



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OPPOSDRU



USAMV Iași

REZUMAT

Cuvinte cheie: *Ixodidae*, distribuție geografică, ecologie, activitate sezonieră, căpușe –gazde - RLB, *Dermacentor*, diversitate genetică

Teza de doctorat intitulată „**POLIMORFISMUL GENETIC ȘI ECOLOGIA CĂPUȘELOR IXODIDE**” a fost elaborată în cadrul Școlii Doctorale a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” din Iași, ca parte a proiectului *Perfecționarea și dezvoltarea resurselor umane pentru cercetare și inovare prin școala doctorală*, POSDRU/CPP107/DMI1.5/S/77222, proiect cofinanțat din Fondul Social European, prin intermediul Ministerului Muncii, Familiei, Protecției Sociale și Persoanelor Vârstnice, respectiv Autoritatea de Management pentru Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (AMPOSDRU), în cadrul Programului Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 -2013.

Lucrarea a fost realizată pe parcursul a patru ani de studii, în perioada 1.10.2010 – 30.09.2014 și este structurată în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale: prima parte reprezentată de **Stadiul Actual al Cunoașterii**, ce cuprinde un număr de 33 pagini și reprezintă 26.19 % din conținutul lucrării și ce-a de a doua parte, de **Contribuții Personale**, cu un număr de 93 pagini reprezentând 73.81%.

Conținutul primei părți, **Stadiul Actual al Cunoașterii**, este structurat în două capitole, în care sunt relatate, în sinteză informații din literatura de specialitate națională și internațională cu privire la subiectul acestei lucrări.

Primul capitol, intitulat **Noțiuni generale privind morfologia și ecologia căpușelor ixodide** cuprinde studii bibliografice cu privire la taxonomia căpușelor, morfologia și date privind ecologia acestora. Taxonomia căpușelor a fost și încă mai este un subiect de dezbătut. Ultima actualizare a genurilor și speciilor de căpușe a fost realizată de Guglielmone și colab. în anul 2010, în care sunt recunoscute 896 specii de căpușe organizate în trei familii: *Nuttalliellidae*, cu o singură specie, *Argasidae* ce cuprinde un număr de 193 de specii și familia *Ixodidae* formată din 702 specii. În următorul subcapitol am pus accent pe elementele de



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL ÎNTR-UNIRII
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPLASATFondul Social European
POSDRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSDRU

USAMV Iași

morfologie externă, elemente pe baza cărora se realizează identificarea speciilor de căpușe; metodele de biologie moleculară fiind utilizate îndeosebi pentru clarificarea conflictelor de sinonimie a anumitor specii asemănătoare din punct de vedere morfologic (Zhaler, 1995 Barke și colab., 2002), de caracterizare a structurii filogeografice (Nourredine și colab., 2011, Qui și colab., 2002) și de măsurare a diversității genetice (Casati și colab., 2007, Chițimia și colab., 2009). Tot în acest capitol am descris ciclurile biologice ale căpușelor ixodide, importanța gazdelor, interacțiunea gazdă – vector în transmiterea agenților patogeni și factorii ecologici biotici și abiotici ce influențează biociclul căpușelor ixodide.

În cadrul **Capitolului II - Considerații generale privind caracterizarea genetică a ixodidelor** am realizat un studiu bibliografic cu privire la caracterizarea genetică a căpușelor în România și în străinătate și a markerilor moleculari utilizați pentru măsurarea diversității genetice. Studii privind caracterizarea genetică a căpușelor ixodide din Romania au fost făcute de către unii autori, pe eșantioane din sud-vestul țării. Au fost caracterizate din punct de vedere genetic patru specii ce aparțin familiei Ixodidae (*Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis parva*, *Ixodes ricinus*), alături de gamasidul *Dermanyssus galinae*, *Haemaphysalis longicornis* din China fiind folosit în scop comparativ. Au fost amplificate regiunile non-codante ITS1 și ITS2 cu lungimi ce au variat între 238 – 1819 pb pentru ITS1 și 137 – 1695 pb pentru ITS2. Pentru cele 4 specii de căpușe ixodide procentul de diferențiere intraspecifică a fost între 0 și 1.5%, în schimb diferența privind variația interspecifică a fost între 2 – 25.2% (Chițimia și colab., 2009). Într-un alt studiu efectuat în 2010, privind caracterizarea genetică, au fost incluse trei specii de căpușe din familia Ixodidae (*Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes ricinus*) din România, o specie din China *Haemaphysalis longicornis* și o specie aparținând familiei Argasidae (*Argas persicus*). Căpușele au fost caracterizate genetic pe baza a doi marker moleculari (pcox1 – gena parțială citocrom oxidaza subunitatea 1, pnad5 – gena parțială dehidrogenaza subunitatea 5). Ampliconii rezultați în urma reacției PCR au fost de 732 pb pentru pcx1, respectiv 519 pb pentru pnad5. Variația intraspecifică a fost curinsă între 0.1 – 1.0% pentru pcx1 și 0.2 – 1.2 % pentru pnad5 în cazul speciei *Dermacentor marginatus*, iar pentru *Haemaphysalis punctata* procentele au variat între 0.4 – 1.9 % pentru gena pcx1 și 0.4 – 1.0% pentru gena pnad5. La fel ca și în cazul markerilor moleculari ITS1 și ITS2 , variația interspecifică a fost mai mare, aceasta având valori cuprinse între 15.9 – 27.6% pentru gena pcx1 și 20.3 – 42.4% pentru gena nad5 (Chițimia și colab., 2010). Studiile privind caracterizarea genetică a speciilor de ixodide din sud vestul României au fost primele de acest fel în România, aducând informații despre variabilitatea genetică



