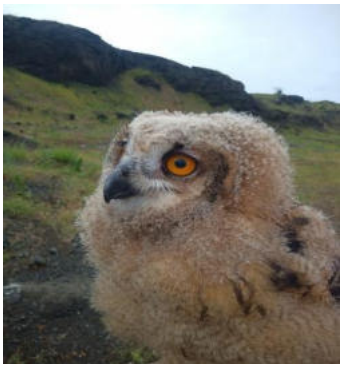
Primul raport ştiinţific - AOȘR-TEAMS-IV, Proiect nr. 443/15.03.2025

Titlu: Transmiterea vectorilor și a patogenilor prin speciile migratoare de păsări şi lilieci
Instituția: Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca
Conducător de proiect: Dr. Corduneanu Alexandra, PhD
Perioada de raportare: Martie - Iulie 2025
Cod proiect: 443/15.03.2025
Program: Programul de cercetare în domeniul științei și inovării în domeniul științei și inovării: AOȘR-TEAMS-IV, Ediția 2025-2026 - „Transformarea digitală în științe”

Poză originală - *Miniopterus schreribersii*


Poză originală – *Bubo bubo*

1. Prezentare generală a proiectului

Acest proiect explorează rolul păsărilor migratoare și al liliecilor în răspândirea ectoparaziţilor și a agenților patogeni zoonotici asociați acestora în regiuni geografice extinse. În calitate de vertebrate foarte mobile, aceste specii pot transporta o serie de ectoparaziți - inclusiv căpușe, purici, ploșniţe, acarieni și muște de liliac - care sunt potențiali vectori pentru bacterii cu relevanță semnificativă pentru sănătatea publică și veterinară. Printr-o combinație de eșantionare pe teren și diagnostic molecular, proiectul urmărește detectarea principalilor agenți patogeni vectoriali (exemplu: *Borrelia*, *Bartonella*) la lilieci, ectoparaziții acestora și căpușe colectate de la păsări.

Proiectul, intitulat „ Transmiterea vectorilor și a patogenilor prin speciile migratoare de păsări şi lilieci, reprezintă o continuare a obiectivului de cercetare pe termen lung a conducătorului de proiect. După ce și-a finalizat studiile doctorale și postdoctorale cu privire la agenții patogeni transmiși de vectori la lilieci, aceasta rămâne activ angajată în acest domeniu, având planificate lucrări viitoare dincolo de proiectul actual. Colectarea probelor, majoritatea procedurilor de laborator și analizele computaționale au fost şi vor fi efectuate de șeful de proiect și de membrul echipei sale. Rezultatele finale vor fi publicate în reviste indexate ISI.

2. Obiective abordate

Pentru această etapă a proiectului, au fost abordate două obiective principale menționate în propunere (vezi mai jos), iar analizele au fost inițiate pentru detectarea agenților patogeni în probele de păsări, lilieci și ectoparaziții acestora.

O1. Analiza impactului schimbărilor climatice asupra distribuției bolilor zoonotice este esențială, deoarece creșterea temperaturilor și modificările ecologice influențează direct distribuția vectorilor și a agenților patogeni. Înțelegerea acestor schimbări este crucială pentru dezvoltarea unor strategii eficiente de control și prevenire.

O2. Investigarea rolului gazdelor vertebrate mobile, precum păsările migratoare și liliecii, în răspândirea vectorilor și a patogenilor zoonotici este esențială, deoarece aceste specii transportă ectoparaziți și agenți patogeni peste granițe geografice considerabile. Studierea acestui proces permite detectarea timpurie a bolilor emergente și contribuie la prevenirea răspândirii acestora.

3. Activități de teren

Probele au fost, în general, colectate simultan atât de la păsări, cât și de la lilieci; cu toate acestea, vor fi necesare deplasări suplimentare pe teren pentru a îndeplini obiectivele actuale și pentru a continua cu cele viitoare.

În faza inițială a proiectului, probele de sânge și ectoparaziți colectaţi de la lilieci – inclusiv căpușe, muște, ploşniţe, purici și acarieni – precum și ectoparaziții proveniți de la păsări (căpușe), au fost testate pentru diverși agenți patogeni transmiși prin vectori. Probele de purici de la lilieci au fost deja analizate, în timp ce restul probelor – inclusiv sânge, căpușe, ploşniţe, muște și acarieni – urmează să fie testate pentru prezența bacteriilor *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. și *Borrelia* spp. Probele de căpușe recoltate de la păsări au fost analizate pentru Anaplasmataceae, *Babesia* spp., *Coxiella burnetii*, *Hepatozoon* spp. și *Rickettsia* spp. Activitățile desfășurate pentru atingerea primelor două obiective (O1 și O2) sunt următoarele:

