

REZUMAT

Cuvinte cheie: *arboviroze, zoonoze, sero-neutralizare, High-Throughput Real-Time PCR*

Prezenta lucrare de doctorat, intitulată „**Arboviroze cu caracter zoonotic transmise de țânțari în România**”, este structurată, conform normelor în vigoare, în două părți principale: **prima parte**, reprezentată de „Stadiul actual al cunoașterii”, ce condensează informații actualizate din literatura de specialitate privind tema abordată și **partea a II-a**, respectiv cea de „Contribuții personale”, în care sunt descrise metodele de lucru și rezultatele obținute ca urmare a cercetărilor întreprinse pe parcursul perioadei de studii doctorale.

Prima parte, „*Stadiul actual al cunoașterii*”, structurată în trei capitole, cuprinde o sistematizare succintă a informațiilor extrase din literatura de specialitate cu privire la principalele arbovirusuri, manifestările clinice la om și animale, principalele insecte cu rol de vectori și capacitatea vectorială a acestora, cu factorii implicați în transmiterea agenților patogeni pe cale vectorială.

Primul capitol, cu titlul „*Principalele arbovirusuri zoonotice cu potențial de urgență și re-urgență în România*” descrie, așa cum reiese din titlu, principalele familii și genuri virale ce includ virusuri a căror transmitere implică participarea unei insecte hematofage. Pe lângă acestea, mai sunt redată sindroamele clinice asociate infecției cu virusurile menționate, la om și animale. Principalele familii virale descrise în acest capitol sunt reprezentate de familia *Flaviviridae*, cu virusurile West Nile, Usutu și virusul encefalitei de căpușă, familia *Togaviridae*, cu virusul Sindbis și familia *Peribunyaviridae*, cu virusul Tahyna.

În ceea ce privește principalele specii de țânțari implicate în transmiterea virusurilor descrise anterior, cel de **al doilea capitol**, denumit „*Principalele specii de culicide cu rol în transmiterea agenților patogeni la animale și oameni în România*”, descrie specii indigene și invazive, ce se regăsesc în țara noastră. Din cele 55 de specii de țânțari recunoscute ca native pentru România, în acest capitol sunt redată speciile: *Culex pipiens*, cu cele două bioforme, *Culex modestus*, *Aedes vexans* și specia invazivă *Aedes albopictus*.

Capitolul III, intitulat „*Capacitatea vectorială a țânțarilor*”, pune accentul pe capacitatea vectorială și vector-competență, aspecte cheie pentru a înțelege transmiterea patogenilor.

Cea de-a doua parte a tezei, „**Contribuții personale**”, este structurată în cinci capitole (IV–VIII), în fiecare fiind prezentate metodele de lucru abordate, rezultatele obținute în cursul perioadei de studii doctorale și concluziile rezultate din prelucrarea informațiilor expuse.

Capitolele IV și V, respectiv „*Scopul și obiectivele cercetărilor*” și „*Descrierea cadrului organizatoric și instituțional în care s-au desfășurat cercetările*”, descriu succint scopul și obiectivele urmărite precum și locul de desfășurare a activităților necesare realizării obiectivelor propuse.

Astfel, prezenta lucrare a rezultat ca urmare a implementării unui studiu de supraveghere în zona de est a țării. Acțiunea de supraveghere a fost centrată pe trei aspecte majore implicate în ciclul de viață arboviral: (i) comunitățile de țânțari; (ii) detecția și caracterizarea arbovirusurilor prezente în țânțarii capturați; (iii) supravegherea serologică activă a speciilor receptive.

Capitolul VI, intitulat „*Investigații serologice privind principalele infecții transmise de țânțari la om și animale*”, este structurat la rândul său în patru subcapitole. Divizarea în subcapitole denotă abordarea amplă a subiectului și a speciilor receptive vizate, ce reprezintă verigi esențiale în circuitul de transmitere și menținere a arbovirusurilor în natură. Astfel, investigațiile serologice au urmărit detecția și prevalența anticorpilor specifici în probe de ser provenite de la cai, păsări, câini și oameni din zona de est a României.

