

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD”, IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI INFECȚIOASE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. dr. Gheorghe SAVUȚA**

**Doctorand,
CRIVEI Luciana - Alexandra**

**IAȘI
2021**

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD”, IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI INFECȚIOASE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. dr. Gheorghe SAVUȚA**

**Doctorand,
CRIVEI Luciana - Alexandra**

**IAȘI
2021**

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

DOCTORAL THESIS

**PhD Coordinator,
Prof. PhD Gheorghe SAVUȚA**

**PhD Student,
CRIVEI Luciana - Alexandra**

**IAȘI
2021**

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ „ION IONESCU DE LA BRAD”, IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI INFECȚIOASE**

ARBOVIROZE CU CARACTER ZOONOTIC TRANSMISE DE ȚÂNȚARI ÎN ROMÂNIA

**Conducător de doctorat,
Prof. dr. Gheorghe SAVUȚA**

**Doctorand,
CRIVEI Luciana - Alexandra**

**IAȘI
2021**

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

**ARBOVIRUSES WITH ZOONOTIC
CHARACTER
TRANSMITTED BY MOSQUITOES IN
ROMANIA**

**PhD Coordinator,
Prof. PhD Gheorghe SAVUȚA**

**PhD Student,
CRIVEI Luciana - Alexandra**

**IAȘI
2021**

CUPRINS

INTRODUCERE	11
MULȚUMIRI.....	13
REZUMAT.....	17
PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	29
CAPITOLUL I PRINCIPALELE ARBOVIRUSURI ZOONOTICE CU POTENȚIAL DE EMERGENȚĂ ȘI RE-EMERGENȚĂ ÎN ROMÂNIA.....	30
1.1 Familia <i>Flaviviridae</i>	31
1.1.1 Virusul West Nile (VWN).....	33
1.1.2 Virusul Usutu (VUSU)	43
1.1.3 Virusul Encefalitei de căpușă (VEC).....	47
1.2 Alphavirusuri (genul <i>Alphavirus</i> , familia <i>Togaviridae</i>)	50
1.2.1 Virusul Sindbis (VSIN)	50
1.3 Familia <i>Peribunyaviridae</i> , Genul <i>Orthobunyavirus</i>	52
1.3.1 Virusul Tahyna (VTAH)	52
CAPITOLUL II PRINCIPALELE SPECII DE CULICIDE CU ROL ÎN TRANSMITEREA AGENȚILOR PATOGENI LA ANIMALE ȘI OAMENI ÎN ROMÂNIA	54
2.1 <i>Culex (Culex) pipiens</i> (Linnaeus, 1758).....	54
2.1.1 <i>Culex pipiens biotype pipiens</i> (Linnaeus, 1758).....	55
2.1.2 <i>Culex pipiens biotype molestus</i> (Forskal, 1775)	55
2.2 <i>Culex (Barraudius) modestus</i> (Ficalbi, 1889)	56
2.3 <i>Aedes (aeditomus) vexans</i> (Meigen, 1830)	57
2.4 <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse, 1895).....	58
CAPITOLUL III CAPACITATEA VECTORIALĂ A ȚÂNȚARIILOR	60
3.1 Factori intrinseci implicați în transmiterea agenților patogeni	62
3.1.1 Competența vectorială	62
3.2 Factori extrinseci implicați în transmiterea agenților patogeni	65
PARTEA a II-a - CONTRIBUȚII PERSONALE	68
CAPITOLUL IV SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR.....	69