3.1 Colectarea ectoparaziților

Probele de la lilieci au fost colectate din mai multe locații din România, inclusiv Ineu,

Betfia, Baziaș, Gura Dobrogei, Canaraua Fetii (Figura 1), în timp ce căpușele de la păsări au fost colectate din România (Cluj, Agigea) și Bulgaria (Burgas) (Figura 2). Liliecii au fost capturați folosind plase și capcane harpă (Figura 3). Fiecare individ a fost identificat la nivel de specie, iar pentru fiecare exemplar s-au înregistrat date precum vârsta, sexul, lungimea antebrațului și greutatea corporală, fiind de asemenea recoltat sângele (Figura 4). Ectoparaziții – respectiv căpușe (Ixodoidea: Ixodidae), muște ale liliecilor (Diptera: Nycteribiidae) și purici (Siphonaptera: Ischnopsyllidae) – au fost conservați în alcool 70% pentru identificare morfologică ulterioară și extracție de ADN. Căpușele de la păsări au fost îndepărtate manual cu ajutorul unei pensete și conservate, la fel, în alcool 70% până la identificarea morfologică și extracția ADN-ului. Fiecare pasăre a fost identificată la nivel de specie, fiind înregistrate și informații privind vârsta și sexul.

Figura 1 Locaţiile pentru colectarea probelor de la lilieci

Figura 2 Locaţiile pentru colectarea probelor de la păsări

Figura 3 Capturarea liliecilor (fotografie originală)

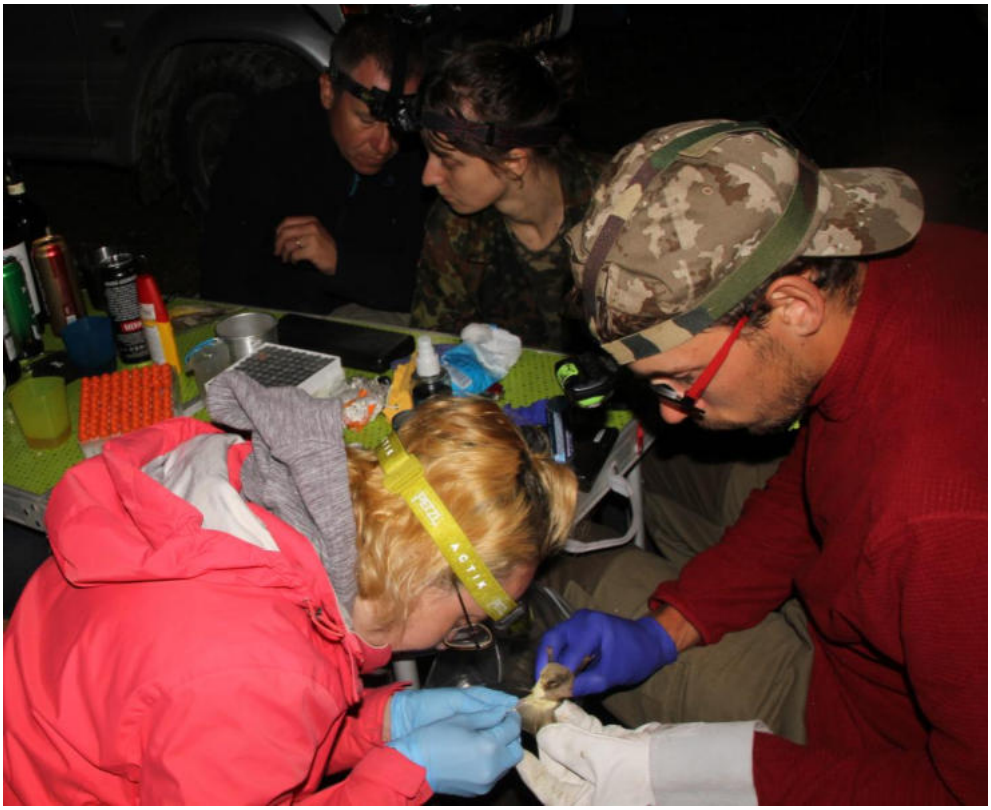


Figura 4 Colectarea sângelui de la lilieci (fotografie originală)

4. Analize de laborator

4.1 Identificare morfologică și extracție de ADN

Înainte de extracția ADN-ului, toți ectoparaziții au fost identificați morfologic (Figura 5 și 6) folosind chei taxonomice, sub un microscop Olympus Bx51, dotat cu cameră digitală DP72 și software-ul CellF (Olympus Corporation, Tokyo, Japonia). Fiecare exemplar a fost apoi secționat în jumătate pentru extracția ADN-ului.

