



REZUMAT

Cuvinte cheie: Lilieci, Chiroptera, Zoonoze, Leptospira, Rabie, West Nile, Paramyxovirus, Flavivirus, Lyssavirus, Epidemiologie, Patologie infecțioasă, OneHealth, supraveghere activă.

Titlul tezei de doctorat: Studiu privind prezența în coloniile de Chiroptere rezidente pe teritoriul României a unor microorganisme cu potențial zoonotic.

Profesor coordonator: Prof. Univ. Dr. Doina Daneș

Comisie de îndrumare: Prof. Univ. Dr. Ioan Liviu Mitrea, CS I Dr. Alexandru Filip Vladimirescu, CS II Dr. Alexandru Petculescu

Doctorand: Ciocănaș Marius-Alexandru

Scopul lucrării: este acela de a aduce contribuții la cunoașterea științifică asupra principalelor agenți patogeni/ boli, cu potențial zoonotic, prezenți la liliecii din România și riscul unui fenomen de tip spill-over pentru om, sau alte specii animale. De asemenea, am evaluat rolul Chiropterelor ca rezervor pentru anumiți agenți infecțioși și condițiile în care acestea sunt capabile să mențină și să multiplice respectivele entități fără a prezenta semne de boală.

Obiectivele primare au constat în identificarea unor microorganisme cu potențial zoonotic și evaluarea răspândirii acestor agenți patogeni pe teritoriul României. Prezenta lucrare își propune un screening epidemiologic al *Chiropterelor* în vederea identificării principalelor elemente de epidemiologie și implicația lor în sănătatea publică. **Colectivul de cercetare** a fost reprezentat de Școala doctorală de Medicină Veterinară- Clinica de Boli Infecțioase și Medicină Preventivă a USAMVB; Institutul de Speologie Emil Racoviță al Academiei Române (ISER), iar **formele de colaborare științifică** au constat în consultarea specialiștilor din cadrul ISER, deschideri interdisciplinare spre domenii de cercetare înrudite cu participarea în echipe de cercetare. De asemenea cercetarea realizată a avut un puternic caracter interdisciplinar prin întrepătrunderea cu entomologia, ecologia și medicina umană, prin prisma faptului că agenții infecțioși studiați au potențial zoonotic, iar o parte dintre aceștia cunosc transmitere vectorială. Din punct de vedere științific, proiectul propus are un grad înalt de noutate și complexitate și se bazează pe cunoștințe și date interdisciplinare (patologie, virusologie, bacteriologie, imunologie, parazitologie, speologie, biologie moleculară, ecologie, biologie, epidemiologie, etc). În funcție de agentul etiologic, se pot identifica mai multe categorii de boli infecțioase: viroze, bacterioze, micoze, rikettsioze. Până în prezent au fost raportate 66 de virusuri care au fost izolate sau detectate din materiale biologice provenite de la 74 specii diferite de Chiroptere. Unele virusuri au fost identificate la mai multe specii diferite de Chiroptere, pe când altele au fost raportate exclusiv la o singură specie.