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPLASATFondul Social European
POSDRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSITU

USAMV Iași

interpecifică dar și intraspecifică. Dintre genele studiate, gena *pnad5* prezintă raportul cel mai mare de diferențiere interspecii.

În schimb, numeroase studii privind caracterizarea genetică a căpușelor ixodide au fost efectuate în străinătate. Cercetările efectuate de către Norris și colab. (1996), Kain și colab. (1999) și Qui și colab., (2002) pe continentul nord american, privind caracterizarea genetică a speciei *Ixodes scapularis* au descris, cu ajutorul markerilor genetici (markeri mitocondriali 12S și 16rADN) și prin metoda SSCP ("Single strand conformation polymorphism"), o structura filogeografică bine definită cu o cladă sudică și una nordică; subpopulațiile acestei specii fiind perfect distincte din punct de vedere genetic. Studii privind diversitatea genetică și structura filogeografică a căpușelor s-au realizat și în Europa. Bineînțeles că cercetările s-au axat pe vectorul principal al boreliozei, respectiv specia *Ixodes ricinus*. Thierry de Meeus și colab. în 2002 au analizat diversitatea genetică a unei populații de *Ixodes ricinus* de la nivel local (Elveția), la care a adăugat și o probă din nordul continentului african (Tunisia). Markerii moleculari utilizați în acest studiu au fost microsateliți descriși de către Delaye și colab. (1998), respectiv IR8, IR25, IR27, IR32 și IR39. În urma analizelor efectuate s-a observat o slabă diferențiere genetică la nivelul populației elvețiene a speciei *Ixodes ricinus*, dar o divergență a populației tunisiene.

Pentru a înțelege mai bine epidemiologia și evoluția demografică a speciei *Ixodes ricinus* au fost efectuate și alte studii cu privire la structura genetică acestei specii. Casati și colab. (2007) a investigat variabilitatea intraspecifică a speciei *Ixodes ricinus* pe 26 de probe recoltate din diferite țări europene (Elveția, Italia, Austria, Danemarca, Suedia și Finlanda) utilizând cinci markeri mitocondriali (CR – regiunea control, COI, COII, cytB și 12S). În urma analizelor efectuate asupra celor 5 markeri mitocondriali nu s-a putut stabili o structură geografică corelată cu originea probelor studiate. Procentul substituțiilor nucleotidice în cadrul speciei *Ixodes ricinus* a celor cinci markeri mitocondriali a fost mic (CR -5.0%, cytB - 2.7%, 12S rADN – 2.6%, COI – 2.4% respectiv COII – 1.6%), rezultatele fiind similare cu ale altor autori (De Meeus și colab., 2002 , Delaye și colab. (1997). Noureddine și colab. (2011) au notat diferențe genetice majore între speciile de căpușe europene și cele nord africane, observând o divergență semnificativă între acestea. Rezultatele obținute de către Noureddine și colab. (2011) în urma utilizării de markeri mitocondriali cât și nucleari au sporit atenția cercetătorilor care la o analiza foarte minuțioasă a activității sezoniere, preferințelor ecologice a stadiilor de dezvoltare și a morfologiei acestora au stabilit existența unei specii noi de căpușe: *Ixodes inopinatus*.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL ÎNALTEI ÎNCĂLZIRII,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPLASAT



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OPPOSDRU



USAMV Iași

Cea de-a doua parte a acestei teze de **CONTRIBUȚII PERSONALE** este alcătuită din cinci capitole. **Capitolul III - Scopul și obiectivele cercetărilor** motivează tema de cercetare prin importanța studiului și a utilizării metodelor moderne de caracterizare genetică a căpușelor ixodide.

