlebovirus-1 și Blacklegged tick phlebovirus-2). Utilizând aceste secvențe drept șablon, au fost construiți primeri specifici (*primers design*), fiind validați prin testare pe WTA (whole transcriptome amplification) (Tabel 9.3, Figura 9.37).

Tabel 9.3/Table 9.3

Contig-urile selectate pentru construcția primerilor incluși în reacția PCR de stabilire a prevalenței în probele de ARN

Contigs for which specific primers were designed in order to determine their prevalence in RNA samples by PCR

Agent viral	Nume Contig	Lungime pb	Identitate %
South Bay	contig_163739	316	73.2
Blacklegged tick phlebovirus-1	contig_308662	398	77.2
Blacklegged tick phlebovirus-2	contig_62988	671	75.9

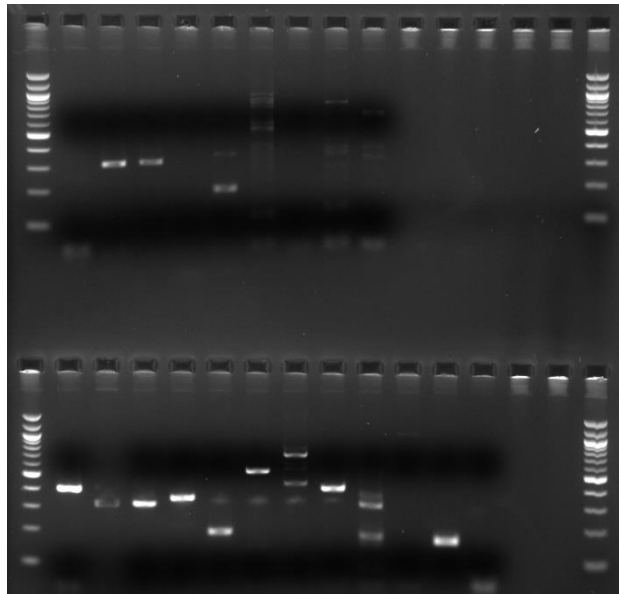


Figura 9.37 Migrarea ampliconilor obținuți în urma testării pe WTA a primerilor construiți

Figure 9.37 Migration of amplicons after testing designed primers on WTA

Prevalența secvențelor virale în căpușe a fost stabilită prin testarea ADNc prin PCR clasic. 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% (Figura 9.38). 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.

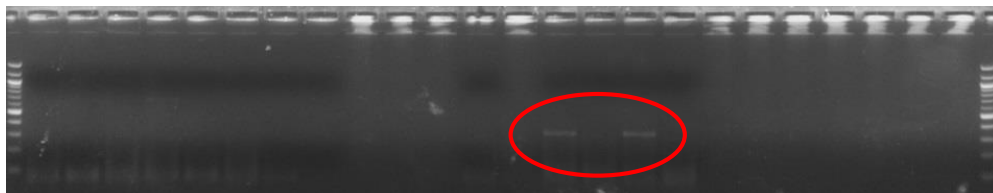


Figura 9.38 Probe positive pentru secvențele atribuite virusului South Bay
Figure 9.38 Positive samples for the sequences that matched with South Bay virus

Următoarea etapă va consta în izolarea agentului viral din omogenatul căpușelor pozitive. Acest pas se va realiza prin inocularea omogenatului intracerebral, la șoarecii nou-născuți IFNAR (type I interferon receptor knock-out mice).

Prin intermediul acestui studiu s-a realizat descrierea populațiilor virale prezente în căpușele *I. ricinus*, *D. reticulatus* și *H. punctata*. Aceste trei specii au fost descrise anterior în țara noastră ca fiind vectori pentru diverși agenți patogeni bacterieni și parazitari [Ionita și colab., 2013, Ionita și colab., 2016, Matei și colab., 2015, Paduraru și colab., 2012]. Scopul studiului a reprezentat explorarea diversității virale dar și identificarea de noi agenți patogeni pentru animale și om. Desigur, rezultatele obținute nu permit formularea unor concluzii, însă pot servi drept punct de plecare pentru studii viitoare.

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 clasate peste 350 de agenți virali [Tokarz și colab., 2014]. Desigur, putem specula prin a spune că există agenți virali transmiși de căpușe ce urmează a fi identificați și descriși prin aplicarea tehnologiilor moderne de detecție *de novo* existente la ora actuală sau ce vor fi concepute în viitorul apropiat.

9.3 CONCLUZII PARȚIALE

1. Importanța biologică a diversității bacteriilor dar și a interacțiunii acestora în căpușe este în acest moment insuficient evaluată.
2. Acest studiu reprezintă o etapă pilot în procesul de identificare și caracterizare a microbiomei căpușelor din estul României în condiții naturale, **etapă ce trebuie urmată de cercetări sistematice.**

3. Analiza NGS a permis **identificarea a peste 60 de familii bacteriene** în cele trei mixuri formate din căpușe nehrănite colectate din estul României, reprezentând **rezultate obținute în premieră pentru țara noastră**.
4. Probele de căpușe incluse în analiză au fost pozitive pentru **un număr mare de agenți patogeni bacterieni, aparținând genurilor *Rickettsia*, *Orientia*, *Borrelia*, *Francisella*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella***.
5. Am raportat **pentru prima dată în România** prezența agentului patogen ***Orientia tsutsugamushi***. Genul *Orientia* a avut în cele trei mixuri un număr ridicat de citiri, fiind clasat pe locul secund în categoria genurilor bacteriene cu transmitere vectorială identificate.
6. În urma analizei HTS, s-a reușit identificarea în căpușe a unui număr mare de **secvențe virale**, aparținând unor **noi potențiali agenți patogeni**. Secvențele identificate au fost similare în proporție de 70-80% cu trei virusuri recent descrise: **virusul South Bay, virusul Blacklegged tick phlebovirus-1 și virusul Blacklegged tick phlebovirus-2**. Următoarea etapă de inoculare a șoarecilor nou-născuți IFNAR va trebui să confirme existența unor noi virusuri în căpușele colectate în estul României.
7. **Metagenomica** asigură punctul de pornire pentru noi studii de detecție a agenților patogeni și vine în sprijinul anchetelor epidemiologice și a programelor de gestionare a bolilor cu risc zoonotic, inclusiv a celor transmise de căpușe.

CAPITOLUL X

CONCLUZII FINALE

Rezultatele obținute în urma cercetărilor efectuate privind infecțiile transmise de căpușe în zona de est a României, au permis formularea următoarelor concluzii finale:

1. În ciuda faptului că până în acest moment în România nu s-a dovedit prezența virusului FHCC, **datele obținute în acest studiu arată o circulație a virusului în cadrul efectivelor de rumegătoare mici.**
2. Febra hemoragică Crimeea-Congo este o boală cu risc zoonotic important. Având în vedere faptul că **în zona de sud-est a țării există ecosisteme capabile de a întreține infecțiile transmise de căpușe**, este prezent vectorul competent *Hyalomma marginatum* și au fost evidențiate semnale serologice pozitive la oile și caprele din județele Tulcea și Constanța, **sunt necesare studii epidemiologice și etiologice sistematice pentru a evalua această amenințare.**
3. Conform studiilor efectuate de alți autori, s-a relevat faptul că majoritatea cazurilor de boală Lyme la oameni evoluează în regiuni unde prevalența bolii la câini este ridicată. Astfel, **profilul serologic la câine poate reprezenta un indicator al riscului bolii Lyme pentru om.**
4. În studiul de față, **s-a înregistrat o prevalență redusă a seropozitivității bolii Lyme la câine (1.11%),** comparativ cu valorile înregistrate în alte studii întreprinse în țara noastră. Efectuarea unor anchete serologice în rândul populațiilor de câini la nivel național ar putea duce la stabilirea unor zone de risc pentru infecția produsă de *Borrelia burgdorferi* s.l. la om.
5. Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu confirmă rolul de vector al căpușelor dure, atât în ecosistemele specifice din zonele extravilane, cât și în zonele urbane.
6. S-a remarcat **prevalența crescută a agenților bolii Lyme în zone intens populate**, această constatare recomandând o mai bună supraveghere epidemiologică și acțiuni preventive susținute.