Teza intitulată **Studiu privind prezența în coloniile de *Chiroptere* rezidente pe teritoriul României a unor microorganisme cu potențial zoonotic** este alcătuită din două părți: **Partea I:** corespunde studiului bibliografic, în această parte a tezei s-a făcut un up-date al celor mai recente cunoștințe referitoare la subiect, prin colectarea, reactualizarea și sinteza informațiilor din literatura de specialitate în vederea aprofundării temei abordate. Activitatea de documentare a avut ca obiectiv stabilirea tipurilor de agenți infecțioși identificați la lilieci din zonele temperate. Pentru aceasta, s-a făcut o scurtă prezentare a *Datelor privind încadrarea sistematică a Chiropterelor* în care s-a pus accentul pe cele 3 familii de lilieci existente pe teritoriul României. Apoi s-au subliniat *particularitățile biologice, ecologice și etologice ale Chiropterelor rezidente pe teritoriul României și relevanța lor în epidemiologie*. Practic, în acest capitol s-a descris nișa ecologică și etologia diferitelor specii de lilieci, accentul s-a pus pe elemente cheie în epidemiologie: adaptarea la zbor și implicațiile fiziologice, migrarea prezentă la anumite specii, formarea coloniilor și tipul de colonii, hibernarea și modificările parametrilor morfo-funcționali. Toate elementele menționate pot avea un rol determinant în evoluția unei boli infecțioase. De asemenea, au fost cercetate *Date privind faunistica și distribuția Chiropterelor în România* unde s-au prezentat informații legate de statutul legal al acestor specii de animale. S-au evaluat nișa ecologică, habitatele folosite, plasticitatea anumitor specii privind adaptarea la zonele urbane și importanța ecologică a liliecilor dată de capacitatea acestora de a ține sub control populațiile de insecte. Au fost selectate din literatură *Zoonozele și boli infecțioase emergente asociate cu speciile de Chiroptere*, făcând trimitere exclusiv la acele entități morbide care au fost semnalate la specii de lilieci din zone temperate, lilieci care aparțin aceluiași genuri care sunt prezente și în România. Această triere a fost necesară întrucât în lume există peste 1100 specii de lilieci, fiecare cu patologia specifică asociată, în România există doar 32 specii, iar o mare parte din speciile virale cu potențial zoonotic identificate în reprezentanți ai ordinului *Chiroptera* au provenit de la megachiropterele din zonele tropicale. Tot în acest capitol s-a subliniat faptul că aceste animale rareori exprimă semne clinice în cazul unor boli infecțioase. *Rolul Chiropterelor ca rezervor al unor entități cu potențial zoonotic în Europa* aprofundează cazurile raportate în regiune. Întrucât o parte din lilieci prezenți pe teritoriul țării pot migra pe distanțe de până la 2000km, iar formarea coloniilor face parte din strategia de supraviețuire, s-au consultat raportările la nivel European privind prezența *Lyssavirusurilor*, a *Hendra* și *Nipavirusurilor*, a altor *Paramyxovirusuri* și a unor arboviroze. S-a investigat situația de la nivel național prin *Cercetări privind monitorizarea populațiilor de Chiroptere din România*, capitol în care s-a prezentat cadrul legislativ prin care sunt protejate aceste specii de mamifere și s-au identificat direcțiile de cercetare la nivel național ce au avut ca subiect *Chiropterele*. Majoritatea studiilor au fost axate pe acțiuni de conservare și ecologie, fiind menționate câteva studii care au

investigat hemoparaziții și prezența *Borrelia sl.* De asemenea, au fost *Prezentate speciile luate în studiu*, organizat, pe familii și genuri, unde s-au prezentat sumar detaliile esențiale pentru fiecare din cele 19 specii investigate pe durata studiului. Astfel, s-a menționat distribuția geografică a fiecărei specii și statusul acesteia. S-a pus accent pe tipul de adăpost preferat și pe ecologie, menționându-se strategia de vânătoare și nișa ecologică. Un alt detaliu important precizat pentru fiecare specie a fost reprezentat de colonii, întrucât s-au constatat mai multe variante în structura socială: de la indivizi solitari la colonii de mii de exemplare, colonii mixte cu alte specii sau colonii de maternitate etc. S-au identificat distanțele parcurse în căutarea hranei și respectiv în migrare, acolo unde era cazul, dar și longevitatea medie și maximă a liliecilor și potențialii prădători ai acestora (atât cei din mediul silvatic cât și cel din mediul urban). Pentru fiecare specie s-au selectat din literatură toate bolile care au fost semnalate. Pe baza acestor detalii s-a făcut o estimare a importanței epidemiologice la fiecare din cele 19 specii. În *analiza strategiei de prevenție și control a zoonozelor de origine infecțioasă în România* s-a discutat despre *Lyssavirusuri*, unde s-au menționat speciile de mamifere terestre dar, accentul a fost pus pe *Chiroptere*, la sfârșit fiind prezentat și cadrul legal privind acționarea în cazul suspiciunii/confirmării unui caz de rabie. De asemenea s-au prezentat *Flavivirusurile*, accentul punându-se pe virusul West Nile și pe virusul Encefalitei de Căpușă, unde s-a făcut trimitere la lilieci și cu menționarea cadrului legal de acțiune. Sub aceeași manieră etapizată au fost structurate prezentarea *Leptospirelor* și a *Paramyxovirusozelor*.