CAPITOLUL V DESCRIEREA CADRULUI ORGANIZATORIC ȘI INSTITUȚIONAL ÎN CARE S-AU DESFĂȘURAT CERCETĂRILE	71
CAPITOLUL VI INVESTIGAȚII SEROLOGICE PRIVIND PRINCIPALELE INFECȚII TRANSMISE DE ȚÂNȚARI LA OM ȘI ANIMALE	73
6.1 Anchetă sero-epidemiologică privind infecția cu flavivirusuri la cai din zona de est a României.....	74
6.1.1 Material și metode	75
6.1.2 Rezultate și discuții.....	82
6.1.3 Concluzii parțiale.....	88
6.2 Anchetă sero-epidemiologică privind infecția cu flavivirusuri la păsări din zona de est a României	89
6.2.1 Material și metode	89
6.2.2 Rezultate și discuții.....	92
6.2.3 Concluzii parțiale.....	95
6.3 Anchetă sero-epidemiologică privind infecția cu flavivirusuri la câini din zona de est a României	96
6.3.1 Material și metode	96
6.3.2 Rezultate și discuții.....	102
6.3.3 Concluzii parțiale.....	110
6.4 Anchetă sero-epidemiologică privind infecția cu arbovirusuri la oameni în zona de est a României	111
6.4.1 Infecția cu virusurile West Nile și Ustu la oameni	111
6.4.2 Material și metode	113
6.4.3 Rezultate și discuții.....	116
6.4.4 Concluzii parțiale.....	119
CAPITOLUL VII IDENTIFICAREA AGENȚILOR PATOGENI DE NATURĂ VIRALĂ ÎN ȚÂNȚARI PRIN INTERMEDIUL SISTEMULUI HIGH-THROUGHPUT REAL-TIME PCR.....	121
7.1 Material și metode	121
7.1.1 Zona luată în studiu	121
7.1.2 Identificarea și stocarea specimenelor de țânțari	125
7.1.3 Extracția ARN-ului din <i>pool</i> -urile de țânțari	125
7.1.4 Revers-transcripția ARN-ului	126
7.1.5 Pre-amplificarea ADN-ului	126

7.2	Detecria agenților patogeni prin sistemul High-Throughput Real-Time PCR	127
7.3	Confirmarea rezultatelor	128
7.3.1	Reacția în lanț a polimerazei (PCR) pentru confirmarea genomului viral.....	128
7.3.2	Izolarea flavivirusurilor și alfavirusurilor pe culturi celulare	129
7.3.3	Amplificarea ARN-ului viral prin reacția de polimerizare în lanț (PCR) clasică	131
7.4	Secvențierea nucleotidelor.....	133
7.4.1	Analiza bioinformatică a secvențelor de nucleotide	133
7.4.2	Analiza filogenetică.....	133
7.5	Rezultate și discuții.....	133
7.5.1	Evaluarea abundenței și diversității speciilor de țânțari	133
7.5.2	Detecria agenților patogeni de natură virală din <i>pool</i> -urile de țânțari	137
7.5.3	Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică	150
7.6	Concluzii parțiale.....	158
CAPITOLUL VIII CONCLUZII FINALE		160
Bibliografie.....		166
ANEXA 1 Dispunerea regiunilor virale de interes în placa 96x96, pentru tehnica RT-PCR Microfluid.....		177
ANEXA 2 Lista virusurilor transmise de țânțari, familia virală, genul și specia, utilizate pentru dectcria virală în tehnica RT-PCR Microfluid, placă 96x96		178
ANEXA 3 LISTA FIGURILOR		180
ANEXA 4 LISTA TABELELOR		183
ANEXA 5 LISTA ABREVIERILOR		186
ANEXA 6 LISTA LUCRĂRILOR		188