7. **Au fost identificate și descrise numeroase asocieri ale genospeciilor din grupul *Borrelia burgdorferi* s.l., asocieri ce pot influența diagnosticul și eficiența tratamentului afecțiunilor la om.**
8. **Au fost identificați pentru prima dată în zona de est a României agenți patogeni implicați în producerea de infecții la om (*Borrelia miyamotoi*, *C. N. mikurensis*, *Rickettsia raoultii*).**
9. **Au fost identificate noi zone de risc în estul României și au fost generate informații detaliate privind distribuția agenților patogeni cu transmitere vectorială.**
10. Rezultatele obținute vor putea reprezenta o fundație solidă pentru viitoare studii, în vederea evaluării sistematică a riscului infecțiilor transmise de căpușe.
11. **În căpușele testate pentru agenții bacterieni și parazitari s-au înregistrat pentru prima dată numeroase asocieri ale patogenilor, de câte două, trei, patru și cinci specii diferite pe același individ vector. Se generează astfel noi abordări privind co-transmiterea acestor agenți la oameni și/sau la animale și efectul coinfectiilor asupra severității simptomelor și eficacității tratamentului.**
12. O parte din căpușele Ixodidae cercetate au fost **pozitive pentru secvențe specifice virusului West Nile**, un agent important pentru țara noastră prin prisma numeroaselor cazuri înregistrate la om.
13. **Prezența virusului Bourbon, semnalată pentru prima dată în România**, va trebui confirmată, având în vedere faptul că acesta este un agent cu implicații importante pentru patologia umană.
14. Acest studiu demonstrează **utilitatea unei metode rapide de detecție** (Sistemul BioMark *real time*-PCR) 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.
15. Importanța biologică a diversității bacteriilor dar și a interacțiunii acestora în căpușe este în acest moment insuficient evaluată.
16. Acest studiu reprezintă o etapă pilot în procesul de identificare și caracterizare a microbiomei căpușelor din estul României în condiții naturale, **etapă ce trebuie urmată de cercetări sistematice.**
17. Analiza NGS a permis **identificarea în cele trei mixuri de căpușe a peste 60 de familii bacteriene, aceste rezultate obținute fiind o premieră pentru țara noastră.**
18. Probele de căpușe incluse în analiză au fost pozitive pentru **un număr mare de agenți patogeni bacterieni, aparținând genurilor**

Rickettsia, Orientia, Borrelia, Francisella, Ehrlichia, Anaplasma, Bartonella.

19. Am raportat **pentru prima data în România** prezența agentului patogen ***Orientia tsutsugamushi***. Genul *Orientia* a avut în cele trei mixuri un număr ridicat de citiri, fiind clasat pe locul secund din categoria genurilor bacteriene identificate.
20. În urma analizei HTS, s-a reușit identificarea în căpușe a unui număr mare de **secvențe virale**, aparținând unor **noi potențiali agenți patogeni**. Secvențele identificate au fost similare în proporție de 70-80% cu trei virusuri recent descrise: **virusul South Bay, virusul Blacklegged tick phlebovirus-1 și virusul Blacklegged tick phlebovirus-2**. Următoarea etapă de inoculare a șoarecilor nou-născuți IFNAR va trebui să confirme existența unor noi virusuri în căpușele colectate în estul României.
21. **Metagenomica** asigură punctul de pornire pentru noi studii de detecție a agenților patogeni și vine în sprijinul anchetelor epidemiologice și a programelor de gestionare a bolilor cu risc zoonotic, inclusiv a celor transmise de căpușe.

CHAPTER X

FINAL CONCLUSIONS

The results obtained after pursuing the studies on tick-borne infections in ticks from Eastern Romania allowed the formulation of the following conclusions:

1. Despite the fact that in Romania the presence of CCHF virus was not registered so far, data obtained in this study reports a circulation of the virus in the flocks of small ruminants.
2. CCHF is an important endemic disease; the fact that in the south-east of Romania are found ecosystems capable of supporting tick-borne infections, the competent vector, *Hyalomma marginatum* is present, positive serological signals are recorded in sheep, goats and cows in the counties of Tulcea and Constanta, show the importance of future surveys to assess this threat.
3. According to studies carried out by other authors, most cases of human Lyme disease evolved in regions where prevalence of the disease in dogs was high. Thus, serological profile in dogs may represent an interesting criterion for assessing the risk of Lyme disease to humans.
4. In the present study we obtained a lower prevalence of Lyme disease seropositivity in dogs (1.11%) compared to other studies undertaken in our country. Conducting nationwide serological surveys in dog populations could lead to the assessment of Lyme disease risk areas for humans.
5. The results obtained after surveying questing ticks for pathogens by means of molecular biology techniques confirm the role of ticks in transmitting infections in both forested and urban situations.
6. Worth highlighting is the increased prevalence of Lyme disease agents (22.5%) in urban populated areas, this circumstance requiring better oversight.

7. Numerous associations of species from *Borrelia burgdorferi* group were noticed, this situation may influence the efficiency of diagnosis and treatment.
8. New pathogens have been described for first time in Eastern Romania (*Borrelia miyamotoi*, *C. N. mikurensis*, *Rickettsia raoultii* etc.) responsible for human infections.
9. New risk areas have been identified, and detailed data was given on the occurrence of new and known zoonotic pathogens
10. These results will act as a solid foundation for further systematic studies examining the risk of human tick-borne disease.
11. Ticks tested for bacterial and parasitic agents showed 43 different combinations of pathogens co-infection. Questions are being initiated regarding the co-transmission of these agents in humans and/or animals and/or co-infection effect on symptom severity and treatment effectiveness.
12. Ixodid ticks were positive for West Nile virus-specific sequences, an important agent for Romania, through the numerous cases recorded in humans; in perspective, future studies will need to determine the prevalence of this agent in ticks from Romania.
13. The presence of Bourbon virus in Romania needs be confirmed given that it represents a virus with important implications for human pathology.
14. The BioMark real-time PCR system is a method that allows rapid survey of a large number of samples for a high number of tick-transmitted pathogens; also, the system can be adapted to meet the requirements of regional screening of vector infections.
15. The importance of biological diversity and interactions of bacterial populations in ticks is currently still under evaluation.
16. This study is an initial step in the identification and characterization of microbiome in ticks found under natural conditions in Romania.
17. NGS analysis allowed the identification of more than 60 bacterial families in three pools of questing ticks, collected from Eastern Romania.
18. Tick samples included in the analysis were positive for a large number of tick-borne bacterial pathogens belonging to *Rickettsia*, *Orientia*, *Borrelia*, *Francisella*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *Bartonella* genera.
19. We report for the first time in Romania the presence of *Orientia tsutsugamushi*. The three pools had a high number of reads that matched to *Orientia* genus.