Partea a II^a reprezintă cercetările personale, iar fiecare capitol prezintă rezultatele obținute în urma efectuării studiilor retrospective și prospective, fiind dedicat unei anumite entități morbide. Prin realizarea studiilor epidemiologie s-a urmărit identificarea factorilor de risc asociați entităților morbide studiate într-un context de tip One Health, înscriindu-se în sfera preocupărilor existente pe plan mondial. Structura capitolelor este similară, fiind alcătuite din 3 părți în care se prezintă contextul cadru și situația epidemiologică specifică fiecărei entități, urmată de prezentarea materialelor și metodelor folosite în identificarea patologiei infecțioase, rezultate și discuții pe baza analizei probelor și concluziile. Metodologiile de diagnostic/ detecție utilizate au avut un grad de specificitate și sensibilitate ridicat pentru fiecare patogen în parte, iar rezultatele obținute au fost puse în context epidemiologic. Actualitatea și oportunitatea temei abordate este constă în obținerea de date care să fundamenteze măsuri adecvate cu impact pozitiv asupra sănătății *Chiropterelor*, a mediului și a populației expuse riscului. Concluziile și recomandările au fost bazate pe realitatea practică privind morbiditatea, mortalitatea și pierderea efectivelor de lilieci (specii protejate) și pe baza situației epidemiologice semnalată în medicina umană. Astfel s-au elaborat recomandări aplicabile pentru limitarea expunerii oamenilor la patogenii identificați și pentru protecția mediului, prin reducerea eliminării de agenți patogeni și

reducerea/limitarea circulației tulpinilor cu potențial patogen. În realizarea studiului s-au atins puncte critice în ceea ce privește patologia *Chiropterelor*, interesul pentru valorificarea rezultatelor fiind dat de statutul de animale protejate. Rezultatele au generat un volum important de informații utile mediului științific, informații ce au fost prezentate la manifestări științifice. Metodologiile elaborate în Partea aII^a și studiile de tip *One Health* au caracter de noutate pentru cercetarea în domeniu. Cercetările personale debutează prin *Caracterizarea teritoriilor cercetate și cadrul organizatoric*, unde sunt prezentate pe scurt coordonatele geografice ale principalelor zone studiate și criteriile de includere a acelor zone. De asemenea a fost proiectată și s-a realizat supravegherea în respectivele locații, dar au fost studiate și evenimentele particulare, înregistrate pe durata studiului. Pornind de la informațiile conform cărora 48% dintre românii din mediul urban dețin animale de companie, s-a realizat un *Studiu privind relația dinamică dintre lilieci, oameni și animalele de companie în contextul urban*. În acest studiu s-au urmărit mai multe aspecte: gradul de interacțiune al animalelor de companie (în mod particular pisici) cu fauna urbană, studiul arătând faptul că în România, anual populația de pisici atacă aproximativ 15.000.000 mamifere și 7.000.000 păsări, situație îngrijorătoare din punct de vedere al conservării speciilor dar și al riscului epidemiologic asociat interfeței animal de companie/ animal sălbatic. Acest studiu a urmărit și interacțiunile dintre lilieci și populația umană, fiind examinate solicitările de intervenție care au fost adresate diverselor platforme de conservare a speciilor. S-a prezentat și *Recoltarea de probe biologice și strategia de eșantionare*, folosită în perioada 2013-2018. Întrucât în studiul bibliografic realizat în Partea I a tezei s-a constatat incidența mică a patogenilor și paucitatea/ lipsa simptomatologiei clinice la *Chiroptere*, în prezentul studiu s-au recoltat 2 tipuri de probe biologice de la animale clinic sănătoase și pe de altă parte s-au recoltat probe de la carcasele intacte ale animalelor găsite în exitus. Au fost descrise *Materialele patologice, tehnici folosite și valoarea lor în diagnostic* menționându-se metoda de recoltare a probelor biologice, iar pentru fiecare tip de probă recoltată ce patogeni se pot identifica și tehnicile de detecție a acestor patogeni. De asemenea s-a menționat numărul minim de indivizi care trebuie testați pentru a satisface gradul de confidență propus. S-a realizat *Analiza aspectelor patologice identificate la Chiroptere*, capitol în care au fost descrise principalele leziuni constatate, din care au fost prezentate detaliat cele mai frecvent întâlnite : leziuni osteo-articulare, leziuni traumatice consecutive mușcăturilor, leziuni hemoragice, leziuni decelabile macroscopic ale sistemului nervos central și aspecte morfopatologice ale avortonilor. În continuare au fost prezentate datele referitoare la detecția unor virusuri cu potențial zoonotic, într-o manieră logică și etapizată. În cadrul capitolului intitulat *Investigații epidemiologice privind prezența Lyssavirusurilor în populațiile de Chiroptere rezidente pe teritoriul României* s-a realizat un *Studiu retrospectiv și descriptiv al factorilor de risc asociați cu transmiterea*