Prima anchetă sero-epidemiologică a urmărit detecția anticorpilor împotriva virusurilor West Nile, Usutu și encefalitei de căpușă, în probe de ser de la cai clinic sănătoși, în 14 locații din trei județe. Astfel, probele testate au provenit din județele Iași (n = 118), Vaslui (n = 208) și Tulcea (n = 28) și au fost recoltate concomitent cu eșantioanele destinate testării pentru anemia infecțioasă ecvină, în perioada februarie - aprilie și în lunile mai și iulie. Datele individuale ale animalelor incluse în studiu au fost obținute de la aparținători și au fost sistematizate în două variabile: categorie de vârstă și sex.

Testarea serologică a celor 354 de probe s-a realizat, într-o primă etapă, prin tehnica imunoenzimatică (ELISA) pentru detecția IgG, utilizând *kit*-ul comercial ID-Screen West Nile Competition (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franța). Ulterior, probele pozitive au fost retestate, pentru confirmare, prin tehnica de seroneutralizare. Tehnicile de lucru s-au realizat conform protocoalelor interne ale ANSES, Franța.

Rezultatele primei testări serologice a relevat o prevalență a anticorpilor anti-VWN de 46,6%, respectiv 165 de probe pozitive. În ceea ce privește variabilele considerate, s-a observat că ponderea cea mai mare a corespuns categoriei de vârstă „adult” (5 - 14 ani), în timp ce între sexe nu au fost diferențe notabile. Pentru a exclude rezultatele fals pozitive, ca urmare a reacțiilor serologice încrucișate cu alte flavivirusuri, probele pozitive și cele dubioase prin tehnica ELISA au fost retestate prin tehnica de virus micro-neutralizare (MNT). Astfel, anticorpii neutralizanți anti-VWN au fost detectați în 136 din cele 168 de probe retestate, ceea ce reprezintă o seroprevalență cumulată de 38,4 % (136/354).

Ca urmare a testării prin tehnica de micro-neutralizare, au fost depistate patru probe pozitive atât pentru VWN cât și pentru VUSU. Întrucât condiția pentru ca anticorpii specifici să fie atribuiți unui anumit virus este ca un virus să aibă titrul anticorpilor de patru ori mai mare decât al celui de-al doilea, cele patru probe au fost considerate pozitive doar pentru VWN.

În ceea ce privește detecția anticorpilor neutralizanți împotriva virusului encefalitei transmise de căpușe, aceștia nu au fost detectați în nici una din probele de ser testate.

Cea de-a doua anchetă serologică a urmărit detecția anticorpilor IgG în probe de ser provenite de la păsări sălbatice din patru locații diferite din Rezervația Biosferei Delta Dunării (DDBR), respectiv din Caraorman, Furtuna, Murighiol și Sălcioara. Păsărilor capturate li s-au stabilit statusul: migrator sau rezident, precum și categoria de vârstă: tineret sau adult. Pentru realizarea scopului, în mod etapizat s-au recoltat 68 probe din cele patru locuri menționate anterior. Probele au fost testate utilizând *kit*-ul comercial ID Screen® West Nile Competition Multi species (IDVet, Grabels, Franța) pentru detecția anticorpilor anti-VWN, respectându-se instrucțiunile menționate de producător.

Din cele 68 de păsări sălbatice, 22 au fost încadrate în categoria „tineret” (eclozate în sezonul 2016) iar 46 au în categoria „adult”. În ceea ce privește păsările adulte, 12 au fost femele și 14 masculi iar pentru alte 20 de păsări sexul nu a fost determinat.

În urma testării prin tehnica ELISA de competiție, prezența anticorpilor specifici anti-VWN a fost evidențiată la opt păsări sălbatice din totalul de 68 testate (11,8%, CI95% = 11,5% -12,1%). Seroneutralizarea în vederea confirmării probelor pozitive a fost efectuată pe 51 de probe din două locații, în timp ce pentru 17 probe cantitatea inițială de ser nu a permis alte testări ulterioare. Astfel, din totalul probelor testate pentru detecția anticorpilor neutralizanți anti-VWN, șase probe au fost confirmate [11,8%, CI95% =2,92%-20,61%]).