20. Analysis of High-Throughput Sequencing, managed to obtain a high number of viral sequences assigned new potential pathogens. These sequences had identity of 70-80% with three recently described viruses: South Bay virus, Blacklegged tick phlebovirus-1 and Blacklegged tick phlebovirus-2. The inoculation of newborn mice (IFNAR) will have to confirm the existence of new viruses in ticks collected in Eastern Romania.
21. Metagenomic studies provide the starting point for the pathogens detection, in order to assess the impact of tick transmitted agents for public health; also can be applied in the epidemiological investigations and disease management programs including for those transmitted by ticks.

BIBLIOGRAFIE REFERENCES

1. Amicizia D, Domnich A, Panatto D, Lai PL, Cristina ML, Avio U, et al. 2013. *Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines*. Hum Vaccin Immunother.9(5):1163-71. Epub 2013/02/05.
2. Andersson M, Zaghdoudi-Allan N, Tamba P, Stefanache M, Chitimia L. 2014. *Co-infection with 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' and Borrelia afzelii in an Ixodes ricinus tick that has bitten a human in Romania*. Ticks Tick-borne Dis.5:706–8.
3. Angelakis E, Billeter SA, Breitschwerdt EB, Chomel BB, Raoult D. 2010. *Potential for tick-borne bartonellosis*. Emerging infectious diseases.16(3):385-91. Epub 2010/03/06.
4. Atif FA. 2016. *Alpha proteobacteria of genus Anaplasma (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Epidemiology and characteristics of Anaplasma species related to veterinary and public health importance*. Parasitology.143(6):659-85. Epub 2016/03/05.
5. Barthel R, Mohareb E., Younan R., Gladnishka T, Kalvatchev N., Mansour S. S., Rossi C, Schoepp R., Christova I. 2014. *Seroprevalance of Crimean_Congo haemorrhagic fever in Bulgarian livestock*. Biotechnology & Biotechnological Equipment. Vol. 28(No. 3):540-2.
6. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. 2013. *Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity*. Antiviral research.100(1):159-89. Epub 2013/08/03.
7. Bhide M, Travnicek M., Curlik J., Stefancikova A. 2004. *The importance of dogs in eco-epidemiology of Lyme borreliosis: a review*. Vet Med – Czech.49, (4): 135–142.
8. Bogovic P, Strle F. 2015. *Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management*. World journal of clinical cases.3(5):430-41. Epub 2015/05/20.
9. Bowman D, Little SE, Lorentzen L, Shields J, Sullivan MP, Carlin EP. 2009. *Prevalence and geographic distribution of Dirofilaria immitis, Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis, and Anaplasma phagocytophilum in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey*. Vet Parasitol.160(1-2):138-48. Epub 2009/01/20.
10. Briciu VT, Meyer F, Sebah D, Tatulescu DF, Coroiu G, Lupse M, et al. 2014. *Real-time PCR-based identification of Borrelia burgdorferi sensu lato species in ticks collected from humans in Romania*. Ticks Tick Borne Dis.5(5):575-81. Epub 2014/07/06.

11. Brites-Neto J, Duarte KM, Martins TF. 2015. *Tick-borne infections in human and animal population worldwide*. Veterinary world.8(3):301-15. Epub 2016/04/06.
12. Brouqui P, Parola P, Fournier PE, Raoult D. 2007. *Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe*. FEMS immunology and medical microbiology.49(1):2-12. Epub 2007/02/03.
13. Buermans HP, den Dunnen JT. 2014. *Next generation sequencing technology: Advances and applications*. Biochimica et biophysica acta.1842(10):1932-41. Epub 2014/07/06.
14. Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG. 2004. *Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents Borrelia burgdorferi in North America and Borrelia afzelii in Europe*. Microbiology.150(Pt 6):1741-55. Epub 2004/06/09.
15. Burri C, Schumann O, Schumann C, Gern L. 2014. *Are Apodemus spp. mice and Myodes glareolus reservoirs for Borrelia miyamotoi, Candidatus Neoehrlichia mikurensis, Rickettsia helvetica, R. monacensis and Anaplasma phagocytophilum?* Ticks Tick Borne Dis.5(3):245-51. Epub 2014/03/04.
16. Capek M, Literak I, Kocianova E, Sychra O, Najer T, Trnka A, et al. 2014. *Ticks of the Hyalomma marginatum complex transported by migratory birds into Central Europe*. Ticks Tick Borne Dis.5(5):489-93. Epub 2014/06/01.
17. Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE, Zhao F, Qi J, Tomsho LP, et al. 2011. *Metagenomic profile of the bacterial communities associated with Ixodes ricinus ticks*. PLoS One.6(10):e25604. Epub 2011/10/25.
18. Cascio A, Torina A, Valenzise M, Blanda V, Camarda N, Bombaci S, et al. 2013. *Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by Rickettsia massiliae*. Emerging infectious diseases.19(5):836-7. Epub 2013/05/24.
19. Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Coudrier D, Bouloy M. 2012. *First serologic evidence for the circulation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Romania*. Vector Borne Zoonotic Dis.12(9):718-21. Epub 2012/08/18.
20. Chaloner GL, Harrison TG, Coyne KP, Aanensen DM, Birtles RJ. 2011. *Multilocus sequence typing of Bartonella henselae in the United Kingdom indicates that only a few, uncommon sequence types are associated with zoonotic disease*. Journal of clinical microbiology.49(6):2132-7. Epub 2011/04/08.
21. Chochlakis D, Bongiorno C, Partalis N, Tselentis Y, Psaroulaki A. 2015. *Possible Rickettsia massiliae infection in Greece: an imported case*. Japanese journal of infectious diseases. Epub 2015/09/16.
22. Ciceroni L, Pinto A, Ciarrocchi S, Ciervo A. 2009. *Bartonella infections in Italy*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.15 Suppl 2:108-9. Epub 2009/05/15.
23. Coipan EC, Vladimirescu AF. 2011. *Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodidae): vectors for Lyme disease spirochetes in Romania*. Experimental & applied acarology.54(3):293-300. Epub 2011/03/25.
24. Coipan EC, Jahfari S, Fonville M, Maassen CB, van der Giessen J, Takken W, et al. 2013. *Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing Ixodes ricinus*. Front Cell Infect Microbiol.3:36. Epub 2013/08/03.