Lyssavirusurilor în care s-au colectat date pe o perioadă de 5 ani în care au fost evaluate incidența și factorii de risc ai infecției cu *Lyssavirusuri* și prezența acestui patogen în populațiile umane și animale. Acest studiu a fost succedat de un studiu prospectiv intitulat *Strategie de detecție a Lyssavirusurilor la Chiroptere, materiale și metode* unde au fost prezentate materialele și metodele folosite pentru *Detecția prezenței anticorpilor anti-rabici prin testul de virusneutralizare cu anticorpi fluorescenți*, *Detecția prezenței Lyssavirusurilor prin tehnica de imunofluorescență directă* și *Detecția prezenței Lyssavirusurilor folosind metode in vitro de izolare și cultivare pe culturi celulare*. De asemenea s-a încercat *Detecția prezenței Lyssavirusurilor la Chiroptere folosind tehnici de epidemiologie moleculară*, pentru aceasta a fost folosit un protocol de extracție a acizilor nucleici totali din probe de substanță nervoasă (sistem nervos central) și un protocol de extracție din probe de salivă. S-a prezentat protocolul de evaluare a concentrației materialului genetic extras, pentru a determina existența contaminărilor și pentru a evidenția cantitatea de material genetic extrasă. S-a realizat *reacția de amplificare a materialului genetic pentru detecția unui fragment specific genomului Lyssavirusului* unde s-au descris materialele și metodele necesare mixului, cuplării acestuia, amplificării și electroforezom cu prezentarea modului de calcul al rezultatelor și modul de exprimare. În capitolul *Rezultate și discuții privind prezența Lyssavirusurilor în populațiile de Chiroptere* s-a detaliat prezența speciilor examinate și numărul acestora, tipul de probe și tipul de teste realizat pe fiecare probă. În ansamblu s-a testat prin tehnica PCR un număr de 493 probe individuale de encefal provenite de la 19 specii diferite de lilieci, de asemenea s-a executat 493 teste de imunofluorescență directă din aceleași probe. S-au mai examinat un număr de 453 probe de salivă prin tehnica PCR și prin RTCIT, probele de salivă fiind recoltate de la indivizi din specia *N. noctula* care au fost ținuti în carantină și reabilitați. De la indivizii ținuti în carantină s-au mai examinat 90 de probe de ser prin tehnica FAVN, fiecare individ fiind testat prin cel puțin 2 metode de diagnostic. Cu toate acestea, nu s-a putut detecta prezența virusului rabic sau a anticorpilor anti-rabici la niciunul din cei aproximativ 1000 indivizi testați. În capitolul *Investigații epidemiologice privind prezența Paramyxovirusurilor în populațiile de Chiroptere rezidente pe teritoriul României* s-a realizat investigarea prezenței *Paramyxovirusurilor* printr-un studiu bivalent care cuprinde: un studiu retrospectiv și un studiu prospectiv. Au fost colectate date privind incidența și factorii de risc asociați cu diferiți reprezentanți ai acestei familii virale de interes pentru medicina umană și cea veterinară. Astfel s-a conturat *Studiu retrospectiv și descriptiv al factorilor de risc asociați cu transmiterea Paramyxovirusurilor*. Studiul prospectiv a constatat în *Detecția prezenței Paramyxovirusurilor la Chiroptere folosind tehnici de biologie moleculară*. Pentru aceasta s-a prezentat protocolul de *extracție a acizilor nucleici din probe de splină pentru detecția Paramyxovirusurilor* și evaluarea concentrației materialului genetic extras. Tehnica *reacției de*