Capitolul IV intitulat **Distribuția geografică și dinamica sezonieră a căpușelor ixodide din Nord-Estul României** are ca obiective realizarea unei cartografieri a căpușelor ixodide recoltate de pe vegetație în regiunea Moldovei și județul Tulcea, descrierea comunităților de căpușe și evaluarea dinamicii sezoniere a acestora. Astfel, pentru îndeplinirea obiectivelor s-au desfășurat numeroase campanii de colectare a căpușelor folosind tehnica drapelului. S-au realizat recoltări din 32 de locații, pentru fiecare dintre ele notându-se coordonatele geografice, altitudinea și tipul vegetației. După colectare, căpușele au fost identificate pe baza caracterelor morfologice și conservate în etanol 70% în vederea utilizării acestora pentru examene moleculare.

Din cele 32 de puncte de colectare s-au recoltat un total de 1017 de căpușe. Au fost identificate șapte specii de căpușe din trei genuri: *Ixodes ricinus* (879, 86.26%), *Haemaphysalis punctata* (85, 8.34%), *Dermacentor reticulatus* (27, 2.65%), *Dermacentor marginatus* (22, 2.16%), *Haemaphysalis inermis* (2, 0.19%), *Ixodes redikorzevi* (1, 0.10%), *Haemaphysalis concinna* (1, 0.10%). Pentru fiecare specie s-a realizat o harta a distribuției geografice în regiunea de Nord-Est a României.

Ixodes ricinus a avut prevalența cea mai crescută, această specie a fost găsită în toate cele 32 de locații (100%). În 10 puncte de colectare unde au fost recolate specii diferite, *Ixodes ricinus* a fost specia dominantă (C.A. Rosetti - IS, Ciric - IS, Cetățuia - IS, Păun - IS, Breazu - IS, Cotu Morii - IS, Solești - VS, Crasna - VS, Gârboavele - GL, Slava Cercheză - TL), iar în alte 17 locații *Ixodes ricinus* a fost singura specie colectată (Copou - IS, Bârnova - IS, Ezăreni - IS, Huși - VS, Adam - GL, Slava Rusă - TL, Greșu - VN, Valea Sării - VN, Dofteanca - BC, Poiana Sărată - BC, Podoleni - NT, Mihai Eminescu - BT, Drancani - SV, Coșna - SV, Șaru Dornei - SV, Pojorâta - SV, Rădăuți - SV). Specia *Ixodes ricinus* a fost recoltată din pădurile de foioase, din pădurile mixte și a fost singura specie identificată în habitatele formate din păduri de conifere. Această specie prezintă o mare capacitate de adaptare confirmată prin lărgirea ariei de distribuție la altitudini și latitudini mai mari.

Este de evidențiat comunitatea populației de *Dermacentor reticulatus* în zona Moldovei, o specie cu o importanță patogenă deosebită, fiind răspunzătoare, de cele mai multe ori, de transmiterea babesiozei canine.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL ÎNCLINĂRII,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELOR VÂRSTNICE
AMPIEDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OPPOSDRU



USAMV Iași

Este important de subliniat faptul că specia *Haemaphysalis inermis* a fost din nou identificată în România, ultima descriere a acesteie a fost făcută de către Feider Zicman în anul 1965.

Datele prezentate în subcapitolul 4.1 - Distribuția geografică a căpușelor ixodide din Nord-Estul României - au fost subiectul unei lucrări științifice publicată în Revista de Lucrări Științifice a Facultății de Medicină Veterinară, Timișoara Vol. XLVII (3), 78-83 - 2014 ISSN: - 1221-5295, - "SHORT SURVEY OF QUESTING TICKS DISPERSAL (*Ixodidae*) IN THE NORTH-EASTERN ROMANIA".