Cea de-a treia anchetă sero-epidemiologică a cuprins probe recoltate de la câini cu diferite afecțiuni sau clinic sănătoși, din șase județe din partea de est a țării. Pentru realizarea obiectivului propus, s-au recoltat 363 de probe de la câini din padocuri, gospodării private și clinici veterinare, din județele: Suceava (n = 12), Iași (n = 237), Bacău (n = 24), Brăila (n = 16), Galați (n = 53) și Tulcea (n = 21).

Deteția anticorpilor specifici (IgG) anti-VWN s-a realizat etapizat, prin tehnica ELISA de competiție, utilizând două kit-uri pentru uz veterinar, *ready-to-use*, ambele fiind comerciale: ID-Screen West Nile Competition (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franța) și Ingezim WNV Compaq kit (Ingenasa).

În prima etapă, 179 de probe au fost testate serologic prin tehnica imunoenzimatică ELISA, utilizând kit-ul comercial ID-Screen West Nile Competition (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franța), urmărind protocolul de lucru derivat din instrucțiunile furnizorului. În cea de-a doua etapă, au fost testate 184 probe recoltate în timpul consultațiilor oferite în clinicile FMV Iași și din gospodăriile private din Iași și Făurei (Brăila), utilizând kit-ul comercial INGEZIM West Nile COMPAC (Ingenasa, Madrid, Spania).

În funcție de disponibilitatea datelor individuale, s-au luat în considerare ca variabile: genul animalului, vârsta, talia și gradul de expunere.

Ca urmare a testării celor 179 de probe, în cursul primei etape, anticorpii specifici anti-VWN au fost detectați în 79 de probe [(44,1%) 95% CI 36,86-51,41] iar în cea de-a doua etapă, în urma testării a 184 de probe, s-a obținut o prevalență a anticorpilor specifici anti-VWN de 51% [(94/184) 95% CI 43,86-58,31].

În vederea verificării sensibilității și specificității testului utilizat, cele 94 de probe pozitive rezultate în urma testării în cadrul celei de-a doua etape au fost retestate prin tehnica de competiție, utilizând kit-ul ID Screen WNV Competition. Astfel, din cele 94 de probe pozitive, în funcție de cantitatea de ser disponibilă, au fost reanalizate 86 de probe, obținându-se un grad de fidelitate și o pozitivitate de 100% între cele două kit-uri.

Pentru a reduce erorile date de valorile intrinseci ale celor două teste de depistare folosite și pentru a avea importanță statistică în vederea stabilirii unei seroprevalențe globale, s-au considerat doar rezultatele obținute ca urmare a testării utilizând kit-ul ID Screen WNV Competition. Astfel, din totalul de 363 de probe testate, anticorpii specifici virusului WN și altor flavivirusuri înrudite antigenic au fost detectați în 165 de probe (79 din prima etapă și 86 confirmate ca urmare a celei de-a doua analize), cu o seroprevalență cumulată de 45,5 % (95% CI: 40,33 - 50,58).

Probele seropozitive rezultate în urma testării prin tehnica imunoenzimatică ELISA au fost retestate prin tehnica de micro-virus neutralizare (MNT), pentru deția anticorpilor neutralizanți specifici pentru virusurile West Nile, Usutu și virusul encefalitei de căpușă. Astfel, în scopul confirmării seropozitivității și dependent de cantitatea de ser din probă disponibilă, au fost testate 161 din cele 165 pozitive la ELISA.

Prin tehnica de micro-virus neutralizare, anticorpi specifici neutralizanți împotriva VWN au fost detectați în 131 din 363 de probe, anticorpi neutralizanți anti-VUSU (titrul anticorpilor 160) la o singură probă iar pentru TBEV în nicio probă.