25. Cojocaru O. 2014. *Epidemiologia și diagnosticul unor infecții cu caracter zoonotic transmise de căpușe*. Teză de doctorat, Facultatea de Medicină Veterinară. Iasi.
26. Cosson JF, Galan M, Bard E, Razzauti M, Bernard M, Morand S, et al. 2015. *Detection of Orientia sp. DNA in rodents from Asia, West Africa and Europe*. Parasites & vectors.8:172. Epub 2015/04/18.
27. Cotte V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, et al. 2008. *Transmission of Bartonella henselae by Ixodes ricinus*. Emerging infectious diseases.14(7):1074-80. Epub 2008/07/05.
28. Cotte V, Bonnet S, Cote M, Vayssier-Taussat M. 2010. *Prevalence of five pathogenic agents in questing Ixodes ricinus ticks from western France*. Vector Borne Zoonotic Dis.10(8):723-30. Epub 2009/12/22.
29. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, et al. 2007. *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder*. Science.318(5848):283-7. Epub 2007/09/08.
30. Dabney J, Meyer M. 2012. *Length and GC-biases during sequencing library amplification: a comparison of various polymerase-buffer systems with ancient and modern DNA sequencing libraries*. BioTechniques.52(2):87-94. Epub 2012/02/09.
31. Dantas-Torres F. 2010. *Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus*. Parasites & vectors.3:26. Epub 2010/04/10.
32. de Vega M, Lazaro JM, Salas M, Blanco L. 1996. *Primer-terminus stabilization at the 3'-5' exonuclease active site of phi29 DNA polymerase. Involvement of two amino acid residues highly conserved in proofreading DNA polymerases*. The EMBO journal.15(5):1182-92. Epub 1996/03/01.
33. Dietrich F, Schmidgen T, Maggi RG, Richter D, Matuschka FR, Vonthein R, et al. 2010. *Prevalence of Bartonella henselae and Borrelia burgdorferi sensu lato DNA in ixodes ricinus ticks in Europe*. Applied and environmental microbiology.76(5):1395-8. Epub 2010/01/12.
34. Dobec M, Golubic D, Punda-Polic V, Kaeppli F, Sievers M. 2009. *Rickettsia helvetica in Dermacentor reticulatus ticks*. Emerging infectious diseases.15(1):98-100. Epub 2009/01/01.
35. Doniță N, Popescu A, Paucă-Comănescu M, Mihăilescu S, Biriș IA. 2005. *Habitats from Romania*. Editura Tehnică Silvică [In Romanian].
36. Duffy J, Pittlekow MR, Kolbert CP, Rutledge BJ, Persing DH. 1997. *Coinfection with Borrelia burgdorferi and the agent of human granulocytic ehrlichiosis*. Lancet.349(9049):399. Epub 1997/02/08.
37. Dumitrache MO, Pastiu AI, Kalmar Z, Mircean V, Sandor AD, Gherman CM, et al. 2013. *Northern white-breasted hedgehogs Erinaceus roumanicus as hosts for ticks infected with Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum in Romania*. Ticks Tick Borne Dis.4(3):214-7. Epub 2013/01/24.
38. Dumitrache MO, Matei IA, Ionica AM, Kalmar Z, D'Amico G, Siko-Barabasi S, et al. 2015. *Molecular detection of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies in red foxes (Vulpes vulpes) from Romania*. Parasites & vectors.8:514. Epub 2015/10/10.

39. ECDC. 2012. *Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries*. Stockholm: ECDC: 2012.
40. Egyed L, Elo P, Sreter-Lancz Z, Szell Z, Balogh Z, Sreter T. 2012. *Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of Ixodes ricinus ticks in Hungary*. Ticks Tick Borne Dis.3(2):90-4. Epub 2012/03/27.
41. Estrada-Pena A, Jongejan F. 1999. *Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission*. Experimental & applied acarology.23(9):685-715. Epub 1999/12/03.
42. Fedorova N, Kleinjan JE, James D, Hui LT, Peeters H, Lane RS. 2014. *Remarkable diversity of tick or mammalian-associated Borreliae in the metropolitan San Francisco Bay Area, California*. Ticks Tick Borne Dis.5(6):951-61. Epub 2014/08/19.
43. Feider Z. 1965. [Fauna of the Popular Republic of Romania. Volume 5/2. Acaromorphs, Suprafamily Ixodoidea] [in Romanian]. Editura Academiei Republicii Populare Române, București.
44. Foldvari G, Siroky P, Szekeres S, Majoros G, Sprong H. 2016. *Dermacentor reticulatus: a vector on the rise*. Parasites & vectors.9(1):314. Epub 2016/06/03.
45. Garcia-Garcia JC, Portillo A, Nunez MJ, Santibanez S, Castro B, Oteo JA. 2010. *A patient from Argentina infected with Rickettsia massiliae*. The American journal of tropical medicine and hygiene.82(4):691-2. Epub 2010/03/30.
46. Genchi M, Prati P, Vicari N, Manfredini A, Sacchi L, Clementi E, et al. 2015. *Francisella tularensis: No Evidence for Transovarial Transmission in the Tularemia Tick Vectors Dermacentor reticulatus and Ixodes ricinus*. PLoS One.10(8):e0133593. Epub 2015/08/06.
47. Gherman CM, Sandor AD, Kalmar Z, Marinov M, Mihalca AD. 2012. *First report of Borrelia burgdorferi sensu lato in two threatened carnivores: the marbled polecat, Vormela peregusna and the European mink, Mustela lutreola (Mammalia: Mustelidae)*. BMC Vet Res.8:137. Epub 2012/08/21.
48. Guillemi EC, Tomassone L, Farber MD. 2015. *Tick-borne Rickettsiales: Molecular tools for the study of an emergent group of pathogens*. J Microbiol Methods.119:87-97. Epub 2015/10/17.
49. Hall TA. 1999. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symp Ser.41:95-8.
50. Hasle G, Roed KH, Leinaas HP. 2008. *Multiple paternity in Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae), assessed by microsatellite markers*. The Journal of parasitology.94(2):345-7. Epub 2008/06/21.
51. Hasle G. 2013. *Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds*. Front Cell Infect Microbiol.3:48. Epub 2013/09/24.
52. Howden KJ, Geale DW, Pare J, Golsteyn-Thomas EJ, Gajadhar AA. 2010. *An update on bovine anaplasmosis (Anaplasma marginale) in Canada*. The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne.51(8):837-40. Epub 2010/11/03.
53. Ilie M, Imre Mirela, Imre K., Hotea Ionela, Ilie Alina, Sorescu Denisa, Andrei Sidonia, Degi I., Morariu S., Darabus G., . 2012. *New data's in canine*