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	11
ACKNOWLEDGEMENTS.....	16
SUMMARY.....	23
PART I CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	29
CHAPTER I THE MAIN ZOONOTIC ARBOVIRAL INFECTIONS WITH EMERGENCE AND REEMERGENCE POTENTIAL IN ROMANIA	30
1.1 <i>Flaviviridae</i> family	31
1.1.1 West Nile Virus (WNV)	33
1.1.2 Usutu Virus (USUV)	43
1.1.3 Tick borne encephalitis virus (TBEV).....	47
1.2 Genus Alphavirus, family <i>Togaviridae</i>	50
1.2.1 Sindbis Virus (SINV)	50
1.3 Family <i>Peribunyaviridae</i> , Genus <i>Orthobunyavirus</i>	52
CHAPTER II MAIN CULICIDAE SPECIES INVOLVED IN THE TRANSMISSION OF HUMAN AND ANIMAL PATHOGENS	54
2.1 <i>Culex (Culex) pipiens</i> (Linnaeus, 1758)	54
2.1.1 <i>Culex pipiens biotype pipiens</i> (Linnaeus, 1758).....	55
2.1.2 <i>Culex pipiens biotype molestus</i> (Forskal, 1775)	55
2.2 <i>Culex (Barraudius) modestus</i> (Ficalbi, 1889)	56
2.3 <i>Aedes (aeditomorphus) vexans</i> (Meigen, 1830).....	57
2.4 <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse, 1895).....	58
CHAPTER III VECTORIAL CAPACITY OF MOSQUITOES	60
3.1 Intrinsic factors involved in pathogen transmission	62
3.1.1 Vector competence	62
3.2 Extrinsic factors involved in pathogen transmission	65
PART II PERSONAL CONTRIBUTIONS.....	68
CHAPTER IV GOAL AND OBJECTIVES.....	69
CHAPTER V DESCRIPTION OF THE ORGANIZATIONAL AND INSTITUTIONAL FRAMEWORK WHERE THE RESEARCH WAS DEVELOPED	71

CHAPTER VI SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION REGARDING THE MAIN ARBOVIRUSES INFECTION IN ANIMALS AND HUMAN.....	73
6.1 Seroepidemiological investigations regarding flavivirus infections in horses in the Eastern Romania.....	74
6.1.1 Materials and methods.....	75
6.1.2 Results and discussion.....	82
6.1.3 Partial conclusions.....	88
6.2 Seroepidemiological investigations regarding flavivirus infections in birds in the Eastern Romania.....	89
6.2.1 Materials and methods.....	89
6.2.2 Results and discussion.....	92
6.2.3 Partial conclusions.....	95
6.3 Seroepidemiological investigations regarding flavivirus infections in dogs in the Eastern Romania.....	96
6.3.1 Materials and methods.....	96
6.3.2 Results and discussion.....	102
6.3.3 Partial conclusions.....	110
6.4 Seroepidemiological investigations regarding flavivirus infections in humans in the Eastern of Romania	111
6.4.1. West Nile and Usutu viral infections in humans	111
6.4.2 Materials and methods.....	113
6.4.3 Results and discussion.....	116
6.4.4 Partial conclusions.....	119
CHAPTER VII HIGH-THROUGHPUT DETECTION OF MOBOVIRUSES	121
7.1 Materials and methods.....	121
7.1.1 Study area	121
7.1.2 Identification and conditioning of specimens.....	125
7.1.3 RNA extractions from mosquitoes <i>pools</i>	125
7.1.4 RNA Revers transcription	126
7.1.5 DNA Pre-amplification and detection of viral agents	126
7.2 High-Throughput Real-Time PCR detection of viruses from mosquitoes	127
7.3 Results confirmation.....	128
7.3.1 Polimerase chain reaction for viral genome confirmation (PCR).....	128

7.3.2 Flavivirus and alfavirus isolation on cell culture.....	129
7.3.3 Viral RNA amplification through classical PCR.....	131
7.4 Nucleotide sequencing.....	133
7.4.1 Bioinformatic analysis of nucleotide sequences.....	133
7.4.2 Phylogenetic analysis.....	133
7.5 Results and discussion.....	133
7.5.1 Assessment of the abundance and diversity of mosquito species in the study areas.....	133
7.5.2 Detection of viral pathogens in collected mosquito pools.....	137
7.5.3 Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis.....	150
7.6 Partial conclusions.....	158
CHAPTER VIII FINAL CONCLUSIONS	163
Bibliography	166
ANNEX 1 Arrangement of viral designs in 96x96 Microfluidic plate.....	177
ANNEX 2 List of mosquito-borne viruses, targets, viral family, genus and species, used for viral detection in 96x96 Microfluidic assay.....	178
ANNEX 3 LIST OF FIGURES.....	180
ANNEX 4 LIST OF TABLES.....	183
ANNEX 5 ABBREVIATIONS.....	186
ANNEX 6 LIST OF PUBLICATIONS.....	188