Apariția simultană a anticorpilor anti-VWN și anti-VUSU a fost observată la 10,3% din probe (17/165), la 16 dintre acestea titrul anticorpilor neutralizanți specifici anti-VWN fiind semnificativ mai mare, comparativ cu cel al anticorpilor specifici virusului Usutu.

Ultima etapă a investigațiilor serologice a urmărit deția anticorpilor IgG și IgM împotriva virusului West Nile și a IgG pentru virusul Usutu la om.

În vederea stabilirii prevalenței anticorpilor la oameni, s-au analizat probe recoltate în două etape (2015 și 2019) de la pacienți ai Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" din Iași. Pacienții, care și-au dat acordul pentru prelevarea probelor, au completat un chestionar menit să colecteze informații demografice, clinice precum și locul de proveniență.

Ca urmare a analizării celor 176 de probe de ser de la oameni recoltate în anii 2015 și 2019, s-a putut detecta o prevalență a anticorpilor specifici anti-VWN (IgG) de 3,4% (6/176).

În urma testării pentru detecția IgM anti-VWN a celor 88 de probe recoltate în anul 2019, a rezultat o seroprevalență de 9,1% (8/88).

În ceea ce privește detecția anticorpilor anti-VUSU (IgG) la oameni, în nici una din cele 88 de probe recoltate în 2019 nu s-au depistat *markeri* specifici. Astfel, nici o probă nu a fost pozitivă pentru infecția cu VUSU la oameni.

Capitolul VII, intitulat „*Identificarea agenților patogeni de natură virală în țânțari prin intermediul Sistemului High-Throughput Real-Time PCR*” însumează rezultatele obținute în urma realizării supravegherii vectorilor în două județe din partea de est a țării. De asemenea, sunt cuprinse și rezultatele obținute în urma detecției și izolării agenților patogeni de natură virală din țânțari, prin tehnici de biologie moleculară și tehnici de cultivare de *in vitro*.

În cadrul studiului, s-au analizat țânțari capturați în timpul sezonelor de transmitere din anii 2018 și 2019, din șapte puncte de colectare, distribuite pe raza a două județe din partea de est a României (Iași și Tulcea).

Capturarea țânțarilor s-a realizat utilizând patru tipuri de dispozitive, automate și manuale. Specimenele colectate au fost stocate la -20°C pentru 5 minute și ulterior identificate pe baza caracterelor morfologice și a stadiului gonotrofic (hrănite/nehrănite, pregătite pentru depunerea pontei) pe plăci de gheață. Ulterior, au fost grupate în *pool*-uri în funcție de data colectării, sex, specie, punct de colectare și stadiul gonotrofic. Pentru detectarea arbovirusurilor, femelele hrănite au fost grupate în *pool*-uri de 1 până la 19 specimene iar femelele nehrănite au fost analizate în *pool*-uri monospecifice, conținând 20 - 50 de specimene/eșantion.

ARN-ul total din *pool*-urile monospecifice de țânțari a fost extras automat. Pentru obținerea ADN-ului complementar, revers-transcripția extractelor din *pool*-urile de țânțari a fost realizată folosind *kit*-ul Reverse Transcriptase Master Mix (Fluidigm Corporation, USA) iar pre-amplificarea reacțiilor s-a realizat utilizând *kit*-ul PreAmp Master Mix Kit (Fluidigm corporation, USA).

În cele din urmă, probele de ADNc pre-amplificate au fost testate pentru prezența a 41 agenți virali vectorizați de țânțari, prin PCR în timp real microfluid utilizând sistemul BioMark™ real-time PCR (Fluidigm, USA), tehnică dezvoltată de Moutailler ș.a., 2019.

Probele corespunzătoare semnalelor pozitive obținute în urma tehnicii PCR în timp real microfluid au fost retestate ulterior pentru confirmare, printr-o serie de tehnici care s-au succedat în cascadă. Astfel, probele pozitive au fost retestate prin TaqMan PCR în timp real, izolare pe culturi celulare (Vero și C6/36), testarea prin RT-qPCR a supernatantului de la culturile celulare, rt-PCR Pan-flavivirus și secvențiere.