ADN-ul total a fost extras din ectoparaziți folosind kitul QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Germania), conform instrucțiunilor producătorului. ADN-ul total din sângele liliecilor a fost extras utilizând kitul DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germania), conform instrucțiunilor producătorului. Toate probele au fost stocate la -20°C până la realizarea analizelor ulterioare.

Figura 5. Identificarea ectoparaziților de la lilieci (fotografie originală)

Figura 6. Identificarea căpușelor de la păsări (fotografie originală)

4.2 Tehnici moleculare

Au fost aplicate protocoale moleculare distincte, care vizează gene specifice, pentru detectarea a trei agenți patogeni bacterieni în probele de purici de la lilieci, precum și a cinci agenți patogeni transmisibili prin vectori în căpușele colectate de la păsări (vezi Tabelul 1 la finalul raportului). Probele pozitive (așa cum este ilustrat în Figura 7) au fost purificate și trimise către Macrogen (Macrogen Europe, Amsterdam, Olanda) pentru secvențiere. Secvențele vor fi ulterior analizate și asamblate utilizând software-ul BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, SUA).

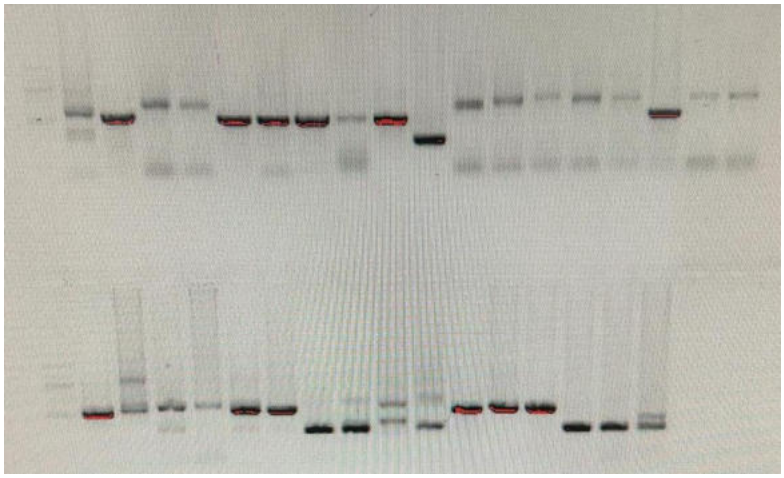


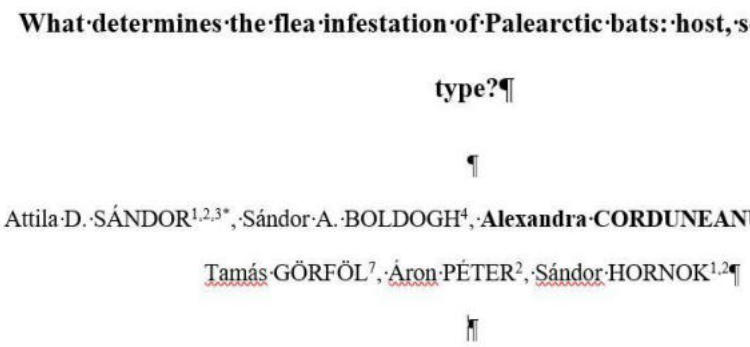
Figura 7. Probe pozitive pentru *Babesia spp.* (primul rând) și *Hepatozoon spp.* (al doilea rând) din căpușe colectate de la păsări (fotografie originală)

5. Rezultate preliminare

Un total de 60 de probe de sânge și 240 de ectoparaziți au fost colectate de la lilieci, incluzând 10 căpușe, 10 muște, 10 purici și 10 acarieni. Pentru fiecare liliac inclus în studiu s-au prelevat atât sânge, cât și toți ectoparaziții disponibili; indivizii care nu prezentau un set complet de ectoparaziți au fost excluși din analiză. Dintre cele trei bacterii patogene investigate (*Bartonella spp.*, *Rickettsia spp.* și *Borrelia spp.*), doar *Bartonella spp.* a fost detectată, cu o rată de pozitivitate de 40% (4/10) în probele de purici. Probele pozitive au fost trimise pentru secvențiere.