INTRODUCERE

Prima descriere a țânțarilor ca vectori pentru agenți patogeni transmisibili la om a fost realizată de către Sir Patrick Manson, ca o consecință a descoperirii rolului acestora în transmiterea filariei. În anul 1881, Carlos Finlay emitea ipoteza conform căreia agentul etiologic responsabil de Febra Galbenă poate fi vehiculat de către țânțari. Ulterior, această ipoteză a fost confirmată de către Walter Reed, care, în 1900, afirma că virusul Febrei Galbene poate fi transmis la oameni de către țânțari. Conceptul „*arthropod-borne*” ca mecanism de transmitere a virusurilor a fost introdus pentru prima dată în domeniul virologiei în anul 1942, termenul de „arbovirus” fiind actualizat permanent. În raportul „*Arthropod-borne and rodent-borne viral disease*” publicat de Organizația Mondială a Sănătății (OMS), arbovirusurile au fost definite ca virusuri, care au ca și caracteristică comună, capacitatea de a fi menținute în natură prin transmiterea biologică între gazde vertebrate susceptibile prin intermediul unui artropod hematofag sau/și prin transmiterea trans-ovariană de la femela infectată în descendență (Huang, Higgs, și Vanlandingham 2019).

Deși transmiterea de la om la om prin intermediul schimbului de fluide infectate a fost raportată în cazul câtorva arboviroze, majoritatea mecanismelor de transmitere au la bază hrănirea artropodului infectat pe oameni. În cazul infecției cu virusul West Nile (WNV), virusul este transmis, prin intermediul țânțarilor, păsărilor, ce au rol de rezervor și de gazde de amplificare.

Apariția și răspândirea virusurilor transmise prin intermediul artropodelor (arbovirusuri) într-un teritoriu este dependentă, în egală măsură, de prezența virusului, a gazdelor susceptibile și a vectorilor competenți. Deși menționate de secole, în ultimii ani raportarea epidemiilor cauzate de arbovirusuri a crescut dramatic. Sporirea densității populației, defrișările, deplasările oamenilor, animalelor și a vectorilor au contribuit la diseminarea arbovirusurilor. Impactul schimbărilor climatice asupra acestor infecții este controversat, atâta timp cât poate influența, în diverse moduri, atât abundența insectelor cu rol de vectori cât și transmiterea virusului (Sebastián Napp, Petric, și Busquets 2018).

Alegerea biotopului țânțarilor este dependentă de existența vegetației. Perdeaua de vegetație propice ecosistemelor pentru țânțari furnizează atât hidrați de carbon, necesari în timpul zborului cât și un habitat propice pentru numeroase specii de păsări, furnizând astfel sursa de sânge necesară atât pentru depunerea ponte cât și pentru preluarea agenților patogeni (Brownstein ș.a., 2002).

Pentru a putea transmite agenți patogeni cu caracter zoonotic și, în consecință, să poată avea rol de vectori intermediari („*bridge vectors*”), anumite specii de țânțari trebuie să aibă un comportament alimentar oportunist care să le permită să se hrănească pe o diversitate mare de gazde, de-a lungul scării evolutive zoologice (Brownstein ș.a., 2002).