Următorul subcapitol - **4.2 Dinamica sezonieră a căpușelor ixodide din Nord-Estul României** - a vizat corelarea datelor obținute anterior prin analiza comunităților de căpușe ixodide și evaluarea dinamicii sezoniere a acestora la nivelul unor biotopuri favorabile dezvoltării lor. În cadrul acestui subcapitol au fost stabilite patru zone de studiu: C.A. Rosetti, Ciric, Cetățuia și Bucium din municipiul Iași. Tipul de vegetație întâlnit a fost format din pădure de foioase mixtă, alcătuită predominant din specii de arbori precum *Quercus spp.*, *Carpinus spp.*, *Fraxinus spp.*, *Fagus spp.*, aceasta asigurând condiții foarte bune de umiditate și temperatură necesare dezvoltării căpușelor *Ixodide*. În astfel de habitate fauna este reprezentată, de obicei, de păsări de talie mică: vrabia (*Passer domesticus*), mierla (*Turdus merula*), rozătoare: șoarecele de câmp (*Apodemus agrarius*), șoarecele cu burta albă (*Apodemus flavicollis*), orbetele (*Nannospalax leucodon*), veverița (*Sciurus vulgaris*), iepurele (*Lepus europaeus*), ariciul (*Erinaceus romanicus*), pisica sălbatică (*Felis silvestris*), mistrețul (*Sus scrofa*), căprioara (*Capreolus capreolus*), vulpea (*Vulpes vulpes*) și lupul (*Canis lupus*). Recoltarea căpușelor a fost efectuată pe durata unui an calendaristic, metodologia de recoltare permițând o evaluare bună a densității căpușelor în zonele studiate. În perioada Octombrie 2013 – Septembrie 2014 au fost colectate 1526 de căpușe: *Ixodes ricinus* a fost cea mai abundentă specie (92,39%) cu 35 masculi, 26 femele, 220 nimfe și 1129 larve, urmată de specia *Haemaphysalis punctata* (6,94%) cu 1 mascul, 12 femele, 16 nimfe și 77 larve și *Dermacentor reticulatus* (0,59%) cu 2 masculi și 7 femele. Un adult (femelă) din specia *Ixodes redikorzevi* a fost colectat din punctul de recoltare C.A. Rosetti.

Ixodes ricinus a fost specia cel mai des întâlnită, înregistrând o prevalență de 88,59 % la C.A. Rosetti, 99,04% la Ciric, 89,85% la Bucium și 65,51% la Cetățuia

Haemaphysalis punctata a fost a doua specie abundentă, întâlnită în trei puncte de recoltare: Bucium 3%, C.A. Rosetti 8% și Cetățuia 34%. Prevalența ridicată a speciei *Haemaphysalis punctata* pe dealul Cetățuia poate fi atribuită factorilor ecologici locali



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL ÎNTR-UNIRII
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPLASAT



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
ORDINUL



USAMV Iași

(expunerea versantului, temperatura, umiditatea relativă, comunitatea plantelor și a animalelor), observându-se o stratificare evidentă a acestei specii în funcție de expunerea versanților în zonele de agrement C.A. Rosetti și Cetățuia.

Dermacentor reticulatus a prezentat cea mai scăzută abundență a populațiilor de căpușe din cele patru zone de agrement: Bucium – 7%, C.A. Rosetti – 3% și Ciric – 1%.

Cea mai mare densitate de căpușe s-a înregistrat în lunile Aprilie și Mai în zona de agrement Ciric. (9 căpușe/100m², 7 căpușe/100m²). În luna aprilie în zona de agrement C.A. Rosetti, densitatea căpușelor a fost de 6,4 căpușe/100m², pe dealul Cetățuia înregistrându-se o densitate de 4,4 căpușe/100m². Pe dealul Bucium densitatea căpușelor de pe vegetație a fost de 2,4/100m² în luna Aprilie, cu o creștere în luna Mai – 5,8 căpușe/100m².

O creștere a densității căpușelor din mediu se observă și în perioada anotimpului de toamnă: C.A. Rosetti – 4,6 căpușe/100m²; Ciric – 2 căpușe/100m²; Cetățuia – 1,4 căpușe/100m²; Bucium – 1,2 căpușe/100m²

Datele înregistrate la nivel local confirmă rezultatele privind abundența și comunitatea speciilor de căpușe din regiunea Moldovei.

Datele prezentului subcapitol (4.2) au fost prezentate sub forma unui articol științific publicat în Revista de Lucrări Științifice a Facultății de Medicină Veterinară, Iași, 2014 Vol. 57(1-2):140-145, intitulat „The Acarological Risk in Iasi Recreational Areas”

În Iași, dinamica sezonieră a căpușelor ixodide prezintă predominant tiparul activității lui *Ixodes ricinus*, specie dominantă (>90% prevalență) în cele patru habitate studiate.