*amplificare a materialului genetic în vederea detecției unui fragment specific pentru Paramyxovirusuri a trebuit optimizată. A fost descrisă Optimizarea temperaturii de hibridizare în care s-au tatonat 21 de tipuri de protocoale de amplificare pentru a găsi acei parametri de temperatură ce permit cuplarea specifică a primerilor și s-a prezentat analiza electroforezei, calculul rezultatelor și modul de exprimare al acestora. În ceea ce privesc rezultatele și discuțiile privind prezența Paramyxovirusurilor în populațiile de Chiroptere, în urma analizării prin tehnica PCR a 493 de probe de indivizi provenind de la 19 specii diferite, s-au constatat 12 reacții pozitive la indivizi testați prin PCR care au relevat produși de amplificare specifici cu dimensiuni de aproximativ 500pb. Probele pozitive au provenit de la următoarele specii: *N. noctula* (n=9), *P. kuhlii* (n=1), *P. pipistrellus* (n=1) și *M. daubentonii* (n=1). La examenul necropsic nu au fost constatate modificări decelabile macroscopic la indivizii care au furnizat rezultate pozitive, sugerând un statut de infecție persistentă asimptomatică. Liliicii identificați ca fiind pozitivi au provenit din: Baia Mare, Constanța, București, Brașov. Relația dinamică între lilieci-oameni-animale de companie poate crea premisele unui fenomen de tip spill-over dată fiind rata de contact dintre aceste specii. În ceea ce privesc Investigațiile epidemiologice privind prezența Flavivirusurilor în populațiile de Chiroptere, în urma Studiului retrospectiv și descriptiv al factorilor de risc asociați cu transmiterea Flavivirusurilor s-a constatat o corelație între numărul de cazuri din populația umană și numărul de cazuri din populațiile animale. De asemenea caracterul sezonier al bolii și prezența diferitelor specii de *Culicidae* capabile să transmită virusul s-a reflectat și în factorul ocupațional al indivizilor infectați (activități desfășurate în aer liber). Detecția prezenței Flavivirusurilor folosind tehnici de biologie moleculară s-a realizat folosind aceeași etapizare succesivă: extracția acizilor nucleici din probe de encefal și evaluarea concentrației și contaminării materialului genetic extras, urmată de reacția de amplificare a materialului genetic în vederea detecției unui fragment specific pentru Flavivirusuri. Rezultatele și discuțiile privind prezența Flavivirusurilor în populația de Chiroptere au scos în evidență faptul că, deși toți liliicii examinați sunt insectivori iar din dieta lor fac parte specii de *Culicidae* capabile să găzduiască arbovirusuri (în aceeași măsură aceleași insecte pot parazita liliicii), nu s-a identificat niciun individ pozitiv din cei 483 examinați prin tehnica PCR. Lipsa genomului viral din probele de encefal atestă faptul că indivizii nu au fost viremici la momentul testării. Măsura în care aceștia au intrat sau nu în contact cu virusul West Nile este încă necunoscută, întrucât nu s-au putut realiza investigații serologice. În continuare au fost prezentate date privind detecția unor bacterii cu potențial zoonotic, prin Investigații epidemiologice privind prezența Leptospirelor în populațiile de Chiroptere. S-a folosit aceeași structură prezentată anterior printr-un Studiu retrospectiv și descriptiv al factorilor de risc asociați cu transmiterea Leptospirelor, efectuat pe o perioadă de 5 ani, în care s-au examinat*