De la păsări, 240 de probe de ectoparaziți (căpușe) au fost analizate pentru cinci agenți patogeni: *Anaplasmataceae*, *Babesia spp.*, *Coxiella burnetii*, *Hepatozoon spp.* și *Rickettsia spp.* Rezultatele au arătat: 8 probe pozitive pentru *Anaplasmataceae* (3,33%), 14 pentru

Babesia spp. (8,83%), nici una pentru *Coxiella burnetii*, 21 pentru *Hepatozoon spp.* (8,75%) și 3 pentru *Rickettsia spp.* (1,25%). Toate probele pozitive au fost transmise pentru secvențiere. În prezent este în curs redactarea unei versiuni preliminare a unui articol privind prezența agenților patogeni vectoriali (VBPs) în căpușele recoltate de la păsări (Figura 8).



What·determines·the·flea·infestation·of·Palearctic·bats:·host,·season·or·roost·type?¶

¶

Attila·D.·SÁNDOR[1,2,3*],·Sándor·A.·BOLDOGH[4],·**Alexandra·CORDUNEANU**[5],·Péter·ESTÓK[6],·Tamás·GÖRFÖL[7],·Áron·PÉTER[2],·Sándor·HORNOK[1,2]¶

¶

Figura 8. Titlu a primului articol

6. Limitări și provocări

- Accesul la unele situri de recoltare a fost restricționat de condițiile meteo și de reglementările de conservare
- Unele grupuri de ectoparaziți (de ex. ploşniţe, acarieni) necesită încă verificare taxonomică
- Este necesară secvențiere suplimentară pentru confirmarea identității agenților patogeni

7. Planuri viitoare

- Finalizarea testării ADN pentru ectoparaziții colectați până în prezent
- Începerea comparației sezoniere prin noi ieșiri de teren în toamna 2025
- Trimiterea secvențelor preliminare pentru analiza BLAST și filogenetică
- Integrarea abordării One Health pentru interpretarea interacțiunilor vector–agent patogen–gazdă

Director proiect,

Dr. Corduneanu Alexandra, Ph.D.

Tabel 1. Secvențe de oligonucleotide și parametrii ciclurilor PCR pentru identificarea agenților patogeni

Tip PCR	Patogenul testat	Gena testată (mărime amplicon)	Amorse (5'-3')	Denaturare inițială	Cicluri denaturare	Ciclu antrenare	Ciclu extindere	Extindere finală	Ciclu (n=)
cPCR	**Anaplasmataceae**	16S rRNA (345 bp) (Parola et al., 2000)	**EHR16SD** (GGTACCYACAGAAGAAGTCC) **EHR16SR** (TAGCACTCATCGTTTACAGC)	95°C, 5 m	94°C, 30 s	45°C, 30 s	72°C, 30s	72°C, 5 m	35
nPCR	***Babesia* spp.**	18S rRNA (561 bp)	**BTH-1F** (CCTGAGAAACGGCTACCACATCT) **BTH-1R** (TTGCGACCATACTCCCCCCA)	95°C, 3 m	95°C, 30 s	60°C, 30 s	72°C, 1 min	72°C, 7 m	40
		18S rRNA (561 bp)	**GF2** (GTCTTGTAATTGGAATGATGG) **GR2** (CCAAAGACTTTGATTTCTCTC)	95°C, 3 m	95°C, 30 s	50°C, 30 s	72°C, 40 s	72°C, 7 m	40
cPCR	***Bartonella* spp.**	ITS (600 bp) (Dinz et al., 2007)	**325s** (CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG) **1100as** (GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGA)	95°C, 3 m	95°C, 30s	66°C, 30 s	72°C, 30s	72°C, 5 m	55
cPCR	***Borrelia* spp.**	ITS (350 bp)	**5SB** (CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC) **23SB** (AGCTCTTATTCGCTGATGGTA)	94°C, 15 m	94°C, 30 s/ 94°C, 20 s	70°C,30s/ 60°C,30s	72°C, 30s	72°C, 5 m	40
nPCR	***Hepatozoon* spp.**	18S rRNA (1700 bp)	**HAM1F** (GCCAGTAGTCATATGCTTGTC) **HPF-2R** (GACTTCTCCTTCGTCTAAG)	95°C, 1 m	95°C, 15 s	55°C, 15 s	72°C, 30 s	72°C, 5 m	35
		18S rRNA (1600 bp) (Hrazdilova et al., 2021)	**EF_M** (AAAACTGCAAATGGCTCATT) **Hep1615R** (AAAGGGCAGGGACGTAATC)	95°C, 1 m	95°C, 15 s	55°C, 15 s	72°C, 30 s	72°C, 5 m	35
cPCR	**Rickettsiaceae**	*glt*A (381 bp) (Regnery et al., 1991)	**RpCS.877p** (GGGGGCCTGCTCACGGCGG) **RpCS.1258n** (ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA)	95°C, 2 m	95°C, 30 s	58°C, 30 s	72°C, 30s	72°C, 2 m	35