Dermacentor reticulatus a prezentat un debut mai timpuriu al activității, cu un vârf de activitate înregistrat în luna Martie, acesta descrescând ușor în lunile de primăvară, cu o întrerupere de-alungul verii și un al doilea val de activitatea în Octombrie. Vârful activității de toamnă a reprezentat cca. 20% din cel de primăvară. Date obținute sunt similare cu cele din literatura de specialitate. (Ioniță și colab., 2009, Feider 1965).

Debutul activității sezoniere a lui *Haemaphysalis punctata* s-a înregistrat în luna Martie, iar vârful activității în luna Aprilie. Curba dinamicii a descris, mai apoi, o scădere bruscă în luna Mai, fără a atinge punctul 0, crescând din nou, în lunile August, Septembrie și Octombrie. Dinamica sezonieră a speciei *Haemaphysalis punctata* este asemănătoare celei descrise de Feider în 1965 la sud de izoterma anuală de 10°C. În ultimii ani izoterma anuală înregistrată în județul Iași a depășit frecvent pragul de 10°C.

Activitatea sezonieră a adulților de *Ixodes ricinus* s-a desfășurat, în general, după tiparul de activitate al speciei. Un tipar, bimodal, cu un vârf al activității sezoniere înregistrat în lunile



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAULUI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPLASATFondul Social European
POSDRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OLPOSDRU

USAMV Iași

de primăvară (Aprilie-Mai) și o a doua perioadă de activitate mult mai scăzută ca intensitate, în Septembrie și Octombrie. Nimfele au prezentat o dinamică sezonieră asemănătoare cu cea a adulților, însă abundența acestora a fost cu mult mai mare. Vârful de activitate al nimfelor de *Ixodes ricinus* a fost înregistrat în luna Aprilie în zonele de agrement C.A. Rosetti, Cîric și Cetățuia și în luna Mai pe dealul Bucium. În ceea ce privește activitatea sezonieră a larvelor de *Ixodes ricinus*, acestea au fost active în perioada lunilor de vară, cu varful de activitate înregistrat în luna Iulie, în zonele de agrement C.A. Rosetti, Cîric și Cetățuia. Pe dealul Bucium larvele au fost active începând cu luna Mai, lună în care s-a înregistrat, și vârful de activitate. Cercetările efectuate în România de către alți autori au relevat o dinamică sezonieră a speciei *Ixodes ricinus* cu un vârf de activitate în lunile Mai – Iunie (Ioniță și colab., 2006, Ioniță și colab., 2009, Coipan și colab., 2010).

În **Capitolul V** intitulat **Influența factorilor ecologici asupra căpușelor ixodide**, am urmărit efectuarea corelațiilor între factorii ecologici biotici și abiotici și dinamica sezonieră a speciei *Ixodes ricinus* și identificarea gazdelor căpușelor prin metode de biologie moleculară.

Activitatea sezonieră a căpușelor *Ixodide* este puternic influențată de factorii ecologici abiotici – **Temperatura; Umiditatea; Deficitul de saturație** și **Precipitațiile**. Aceștia pot prelungi, reduce sau chiar stopa activitatea de căutare a gazdelor a căpușelor ixodide. Umiditatea relativă este un indicator al puterii căpușelor de rehidratare. De ex. *Ixodes ricinus*, *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma cajennense*, căpușe de pe continente diferite, pot supraviețui doar atunci când umiditatea relativă nu scade sub 80% pentru o perioadă mai lungă de timp (Pfaffle și colab., 2013).

Datele meteorologice ale anilor 2013 și 2014 (**temperatura, umiditatea relativă, deficitul de saturație** și **precipitațiile**) au fost obținute de la Centrul Regional de Meteorologie Moldova.