incidența și factorii de risc asociați acestei boli infecțioase. S-a constatat caracterul profesional al bolii dar și incidența maximă în lunile august/septembrie. Pentru *deteția prezenței infecției leptospirice la Chiroptere folosind tehnici de epidemiologie moleculară* s-a recurs la extracția acizilor nucleici totali din probe de rinichi pentru indivizii găsiți în stare de exitus și respectiv din probe de urină pentru indivizii din centrele de reabilitare, iar după extracție s-a aplicat protocolul de evaluare a concentrației de material genetic extras. *Reacția de amplificare a materialului genetic în vederea detecției unui fragment specific pentru Leptospire patogene* a discriminat între acestea și alte spirochete înrudite care ar putea da reacții fals pozitive. S-au examinat prin tehnica PCR probe de rinichi provenind de la 16 specii din familiile: *Vespertilionidae* (n=483 indivizi), *Rhinolophidae* (n=6 indivizi) și *Miniopteridae* (n=2 indivizi). În urma *rezultatelor și discuțiilor privind prezența infecției leptospirice în populațiile de Chiroptere*, în România, s-a identificat prezența fragmentului genomic specific leptospirelor patogene la 4 specii de lilieci: *N. noctula*, *P. pipistrellus*, *P. nathusii*, *M. daubentonii*. S-a identificat infecție leptospirică activă prin prezența spirochetelor în urina a 15 subiecți provenind din București, Iași și Babadag, zone în care infecțiile leptospirice la oameni au fost frecvent raportate pe perioada studiului. *Concluziile generale și recomandările*: din cunoștințele noastre, aceasta este prima raportare a prezenței infecției leptospirice la specia *P. nathusii* și prima raportare la 3 specii de lilieci rezidente pe teritoriul Europei continentale (*N. noctula*, *P. pipistrellus*, *M. daubentonii*). Măsurile de supraveghere în zonele endemice pentru *Leptospira interrogans* ar trebui să considere și animalele sălbatice, iar liliecii testați contra virusului rabic ar trebui investigați și pentru prezența leptospirei *interrogans*. Din cunoștințele noastre, aceasta este prima investigație la nivel național asupra microorganismelor patogene/ bolilor infecțioase prezente la lilieci și potențialul zoonotic al acestora într-o abordare multidisciplinară de tipul *One Health*. Deși cazurile raportate la lilieci s-au semnalat în zone unde au fost înregistrate cazuri și la oameni, chiar dacă folosesc adăposturi antropice, dată fiind inaccesibilitatea acestor specii, importanța epidemiologică a liliecilor este subestimată, nefiind evidentă în transmiterea directă, la oameni, a microorganismelor pe care aceștia le găzduiesc. Prevalența mică în rândul indivizilor din Babadag sugerează mai degrabă un fenomen accidental, probabil o sursă de apă contaminată. O măsură de profilaxie în acest caz este reprezentată de mănuși de protecție și igiena corespunzătoare în urma interacțiunii cu aceste animale. Măsurile luate pentru cele două colonii identificate ca pozitive au fost ținerea în carantină, tratarea cu antibiotice și relocarea indivizilor. Această abordare este atât ecologică cât și etică, contribuind la conservarea speciilor de lilieci. Plasticitatea liliecilor în ceea ce privește adăposturile permit relocarea cu succes a acelor colonii sau indivizi care reprezintă un risc epidemiologic, pentru relocare se poate alege orice loc, natural sau artificial, care satisface cerințele lor biologice.