Actualmente, arbovirusurile sunt foarte răspândite la nivel mondial, pe toate continentele, cu excepția Antarcticii. Ca urmare a exigențelor specifice, dependente de gazdele vertebrate, de vectori și factori ecologici, necesare menținerii circuitului de transmitere, fiecare virus are o distribuție focală (Sebastián Napp, Petrić, și Busquets 2018).

Pentru a estima riscul de transmitere reprezentat de mobovirusuri („*mosquito-borne viruses*”), este esențială cunoașterea tuturor factorilor biologici și ecologici care guvernează transmiterea virală. Factorii asociați vectorilor sunt reprezentați de: (i) abundența și dinamica în timpul sezonului; (ii) comportamentul alimentar; (iii) capacitatea de dispersie; (iv) competența vectorială; (v) disponibilitatea și tipul locurilor de reproducere (Napp, Petrić și Busquets 2018). Pe lângă factorii asociați insectelor cu rol de vectori, o importanță deosebită o au și factorii ecologici, respectiv condițiile de mediu. Relevante pentru transmiterea vectorială, sunt precipitațiile și temperatura ambientală, cu efecte asupra ratei de replicare virală și de scurtare a perioadei de incubare extrinsecă, precum și disponibilitatea nutritivă din timpul stadiilor de dezvoltare a țânțarilor.

Ca urmare a tendinței ascendente a unor factori antropici, cum ar fi populația umană, defrișările, urbanizarea, deplasările oamenilor, mișcările animalelor și ale vectorilor precum și schimbările climatice, este anticipată o expansiune importantă a mobovirusurilor în Europa (Sebastián Napp, Petrić, și Busquets 2018).

Conform Catalogului internațional al arbovirusurilor, publicat de Centrul pentru Prevenirea și Controlul Bolilor, Statele Unite ale Americii, în momentul actual sunt înregistrate peste 530 de specii virale (CDC.gov), transmise în principal prin intermediul țânțarilor și al căpușelor. Dintre acestea, aproximativ 134 de specii de arbovirusuri produc boli la oameni (Gubler 2001). Majoritatea acestor virusuri sunt incluse în familii virale precum *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* și *Reoviridae*.

MULȚUMIRI

La realizarea prezentei teze și a întregii experiențe au contribuit în variate modalități numeroase persoane.

Doresc să adresez sincere mulțumiri recunoștință D-lui Prof. Univ. Dr. Gheorghe Savuța, pentru încrederea acordată, susținerea, îndrumarea de-a lungul perioadei doctorale și pentru toată condescendența de care a dat dovadă.

Mulțumesc în mod special D-nei Dr. Sylvie Lecollinet, Maisons-Alfort, Franța pentru călduroasa găzduire în cadrul echipei coordonată de domnia sa, pentru înțelegerea și îndrumarea competentă oferită pe toată durata stagiului.

Mulțumiri speciale doamnei Dr. Teodorescu Irina și domnilor Dr. Vâță Andrei și Dr. Teodor Danuș Spitalul Clinic de Boli Infecțioase „Sfânta Parascheva” Iași, pentru disponibilitatea, amabilitatea și ajutorul oferite.

Profunde mulțumiri adresez și distinșilor membri ai Comisiei de doctorat pentru efortul depus în parcurgerea și evaluarea 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 și oportunitățile oferite pe durata desfășurării studiilor doctorale.

Comisiei de îndrumare îi mulțumesc pentru sugestiile și suportul oferite în perioada studiilor doctorale. Colegilor și colectivului le mulțumesc pentru ajutorul, susținerea, încrederea și bunăvoința oferite în anii pe care i-am parcurs împreună.

Mă aplec în fața dragii mele familii și le mulțumesc pentru toată susținerea, încrederea și înțelegerea de care au dat dovadă permanent.