Analiza datelor meteorologice și a celor privind activitatea sezonieră a căpușelor a evidențiat o corelație negativă între activitatea nimfelor și adulților speciei *Ixodes ricinus* și o creștere a temperaturii medii lunare peste 19°C asociată cu o umiditate relativă scăzută (70%). În trei din cele patru zone studiate, larvele au avut o activitate sezonieră alocronică în comparație cu nimfele și adulții, prezentând vârful de activitate în luna Iulie, puternic corelat cu temperatura ridicată. Cercetări efectuate asupra dinamicii sezoniere a larvelor de căpușe de *Ixodes ricinus*, în corelație cu temperatura au fost efectuate și de către alți autori din Europa, menționând ca temperatura este factorul abiotic cel mai important în desfășurarea activității de căutare a gazdelor (Dantas-Torres și colab., 2010)



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL ÎNTR-UNIRII
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPLASAT



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OPPOSDRU



USAMV Iași

Rezultatele obținute în cadrul subcapitolului **Factorii ecologici abiotici** au făcut parte din lucrarea științifică cu titlul ”SEASONAL DYNAMICS OF IXODID TICKS IN IAȘI URBAN AREA” publicată în **Revista de Lucrări Științifice – Medicină Veterinară, Iași, 2014 Vol. 57(1-2) :135-139**

Identificarea gazdelor căpușelor *Ixodes ricinus* s-a realizat prin tehnica RLBH (reverse line blot hybridization). Aceasta metodă presupune identificarea sursei (gazdei) prin analiza mesei de sânge a căpușelor. **Probele au fost prelucrate și analizate în cadrul laboratorului UR0346 INRA - Clermont Ferrand, Franța.**

Tehnica mPCR/RLBH (multiplex PCR/ Reverse Line Blot Hybridization) pentru analiza mesei de sânge a căpușelor fost adaptată și descrisă de Humair și colab., 2007. Principiul acestei metode presupune amplificarea unui marker reprezentat de un fragment al unei gene mitocondriale specifice animalului gazdă. Acest marker trebuie să fie discriminatoriu între grupele principale de gazde vertebrate (mamifere, păsări, rozătoare mici, artiodactile și reptile) și să permită identificarea acestuia, pe baza mesei de sânge a căpușei.

Un număr de 96 de nimfe din pădurea Breazu au fost analizate prin metoda mPCR/RLB pentru identificarea gazdelor. Pentru validarea reacției multiplex PCR s-a recurs la amplificarea unui fragment al unei gene aparținând speciei *Ixodes ricinus*. S-au utilizat 20 de sonde pentru păsări (*Certhia brachydactyla*, *Columba palumbus*, *Corvus corone*, *Erithacus rubeculla*, *Fringilla/Pyrrhula*, *Gallus gallus*, *Garrulus glandarius*, *Luscinia megarhynchos*, *Parus*, *Parus ater*, *Phasianus colchicus*, *Phylloscopus*, *Pica*, *Picus viridis*, *Prunella*, *Sitta europaea*, *Sturnus vulgaris*, *Sylvia*, *Troglodytes*, *Turdus/Parus*), una pentru reptile (*Reptilia*) și 35 pentru mamifere (*Apodemus sylvaticus*, *Bos taurus*, *Capreolus capreolus*, *Crocidura russula*, *Equus caballus*, *Erinaceus erinaceus*, *Glis glis*, *Lepus europaeus*, *Meles meles*, *Microtus/Micromys*, *Mycromis minutus*, *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis*, *Mus musculus*, *Mustella erminea*, *Mustella putorius*, *Mustella nivalis*, *Myocastor coypus*, *Myodes glaerolus*, *Neomys*, *Neomys anomalus*, *Neomys fodiens*, *Oryctolagus cuniculus*, *Ovies aries*, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, *Sciurus vulgaris*, *Sorex*, *Sorex araneus*, *Sorex minutus*, *Suncus etruscus*, *Sus scrofa*, *Talpa europaea*, *Tamias sibiricus*, *Vulpes vulpes*.)

Din totalul probelor analizate 30% au răspuns pozitiv la analiza mesei de sânge. Gazdele identificate au fost: *Sus scrofa* – 24%; *Bos taurus* – 14%, *Oryctolagus cuniculus* – 14%; *Aves* – 10%; *Vulpes* – 7%; *Microtus agrestis* – 7%; *Neomys* - %; *Sciurus vulgaris* – 4%; *Apodemus* – 4%; *Fringilla/Pyrrhula* – 3%, *Microtus/Micromys* – 3%; *Turdus/Parus* – 3%; *Columba palumbus* – 3%. Determinarea preferinței gazdelor căpușelor – vector este vitală în elucidarea eco-



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL ÎNTR-UNIRII
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPLASATFondul Social European
POSDRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSURE

USAMV Iași

epidemiologiei bolilor pe care acestea le transmit. Detașarea căpușelor de pe animalele capturate ne poate indica utilizarea acelui animal drept gazdă, dar cu un anumit grad de subiectivism pentru acele specii care sunt ușor de capturat. Utilizarea acestei metode de identificare a gazdelor pe baza mesei de sânge luate de către căpușe în stadiul de dezvoltare precedent este mult mai fezabilă și nediscriminatorie, reușind a se identifica gazda căpușei dintr-o cantitate infimă de sânge rămas în intestinul nimfei sau adultului, chiar și după 280 zile de la năpârlire (Humair și colab., 2007). Ulterior pe aceleași eșantioane se poate verifica gradul de infestare al căpușelor cu diferiți agenți patogeni. (Coipan și colab., 2009, Scott și colab., 2012). Metoda poate fi adaptată și pentru identificarea gazdelor altor artropode vectori. De asemenea, permite identificarea agenților patogeni gazduiți de artropode, identificare la nivel de specii a gazdelor rezervor și determinarea importanței speciilor gazde dintr-un habitat (Scot și colab., 2012).

Cele 96 de nimfe examinate prin metoda mPCR/RLB fac parte dintr-un studiu european de identificare a gazdelor speciei *Ixodes ricinus* și de evaluare a relației gazdă-vector-patogen.

În continuare, în cadrul **capitolului VI** intitulat **Diversitatea genetică a speciilor *Dermacentor marginatus* și *Dermacentor reticulatus*** s-a urmărit evaluarea prin metode de biologie moleculară a gradului de diversitate genetică și analiza structurii filogeografice a celor două specii la nivel european.

Caracterizarea genetică a populațiilor de căpușe poate contribui la:

- măsurarea fluxului de gene între populații cât și la interiorul populațiilor, oferind astfel o mai bună cunoaștere a dispersiei vectorilor și implicit a agenților patogeni transmiși de căpușe,
- oferă informații asupra taxonomiei al speciilor sau subspeciilor,
- dezvoltarea unor noi metode de prevenție a bolilor transmise prin intermediul căpușelor

Genul *Dermacentor* este unul din cele mai importante ce cuprinde un număr de 30 de specii răspândite în Europa, Asia și America de Nord (Sonenshine și colab., 2002). În Europa există două specii importante ale genului *Dermacentor*, respectiv *Dermacentor marginatus* și *Dermacentor reticulatus*. Aceste specii prezintă importanță medicală fiind vectori pentru maladii precum babesioza câinilor și rumegătoarelor și a rickettsiozelor precum SFG ("Spotted Fever Group") și TIBOLA (Tick-Borne Lymphadenopathy) (Selmi și colab., 2008, Foldvari și colab., 2013).

Eșantionajul celor două specii analizate a fost efectuat astfel încât să cuprindă o arie cât mai mare din distribuția geografică a acestora. În cazul speciei *Dermacentor marginatus* eșantionarea a cuprins 9 țări: Portugalia (Peninsula Iberica), Tunisia (Nordul Africii), Frața, Italia,



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPLASATURIFondul Social European
POSDRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSDRU

USAMV Iași

Germania, Ungaria, România (Europa Centrală și de Est) și Turcia, Iran (Asia Mică). Țările de proveniență a eșantioanelor speciei *Dermacentor reticulatus* au fost: Portugalia, Franța, Germania, Slovacia, România și Turcia.

Alegerea genei de interes s-a făcut după o prealabilă cercetare "in silico". Cu ajutorul secvențelor de ADN mitocondrial sau nuclear preluate din Genbank, am efectuat aliniamente cu rolul de a găsi gena (markerul molecular) ce oferă cele mai multe situsuri informative în raport cu posibilitatea efectuării primerilor necesari amplificării acesteia. S-au efectuat aliniamente ale genelor mitocondriale 12S rARN, 16S rARN și citocrom oxidaza subunitatea 1 și ale genelor nucleare 18S rARN, 28S rARN, beta-actina, defensina, ITS1 și ITS2. Pentru realizarea aliniamentelor am folosit programele **BioEdit** și **Geneious 6.0.6**. După o analiză amănunțită a celor trei gene mitocondriale și a celor șase gene nucleare fost selectată gena pCOI a ca marker molecular pentru caracterizarea genetică a speciilor *Dermacentor marginatus* și *Dermacentor reticulatus*. În vederea izolării ADN-ului căpușelor am utilizat metoda de extracție pe bile magnetice apoi s-a efectuat o purificare a materialului genetic pe coloane cu filtru, urmată de cuantificarea extractelor obținute. Pentru siguranța calității probelor utilizate în vederea secvențierii, dozarea ADN-ului obținut s-a făcut prin două metode diferite: fluorometrie și spectrofotometrie.