- Borreliosis from Romania: serological approach*. Journal of Biotechnology.Vol. 161, 34.
54. Inokuma H, Seino N, Suzuki M, Kaji K, Takahashi H, Igota H, et al. 2008. *Detection of Rickettsia helvetica DNA from peripheral blood of Sika deer (Cervus nippon yessoensis) in Japan*. Journal of wildlife diseases.44(1):164-7. Epub 2008/02/12.
55. Ionescu L, Alexe A., Ceianu C., Neculescu M., Popescu D., Bicheru S., Dumitrescu G., Cumpănașoiu C.E., Pasat L., Tîrziu E. 2009. *Investigation methods used for identifying the presence of tick-borne virus (TBEV) in vector arthropods*. Lucrări științifice, Medicină Veterinară, Timișoara.XLII (1):288-293.
56. Ionita M, Mitrea IL, Pfister K, Hamel D, Silaghi C. 2013. *Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania*. Vet Parasitol.196(1-2):71-6. Epub 2013/02/23.
57. Ionita M, Silaghi C, Mitrea IL, Edouard S, Parola P, Pfister K. 2016. *Molecular detection of Rickettsia conorii and other zoonotic spotted fever group rickettsiae in ticks, Romania*. Ticks Tick Borne Dis.7(1):150-3. Epub 2015/10/29.
58. Jaenson TG, Talleklint L. 1996. *Lyme borreliosis spirochetes in Ixodes ricinus (Acari:Ixodidae) and the varying hare on isolated islands in the Baltic, Sea*. J Med Entomol.33(3):339-43. Epub 1996/05/01.
59. Jahfari S, Herremans T, Platonov AE, Kuiper H, Karan LS, Vasilieva O, et al. 2014. *High seroprevalence of Borrelia miyamotoi antibodies in forestry workers and individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands*. New Microbes New Infect.2(5):144-9. Epub 2014/10/31.
60. Kalmar Z, Mihalca AD, Dumitrache MO, Gherman CM, Magdas C, Mircean V, et al. 2013. *Geographical distribution and prevalence of Borrelia burgdorferi genospecies in questing Ixodes ricinus from Romania: a countrywide study*. Ticks Tick Borne Dis.4(5):403-8. Epub 2013/07/31.
61. Kalmar Z, Sprong H, Mihalca AD, Gherman CM, Dumitrache MO, Coipan EC, et al. 2016. *Borrelia miyamotoi and Candidatus Neoehrlichia mikurensis in Ixodes ricinus Ticks, Romania*. Emerging infectious diseases.22(3):550-1. Epub 2016/02/20.
62. Kalmár Z, Sprong H, Mihalca AD, Gherman CM, Dumitrache MO, Coipan EC, et al. 2015. *Borrelia miyamotoi and Candidatus Neoehrlichia mikurensis in Ixodes ricinus ticks, Romania [letter]*. Emerg Infect Dis 2015 Mar.
63. Kamboj A, Pathak H. 2013. *Crimean-Congo hemorrhagic fever: a comprehensive review*. Veterinary world. 6(10): 812-817.
64. Kiss T, Cadar D, Krupaci AF, Bordeanu A, Brudasca GF, Mihalca AD, et al. 2011. *Serological reactivity to Borrelia burgdorferi sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania*. Vector Borne Zoonotic Dis.11(9):1259-62. Epub 2011/05/27.
65. Kiss T, Cadar D, Krupaci FA, Bordeanu AD, Spinu M. 2014. *Prevalence of Anaplasma phagocytophilum infection in European wild boar (Sus scrofa) populations from Transylvania, Romania*. Epidemiol Infect.142(2):246-50. Epub 2013/04/25.
66. Kolodziejek J, Marinov M, Kiss BJ, Alexe V, Nowotny N. 2014. *The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a Hyalomma marginatum marginatum tick collected from a song thrush (Turdus philomelos)*

- in eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd 2007.* PLoS One.9(10):e109905. Epub 2014/10/04.
67. Kosoy OI, Lambert AJ, Hawkinson DJ, Pastula DM, Goldsmith CS, Hunt DC, et al. 2015. *Novel thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014.* Emerging infectious diseases.21(5):760-4. Epub 2015/04/23.
 68. Krause PJ, Telford SR, 3rd, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, et al. 1996. *Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness.* Jama.275(21):1657-60. Epub 1996/06/05.
 69. Krause PJ, Fish D, Narasimhan S, Barbour AG. 2015. *Borrelia miyamotoi infection in nature and in humans.* Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.21(7):631-9. Epub 2015/02/24.
 70. Krupka I, Straubinger RK. 2010. *Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with Borrelia burgdorferi sensu stricto.* The Veterinary clinics of North America Small animal practice.40(6):1103-19. Epub 2010/10/12.
 71. Kugeler KJ, Gurfield N, Creek JG, Mahoney KS, Versage JL, Petersen JM. 2005. *Discrimination between Francisella tularensis and Francisella-like endosymbionts when screening ticks by PCR.* Applied and environmental microbiology.71(11):7594-7. Epub 2005/11/05.
 72. Kybicova K. *Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum in the Czech Republic.* Prague Charles University in Prague Faculty of Science 2010.
 73. Labbé Sandelin L, Tolf C, Larsson S, Wilhelmsson P, Salaneck E, Jaenson TGT, et al. 2015. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis in Ticks from Migrating Birds in Sweden.* PLoS One.10(7)(e0133250).
 74. Lambert AJ, Velez JO, Brault AC, Calvert AE, Bell-Sakyi L, Bosco-Lauth AM, et al. 2015. *Molecular, serological and in vitro culture-based characterization of Bourbon virus, a newly described human pathogen of the genus Thogotovirus.* J Clin Virol.73:127-32. Epub 2015/11/27.
 75. Little SE, Heise SR, Blagburn BL, Callister SM, Mead PS. 2010. *Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA.* Trends in parasitology.26(4):213-8. Epub 2010/03/09.
 76. Lommano E, Bertaiola L, Dupasquier C, Gern L. 2012. *Infections and coinfections of questing Ixodes ricinus ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland.* Applied and environmental microbiology.78(13):4606-12. Epub 2012/04/24.
 77. Maggi RG, Mascarelli PE, Havenga LN, Naidoo V, Breitschwerdt EB. 2013. *Co-infection with Anaplasma platys, Bartonella henselae and Candidatus Mycoplasma haematoparvum in a veterinarian.* Parasites & vectors.6:103. Epub 2013/04/17.
 78. Magnarelli LA, Dumler JS, Anderson JF, Johnson RC, Fikrig E. 1995. *Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera.* Journal of clinical microbiology.33(11):3054-7. Epub 1995/11/01.
 79. Majláthová V, Majláth, I, Hromada, M, Tryjanowski, P, Bona, M, Antczak, M, Víchová, B, Dzimko, S, Mihalca, A, Pet'ko, B,. 2008. *The role of the sand*

- lizard (*Lacerta agilis*) in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Int J Med Microbiol.298:161–7.
80. Marriot AC, Polyzoni T, Antoniadis A, Nuttall PA. 1994. *Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein*. J Gen Virol; 75: 2157–2161.
81. Matei IA, Kalmar Z, Magdas C, Magdas V, Toriay H, Dumitrache MO, et al. 2015. *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks from Romania. Ticks Tick Borne Dis.6(3):408-13. Epub 2015/04/04.
82. Mărcuțan I, Sándor AD, Mihalca AD, Gherman CM, Kalmár Z, D'Amico G, Dumitrache MO, Cozma V. 2014. *Prevalence of Anaplasma phagocytophilum* in ticks collected from migratory birds in Danube Delta, Romania. Parasit Vectors.7 (Suppl. 1):16.
83. Mărcuțan I, Kalmár Z, Ionică AM, D'Amico G, Mihalca AD, Cozma V et al. 2016. *Spotted fever group rickettsiae* in ticks of migratory birds in Romania. Parasit Vectors.; 9: 294.
84. Mediannikov O, Matsumoto K, Samoylenko I, Drancourt M, Roux V, Rydkina E, et al. 2008. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. International journal of systematic and evolutionary microbiology.58(Pt 7):1635-9. Epub 2008/07/05.
85. Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Pena A, George JC, et al. 2013. *Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe*. Parasites & vectors.6:1. Epub 2013/01/04.
86. Merhej V, Angelakis E, Socolovschi C, Raoult D. 2014. *Genotyping, evolution and epidemiological findings of Rickettsia species*. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.25:122-37. Epub 2014/03/26.
87. Michelet L, Delannoy S, Devillers E, Umhang G, Aspan A, Juremalm M, et al. 2014. *High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe*. Front Cell Infect Microbiol.4:103. Epub 2014/08/15.
88. Mierzejewska EJ, Pawelczyk A, Radkowski M, Welc-Faleciak R, Bajer A. 2015. *Pathogens vectored by the tick, Dermacentor reticulatus, in endemic regions and zones of expansion in Poland*. Parasites & vectors.8:490. Epub 2015/09/26.
89. Mierzejewska EJ, Estrada-Pena A, Alsarraf M, Kowalec M, Bajer A. 2016. *Mapping of Dermacentor reticulatus expansion in Poland in 2012-2014*. Ticks Tick Borne Dis.7(1):94-106. Epub 2015/09/21.
90. Mihalca AD, Dumitrache MO, Magdas C, Gherman CM, Domsa C, Mircean V, et al. 2012a. *Synopsis of the hard ticks (Acari: Ixodidae) of Romania with update on host associations and geographical distribution*. Experimental & applied acarology.58(2):183-206. Epub 2012/05/01.
91. Mihalca AD, Dumitrache MO, Sandor AD, Magdas C, Oltean M, Gyorke A, et al. 2012b. *Tick parasites of rodents in Romania: host preferences, community structure and geographical distribution*. Parasites & vectors.5:266. Epub 2012/11/23.
92. Mihalca AD, Gherman CM, Magdas C, Dumitrache MO, Gyorke A, Sandor AD, et al. 2012c. *Ixodes ricinus* is the dominant questing tick in forest habitats in Romania: the results from a countrywide dragging campaign. Experimental & applied acarology.58(2):175-82. Epub 2012/05/02.