Din cei 17.694 țânțari identificați, 16.827 au fost analizați și grupați în 365 *pool*-uri care au făcut obiectul detecției virale. În total, au fost colectate și identificate 11 specii de țânțari și un taxon nespecificat. Dintre acestea, șase specii și taxonul neidentificat au fost analizate pentru prezența posibilelor arbovirusuri.

Ca urmare a testării prin tehnica PCR în timp real microfluid, din 365 *pool*-uri de țânțari testate, 11 *pool*-uri cu țânțari, încadrați în trei taxoni (*Culex pipiens* s.l, *Culex modestus* și *Aedes vexans*) au fost pozitive pentru arbovirusuri. Cel mai frecvent detectat a fost virusul West Nile, în zece probe iar un singur *pool* a fost pozitiv pentru virusul Sindbis.

Probele pozitive pentru VWN prin tehnica PCR în timp real microfluid, au fost confirmate prin realizarea unui duplex PCR în timp real, țintind pentru amplificare regiunile 3'NC și ProC ale genomului.

Confirmarea rezultatelor pozitive obținute prin RT-PCR, a fost urmată de izolarea și propagarea *in vitro* a virusului pe culturi celulare de mamifere și culturi celulare derivate din insecte. Interacțiunea virus

- celule a evidențiat apariția de celule rotunjite și refringente în culturile celulare de tip Vero, după patru zile de la infecție.

Efectul citopatic reprezentat de modificările de tip degenerativ a fost observat în trei flacoane de culturi celulare infectate. Un prim pasaj pe celule derivate din țânțari s-a realizat pentru probele inoculate inițial pe culturi celulare de mamifere. Supernatantul de la ambele tipuri de culturi celulare a fost supus detecției genomului viral prin PCR în timp real, utilizând ca ținte regiunile 3'NC și ProC ale VWN.

Virusul a fost detectat în supernatantul celular de la o singură probă, utilizând ca țintă regiunea ProC.

Ulterior amplificării prin PCR Pan-flavivirus (regiune de interes NS5), au putut fi obținute două secvențe iar analiza bioinformatică a fragmentelor a indicat că izolatele aparțin VWN, linia genetică 2.

În cazul probei pozitive pentru virusul Sindbis, interacțiunea dintre inocul și monostratul celular nu a relevat apariția modificărilor morfologice ale celulelor, detașarea sau individualizarea acestora.

Amplificarea virală prin PCR clasic pentru proteina de înveliș „E” a virusului Sindbis, pentru ARN-ul provenit din țânțari din supernatantul celulelor Vero și cel al liniei C6/36, nu a confirmat semnalul pozitiv obținut în urma tehnicii de amplificare inițială.

Capitolul VIII, „Concluzii finale” concentrează concluziile esențiale desprinse din acțiunile de supraveghere ale vectorilor și de realizare a patru anchete seroepidemiologice pentru detecția anticorpilor specifici împotriva unor flavivirusuri.

Prezenta teză aduce o contribuție însemnată și subliniază dinamica circulației VWN, susținută de o plajă variată de vectori și gazde receptive în zonele cuprinse în studiu.

Caracterul de noutate al prezentei teze este dat de prima raportare a detecției, prin tehnici de biologie moleculară, a virusului Sindbis și, prin teste serologice, a virusului Usutu.

În ceea ce privește cele două virusuri menționate anterior, afirmăm că sunt necesare investigații entomologice, moleculare și serologice sincronizate și aprofundate pe un areal mai extins, pentru a putea izola și caracteriza virusurile Sindbis și Usutu.

Cu toate acestea, rezultatele obținute servesc ca date de bază pentru cercetările ulterioare ce vor viza atât studiul populațiilor de vectori cât și implementarea unui sistem interdisciplinar de supraveghere activă și pasivă pentru controlul arbovirusurilor cu potențial de urgență în România.