Analiza datelor obținute în urma secvențierii probelor de ADN de la căpușele de *Dermacentor marginatus* și *Dermacentor reticulatus* a fost efectuată cu programe speciale de a bioinformatică. Analiza și editarea cromatogramelor a fost realizată cu programele: **Bioedit v 7.2.5** (Hall, 2005) și **Finch TV 1.4**, iar programul **Geneious 6.0.6** a fost utilizat pentru realizarea aliniamentelor. Analizele filogenetice au fost efectuate cu ajutorul programului **MEGA6** (Tamura și colab., 2007) folosind metodele „Neighbour Joining” (NJ) și „Maximum Composite Likelihood” (MCL). Analiza numărului de site-uri de segregare, numărului de haplotipuri, diversitatea haplotidică și nucleotidică au fost efectuate cu programul **DnaSP v 5.1** (Rozas și colab., 2003).

În cazul speciilor genului *Dermacentor* au fost aliniate 28 de secvențe cu programul Geneious 6.0.6. (19 indivizi aparținând speciei *Dermacentor marginatus* și 9 indivizi aparținând speciei *Dermacentor reticulatus*).

Pentru populația de *Dermacentor marginatus* (19 probe) au fost identificate 12 haplotipuri separate prin 15 situsuri variabile (14 sinonime, 1 non-sinonimă), 5 situsuri variabile unice și 10 "parsimony" informative. Trei haplotipuri au fost înregistrate în urma analizei celor



UNIUNEA EUROPEANĂ

GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
DEPENDENTEFondul Social European
POSDRU 2007-2013Instrumente Structurale
2007-2013MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OPPOSREDU

USAMV Iași

noua eșantioane a speciei *Dermacentor reticulatus*, separate prin două situri variabile unice (amândouă sinonime).

Valorile înregistrate pentru diversitatea haplotidică în cazul speciilor *Dermacentor marginatus* (0.95322) și *Ixodes ricinus* (0.8952) au fost foarte mari, *Dermacentor reticulatus* a prezentat o diversitate haplotidică moderată (0.41667). De asemenea, diversitatea nucleotidică a înregistrat valori ridicate pentru speciile *Dermacentor marginatus* (0.00671) și *Ixodes ricinus* (0.00699) și o valoare mică în cazul speciei *Dermacentor reticulatus* (0.00082).

Acest studiu reprezintă prima încercare de a descrie diversitatea genetică a celor două specii ale genului *Dermacentor* din Europa, respectiv *Dermacentor marginatus* și *Dermacentor reticulatus*.

Vasta răspândire geografică a speciei *Dermacentor marginatus* corelată cu o mare varietate de gazde folosite poate explica valorile mari ale diversității haplotidice și diversității nucleotidice, în comparație cu cele înregistrate în cazul speciei surori (*Dermacentor reticulatus*). În schimb, valorile scăzute ale diversității haplotidice și diversității nucleotidice pot fi atribuite numărului scăzut de gazde, unei arii înguste de distribuție și unei evoluții recente.

Valoarea ridicată a diversității haplotidice (0.95322) înregistrată de *Dermacentor marginatus* este similară cu cea descrisă de Noureddine și colab. (2011) pentru *Ixodes ricinus* (0.886). *Ixodes ricinus* prezintă o mare omogenitate a fluxului de gene la nivelul continentului European, dar o divergență față de populațiile nord africane. Omogenitatea acestei specii a fost pusă pe seama dispersiei pasive prin intermediul păsărilor migratoare (Noureddine și colab., 2011). La fel și în cazul speciei *Dermacentor marginatus*, păsările joacă un rol important în dispersia geografică. Larvele de *Dermacentor marginatus* sunt găsite ocazional și pe păsări.

Arborii filogenetici realizați pentru speciile de *Dermacentor marginatus* și *Dermacentor reticulatus* studiate în această lucrare rezultați au prezentat o structură filogeografică slabă. Totuși în cazul speciei *Dermacentor reticulatus* se observă o ușoară divergență a populației din Turcia, probabil ca urmare a unei separații alopatrice.

Toate testele moleculare au fost realizate în cadrul unității mixte de cercetare INRA - ONIRIS, BioEPA 1300, Nantes, Franța sub îndrumarea cercetătorului științific gradul I Olivier PLANTARD.

În încheierea tezei sunt redată **Concluziile Generale** în cadrul **Capitolului VII**.