93. Mihalca AD, Sandor AD. 2013. *The role of rodents in the ecology of Ixodes ricinus and associated pathogens in Central and Eastern Europe*. Front Cell Infect Microbiol.3:56. Epub 2013/10/09.
94. Mircean V, Dumitrache MO, Gyorke A, Pantchev N, Jodies R, Mihalca AD, et al. 2012. *Seroprevalence and geographic distribution of Dirofilaria immitis and tick-borne infections (Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Ehrlichia canis) in dogs from Romania*. Vector Borne Zoonotic Dis.12(7):595-604. Epub 2012/05/23.
95. Miro G, Montoya A, Roura X, Galvez R, Sainz A. 2013. *Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study*. Parasites & vectors.6:117. Epub 2013/04/24.
96. Moise I, Dumitru S. 2012. *Identifying aridization vulnerability zones in Dobrogea using medalus indices*. Annals of the University of Craiova – Agriculture, Montanology, Cadastre Series.XLII-1:394-9.
97. Moniuszko A, Dunaj J, Swiecicka I, Zambrowski G, Chmielewska-Badora J, Zukiewicz-Sobczak W, et al. 2014. *Co-infections with Borrelia species, Anaplasma phagocytophilum and Babesia spp. in patients with tick-borne encephalitis*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology.33(10):1835-41. Epub 2014/05/23.
98. Moutailler S, Popovici I, Devillers E, Vayssier-Taussat M, Eloit M. 2016a. *Diversity of viruses in Ixodes ricinus, and characterization of a neurotropic strain of Eyach virus*. New Microbes New Infect.11:71-81. Epub 2016/05/10.
99. Moutailler S, Valiente Moro C, Vaumourin E, Michelet L, Tran FH, Devillers E, et al. 2016b. *Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception*. PLoS Negl Trop Dis.10(3):e0004539. Epub 2016/03/18.
100. Murariu D. 2006. *Mammal ecology and distribution from North Dobrogea (Romania)*. Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle «Grigore Antipa».XLIX:387–99.
101. Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lonne M, Walter JG, Stahl F. 2013. *Transcriptome analysis using next-generation sequencing*. Current opinion in biotechnology.24(1):22-30. Epub 2012/10/02.
102. Nakamura S, Maeda N, Miron IM, Yoh M, Izutsu K, Kataoka C, et al. 2008. *Metagenomic diagnosis of bacterial infections*. Emerging infectious diseases.14(11):1784-6. Epub 2008/11/04.
103. Narasimhan S, Fikrig E. 2015. *Tick microbiome: the force within*. Trends in parasitology.31(7):315-23. Epub 2015/05/06.
104. Nielsen H, Fournier PE, Pedersen IS, Krarup H, Ejlersen T, Raoult D. 2004. *Serological and molecular evidence of Rickettsia helvetica in Denmark*. Scandinavian journal of infectious diseases.36(8):559-63. Epub 2004/09/17.
105. Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C. 1999. *Association of Rickettsia helvetica with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death*. Lancet.354(9185):1169-73. Epub 1999/10/08.
106. Nilsson K, Elfving K, Pahlson C. 2010. *Rickettsia helvetica in patient with meningitis, Sweden, 2006*. Emerging infectious diseases.16(3):490-2. Epub 2010/03/06.

107. Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. 1995. *Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene*. Journal of clinical microbiology.33(7):1797-803. Epub 1995/07/01.
108. Ogden NH, Lindsay LR, Hanincova K, Barker IK, Bigras-Poulin M, Charron DF, et al. 2008. *Role of migratory birds in introduction and range expansion of Ixodes scapularis ticks and of Borrelia burgdorferi and Anaplasma phagocytophilum in Canada*. Applied and environmental microbiology.74(6):1780-90. Epub 2008/02/05.
109. Olsen B, Jaenson TG, Bergstrom S. 1995. *Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato-infected ticks on migrating birds*. Applied and environmental microbiology.61(8):3082-7. Epub 1995/08/01.
110. Oteo JA, Portillo A. 2012. *Tick-borne rickettsioses in Europe*. Ticks Tick Borne Dis.3(5-6):271-8. Epub 2012/11/28.
111. Paduraru OA, Buffet JP, Cote M, Bonnet S, Moutailler S, Paduraru V, et al. 2012. *Zoonotic transmission of pathogens by Ixodes ricinus ticks, Romania*. Emerging infectious diseases.18(12):2089-90. Epub 2012/11/23.
112. Palacios G, Briese T, Kapoor V, Jabado O, Liu Z, Venter M. et al. 2006. *MassTag polymerase chain reaction for differential diagnosis of viral hemorrhagic fever*. Emerg. Infect. Dis., 12, 692-695.
113. Parola P, Raoult D. 2001. *Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.7(2):80-3. Epub 2001/04/12.
114. Parola P, Raoult D. 2001. *Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.32(6):897-928. Epub 2001/03/15.
115. Parola P, Paddock CD, Raoult D. 2005. *Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts*. Clin Microbiol Rev.18(4):719-56. Epub 2005/10/15.
116. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, et al. 2008. *Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses*. PLoS Negl Trop Dis.2(11):e338. Epub 2008/11/19.
117. Parola P, Rovery C, Rolain JM, Brouqui P, Davoust B, Raoult D. 2009. *Rickettsia slovaca and R. raoultii in tick-borne Rickettsioses*. Emerging infectious diseases.15(7):1105-8. Epub 2009/07/25.
118. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. 2013. *Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach*. Clin Microbiol Rev.26(4):657-702. Epub 2013/10/05.
119. Pastiu AI, Matei IA, Mihalca AD, D'Amico G, Dumitrache MO, Kalmar Z, et al. 2012. *Zoonotic pathogens associated with Hyalomma aegyptium in endangered tortoises: evidence for host-switching behaviour in ticks?* Parasites & vectors.5:301. Epub 2013/01/01.
120. Pavel I, Miron L, Raileanu C, Macovei II, Tronciu C, Acatrinei DM, Ciucă L. 2014. *Seasonal dynamics of ixodid ticks in Iasi urban area*. Journal Scientific papers – Veterinary Medicine, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iași.57(1 – 2):135-9.

121. Perez-Eid C. 2007. *Les tiques. Identification, biologie, importance medicale et veterinaire (In french)*. Editions Medicales Internationales, Paris.
122. Perianu T. 2011a. *Tratat de boli infecțioase ale animalelor: bacterioze*. Iași: Universitas XXI; 2011.
123. Perianu T. 2011b. *Tratat de boli infecțioase ale animalelor: viroze și boli prionice*. Iași: Universitas XXI; 2011.
124. Pfaffle M, Littwin N, Muders SV, Petney TN. 2013. *The ecology of tick-borne diseases*. International journal for parasitology.43(12-13):1059-77. Epub 2013/08/06.
125. Picascia A, Pagliuca C, Sommese L, Colicchio R, Casamassimi A, Labonia F, et al. 2015. *Seroprevalence of Bartonella henselae in patients awaiting heart transplant in Southern Italy*. J Microbiol Immunol Infect. Epub 2015/06/09.
126. Piesman J, Gern L. 2004. *Lyme borreliosis in Europe and North America*. Parasitology.129 Suppl:S191-220. Epub 2005/06/09.
127. Pitigoi D, Olaru ID, Badescu D, Rafila A, Arama V, Hristea A. 2013. *Mediterranean spotted fever in southeastern Romania*. BioMed research international.2013:395806. Epub 2013/09/12.
128. Podsiadly E, Chmielewski T, Sochon E, Tylewska-Wierzbanowska S. 2007. *Bartonella henselae in Ixodes ricinus ticks removed from dogs*. Vector Borne Zoonotic Dis.7(2):189-92. Epub 2007/07/14.
129. Portillo A, Santibanez S, Garcia-Alvarez L, Palomar AM, Oteo JA. 2015. *Rickettsioses in Europe*. Microbes and infection / Institut Pasteur.17(11-12):834-8. Epub 2015/09/20.
130. Puchhammer-Stockl E, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX. 1995. *Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay*. Clin Diagn Virol.4(4):321-6. Epub 1995/12/01.
131. Qurollo BA, Balakrishnan N, Cannon CZ, Maggi RG, Breitschwerdt EB. 2014. *Co-infection with Anaplasma platys, Bartonella henselae, Bartonella koehlerae and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a cat diagnosed with splenic plasmacytosis and multiple myeloma*. Journal of feline medicine and surgery.16(8):713-20. Epub 2014/01/22.
132. Raileanu C, Anita A, Porea D, Savuta G 2015. *Mise en evidence serologique de l'infection a virus de la fièvre hemorrhagique Crimee-Congo chez les petits ruminants dans le sud-est de la Roumanie (In french)*. Épidémiol et santé anim.67: 145-9.
133. Raileanu C, Eloit M, Moutailler S, Savuta G, Vayssier-Taussat M. 2016. *Insights into viral diversity of questing ticks in Eastern Romania*. 3rd Conference on Neglected Vectors and Vector-Borne Diseases. Abstract book:62-3.
134. Raoult D, Roux V. 1997. *Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases*. Clin Microbiol Rev.10(4):694-719. Epub 1997/10/23.
135. Rauter C, Hartung T. 2005. *Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies in Ixodes ricinus ticks in Europe: a metaanalysis*. Applied and environmental microbiology.71(11):7203-16. Epub 2005/11/05.
136. Razzauti M, Galan M, Bernard M, Maman S, Klopp C, Charbonnel N, et al. 2015. *A Comparison between Transcriptome Sequencing and 16S*

- Metagenomics for Detection of Bacterial Pathogens in Wildlife*. PLoS Negl Trop Dis.9(8):e0003929. Epub 2015/08/19.
137. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. 1991. *Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes*. J Bacteriol.173(5):1576-89. Epub 1991/03/01.
138. Reis C, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. 2011. *Vector competence of the tick Ixodes ricinus for transmission of Bartonella birtlesii*. PLoS Negl Trop Dis.5(5):e1186. Epub 2011/06/10.
139. Reis C, Cote M, Paul RE, Bonnet S. 2011. *Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens*. Vector Borne Zoonotic Dis.11(7):907-16. Epub 2010/12/17.
140. Richter D, Matuschka FR. 2012. *"Candidatus Neoehrlichia mikurensis," Anaplasma phagocytophilum, and lyme disease spirochetes in questing european vector ticks and in feeding ticks removed from people*. Journal of clinical microbiology.50(3):943-7. Epub 2011/12/30.
141. Richter D, Matuschka FR. 2012. *"Candidatus Neoehrlichia mikurensis," Anaplasma phagocytophilum, and lyme disease spirochetes in questing european vector ticks and in feeding ticks removed from people*. J Clin Microbiol.50(3):943-7.
142. Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubalek Z, Foldvari G, et al. 2014. *Ixodes ricinus and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health*. Front Public Health.2:251. Epub 2014/12/19.
143. Rosef O, Paulauskas A, Radzijeuskaja J. 2009. *Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato and Anaplasma phagocytophilum in questing Ixodes ricinus ticks in relation to the density of wild cervids*. Acta Vet Scand.51:47. Epub 2009/12/01.
144. Rubel F, Brugger K, Pfeffer M, Chitimia-Dobler L, Didyk YM, Leverenz S, et al. 2016. *Geographical distribution of Dermacentor marginatus and Dermacentor reticulatus in Europe*. Ticks Tick Borne Dis.7(1):224-33. Epub 2015/11/11.
145. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH, Jr. 2011. *Updates on Borrelia burgdorferi sensu lato complex with respect to public health*. Ticks Tick Borne Dis.2(3):123-8. Epub 2011/09/06.
146. Sándor A, Mărcuțan DI, D'Amico G, Gherman CM, Dumitrache MO, Mihalca AD. 2014. *Do the ticks of birds at an important migratory hotspot reflect the seasonal dynamics of Ixodes ricinus at the migration initiation site? A case study in the Danube Delta*. PLoS One.9(2): e89378.
147. Sandor AD, Dumitrache MO, D'Amico G, Kiss BJ, Mihalca AD. 2014. *Rhipicephalus rossicus and not R. sanguineus is the dominant tick species of dogs in the wetlands of the Danube Delta, Romania*. Vet Parasitol.204(3-4):430-2. Epub 2014/06/05.
148. Sandor AD, Marcutan DI, D'Amico G, Gherman CM, Dumitrache MO, Mihalca AD. 2014. *Do the ticks of birds at an important migratory hotspot reflect the seasonal dynamics of Ixodes ricinus at the migration initiation site? A case study in the Danube Delta*. PLoS One.9(2):e89378. Epub 2014/03/04.
149. Sándor AD, Mărcuțan DI, D'Amico G, Gherman CM, Dumitrache MO, Mihalca AD. 2014. *Do the ticks of birds at an important migratory hotspot reflect the*

- seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* at the migration initiation site? A case study in the Danube Delta. PLoS One.9(2):e89378.
150. Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, et al. 2003. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. Emerging infectious diseases.9(3):329-32. Epub 2003/03/20.
 151. Savuta G. 2007. *Epidemiologie veterinară*. Iasi: PIM; 2007.
 152. Schwaiger M, Cassinotti P. 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. J Clin Virol.27(2):136-45. Epub 2003/06/28.
 153. Serban R, Pistol A, Negut M, Cucuiu R. 2009. [Rickettsia conorii infection in Romania, 2000-2008]. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.54(4):177-83. Epub 2010/10/07. Evolutia febrei butonoase in Romania 2000-2008.
 154. Serban R, Radu I, Codita I. 2013. Rickettsia conorii specific Ig G antibodies: a seroepidemiologic survey in Constanta and Tulcea counties and Bucharest, Romania, 2009. Revista Română de Medicină de Laborator.Vol. 21, Nr. 4/4.
 155. Silaghi C, Beck R, Oteo JA, Pfeffer M, Sprong H. 2016. Neoehrlichiosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by Candidatus Neoehrlichia mikurensis. Experimental & applied acarology.68(3):279-97. Epub 2015/06/18.
 156. Speck S, Perseke L, Petney T, Skuballa J, Pfaffle M, Taraschewski H, et al. 2013. Detection of Rickettsia helvetica in ticks collected from European hedgehogs (Erinaceus europaeus, Linnaeus, 1758). Ticks Tick Borne Dis.4(3):222-6. Epub 2013/01/23.
 157. Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, et al. 2009. Ixodes ricinus ticks are reservoir hosts for Rickettsia helvetica and potentially carry flea-borne Rickettsia species. Parasites & vectors.2(1):41. Epub 2009/09/08.
 158. Strle F. 2004. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Int J Med Microbiol.293 Suppl 37:27-35. Epub 2004/05/19.
 159. Stuenkel S, Granquist EG, Silaghi C. 2013. Anaplasma phagocytophilum--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Front Cell Infect Microbiol.3:31. Epub 2013/07/26.
 160. Subramanian G, Sekeyova Z, Raoult D, Mediannikov O. 2012. Multiple tick-associated bacteria in Ixodes ricinus from Slovakia. Ticks Tick Borne Dis 3: 406-410.
 161. Suss J. 2011. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. Ticks Tick Borne Dis.2(1):2-15. Epub 2011/07/21.
 162. Svendsen C, Milman N, Andersen CB, Rasmussen EM, Thomsen VO, Kroghfelt KA. 2011. Is sarcoidosis a rickettsiosis? An archival study. Scand J Infect Dis.43:349-53.
 163. Swanepoel R, Shepherd A.J., Leman P.A., Shepherd S.P., Miller G.B. 1985. A common-source outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever on a dairy farm. S Afr Med J; 68: 635-37.
 164. Telford SR, 3rd, Wormser GP. 2010. Bartonella spp. transmission by ticks not established. Emerging infectious diseases.16(3):379-84. Epub 2010/03/06.

165. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. 2012. *Metagenomics - a guide from sampling to data analysis*. Microbial informatics and experimentation.2(1):3. Epub 2012/05/17.
166. Tijssen-Klasen E, Fonville M, Gassner F, Nijhof AM, Hovius EK, Jongejan F, et al. 2011. *Absence of zoonotic Bartonella species in questing ticks: first detection of Bartonella clarridgeiae and Rickettsia felis in cat fleas in the Netherlands*. Parasites & vectors.4:61. Epub 2011/04/20.
167. Tijssen-Klasen E, Hansford KM, Jahfari S, Phipps P, Sprong H, Medlock JM. 2013. *Spotted fever group rickettsiae in Dermacentor reticulatus and Haemaphysalis punctata ticks in the UK*. Parasites & vectors.6:212. Epub 2013/07/23.
168. Tijssen-Klasen E, Sprong H, Pandak N. 2013. *Co-infection of Borrelia burgdorferi sensu lato and Rickettsia species in ticks and in an erythema migrans patient*. Parasites & vectors.6:347. Epub 2013/12/12.
169. Tokarz R, Williams SH, Sameroff S, Sanchez Leon M, Jain K, Lipkin WI. 2014. *Virome analysis of Amblyomma americanum, Dermacentor variabilis, and Ixodes scapularis ticks reveals novel highly divergent vertebrate and invertebrate viruses*. Journal of virology.88(19):11480-92. Epub 2014/07/25.
170. Toledo A, Jado I, Olmeda AS, Casado-Nistal MA, Gil H, Escudero R, et al. 2009. *Detection of Coxiella burnetii in ticks collected from Central Spain*. Vector Borne Zoonotic Dis.9(5):465-8. Epub 2008/10/24.
171. Topfer KH, Straubinger RK. 2007. *Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules*. Vaccine.25(2):314-26. Epub 2006/08/26.
172. Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, Woyke T, et al. 2015. *Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing*. Frontiers in microbiology.6:771. Epub 2015/08/25.
173. Trout Fryxell RT, Moore JE, Collins MD, Kwon Y, Jean-Philippe SR, Schaeffer SM, et al. 2015. *Habitat and Vegetation Variables Are Not Enough When Predicting Tick Populations in the Southeastern United States*. PLoS One.10(12):e0144092. Epub 2015/12/15.
174. Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. 1998. *West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania*. Lancet.352(9130):767-71. Epub 1998/09/16.
175. Vassallo M, Paul REL, Perez-Eid C. 2000. *Temporal distribution of the annual nymphal stock of Ixodes ricinus ticks*. Exp Appl Acarol.24:941-9.
176. Vayssier-Taussat M, Le Rhun D, Bonnet S, Cotte V. 2009. *Insights in Bartonella host specificity*. Annals of the New York Academy of Sciences.1166:127-32. Epub 2009/06/23.
177. Vennestrom J, Egholm H, Jensen PM. 2008. *Occurrence of multiple infections with different Borrelia burgdorferi genospecies in Danish Ixodes ricinus nymphs*. Parasitol Int.57(1):32-7. Epub 2007/09/07.
178. Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, et al. 2004. *Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea*. Science.304(5667):66-74. Epub 2004/04/07.

179. Vitale G, Mansuelo S, Rolain JM, Raoult D. 2006. *Rickettsia massiliae* human isolation. Emerging infectious diseases.12(1):174-5. Epub 2006/04/26.
 180. Welc-Faleciak R, Kowalec M, Karbowiak G, Bajer A, Behnke JM, Sinski E. 2014. *Rickettsiaceae and Anaplasmataceae infections in Ixodes ricinus ticks from urban and natural forested areas of Poland*. Parasites & vectors.7:121. Epub 2014/03/26.
 181. Wojcik-Fatla A, Zajac V, Sawczyn A, Sroka J, Cisak E, Dutkiewicz J. 2016. *Infections and mixed infections with the selected species of Borrelia burgdorferi sensu lato complex in Ixodes ricinus ticks collected in eastern Poland: a significant increase in the course of 5 years*. Experimental & applied acarology.68(2):197-212. Epub 2015/11/23.
 182. Wong K, Fong TT, Bibby K, Molina M. 2012. *Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters*. Environment international.45:151-64. Epub 2012/04/28.
 183. Wood H, Artsob H. 2012. *Spotted fever group rickettsiae: a brief review and a Canadian perspective*. Zoonoses and public health.59 Suppl 2:65-79. Epub 2013/03/19.
 184. Xia H, Hu C, Zhang D, Tang S, Zhang Z, Kou Z, et al. 2015. *Metagenomic profile of the viral communities in Rhipicephalus spp. ticks from Yunnan, China*. PLoS One.10(3):e0121609. Epub 2015/03/24.
 185. Yang J, Li Y, Liu Z, Liu J, Niu Q, Ren Q, et al. 2015. *Molecular detection and characterization of Anaplasma spp. in sheep and cattle from Xinjiang, northwest China*. Parasites & vectors.8:108. Epub 2015/04/19.
 186. Zaharia M, Popescu CP, Florescu SA, Ceausu E, Raoult D, Parola P, et al. 2016. *Rickettsia massiliae* infection and SENLAT syndrome in Romania. Ticks Tick Borne Dis. Epub 2016/04/02.
- <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/rickettsial-spotted-typhus-fevers-related-infections-anaplasmosis-ehrlichiosis>
 - http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf
 - <http://www.eucalb.com/>