INTRODUCTION

The first description of mosquitoes as vectors for human pathogens was made by Sir Patrick Manson, as a consequence of the discovery of their role in the transmission of filaria. In 1881, Carlos Finlay hypothesized that the etiological agent responsible for Yellow Fever could be carried by mosquitoes. This hypothesis was later confirmed by Walter Reed, who in 1900 stated that the Yellow Fever virus could be transmitted to humans by mosquitoes. The concept of „arthropod-borne” as a mechanism of virus transmission was first introduced in the field of virology in 1942. Since then, the term „arbovirus” being constantly updated. In the „Arthropod-borne and rodent-borne viral disease” report, published by the World Health Organization (WHO), arboviruses were defined as viruses, which share as a common feature, the ability to be maintained in nature by biological transmission between vertebrate hosts susceptible via a hematophagous arthropod and/or by trans-ovarian transmission from infected female offspring (Huang, Higgs, and Vanlandingham, 2019).

Although human-to-human transmission through the exchange of infected fluids has been reported in several arboviruses, most of the transmission mechanisms are based on feeding the infected arthropod to humans. In the case of West Nile virus (WNV) infection, the virus is transmitted to the host, which acts either as a reservoir and amplifier, through mosquitoes.

The emergence of viruses transmitted by arthropods (arboviruses) is equally dependent on the virus, susceptible hosts and competent vectors. Although mentioned for centuries, in the last years the reporting of epidemics caused by arboviruses has increased dramatically. Increasing population density, deforestation, movement of people, animals and vectors have contributed to the spreading of arboviruses. The impact of climate change on these diseases is controversial, as long as it can influence, in various ways, both the abundance of vectors and the transmission of the virus (Sebastián Napp, Petrić, and Busquets 2018).

The establishment of the mosquito biotope is dependent on the existence of vegetation, for mosquito ecosystems and blood source. The vegetation provides both carbohydrates, necessary during the flight, and a suitable habitat for many species of birds, providing the blood source necessary both for laying eggs and for taking up pathogens (Brownstein et al., 2002).

To be able to transmit zoonotic pathogens and, consequently, to act as bridge vectors, certain species of mosquitoes must have an opportunistic feeding pattern that allows

them to feed on a wide variety of species. Of hosts, along the evolutionary zoological scale (Brownstein ș.a., 2002).

Currently, arboviruses are spread worldwide, on all continents except Antarctica. Due to the specific requirements, dependent on vertebrate hosts, vectors and ecological factors, necessary to maintain the transmission circuit, each virus has a focal distribution (Sebastián Napp, Petrić, and Busquets 2018).

Due to the upward trend of anthropogenic factors, such as human population, deforestation, urbanization, human movements, animal and vector movements, and climate change, the expansion of moboviruses in Europe is expected (Sebastián Napp, Petrić, and Busquets 2018).

To estimate the risk of transmission posed by moboviruses (mosquito-borne viruses), it is essential to know all the biological and ecological factors that are involved in viral transmission. These include factors associated with vectors: (i) abundance and dynamics during the season; (ii) feeding preferences; (iii) dispersion ability; (iv) vector competence; (v) the availability and type of breeding sites (Napp, Petrić and Busquets 2018).

According to the International Catalog of Arboviruses, currently lists more than 530 viral species (CDC.gov), transmitted mainly through mosquitoes and ticks. Of these, about 134 species of arboviruses cause disease in humans (Gubler 2001). Most of these viruses belong to viral families such as *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* and *Reoviridae*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Many people have contributed in various ways to the achievement of this thesis and the whole experience.

I would like to express my sincere gratitude to the PhD coordinator, Prof. Savuța Gheorghe PhD, for his trust, support, guidance throughout the doctoral period and all the understanding he has shown.

Special thanks to Dr Sylvie Lecolinet, Maisons-Alfort, France for the warm hospitality of the team coordinated by her, for the understanding and competent guidance provided throughout the internship.

I wish to thank Dr. Teodorescu Irina, Dr Vâță Andrei and Dr. Teodor Danuț, Clinical Hospital for Infectious Diseases "Saint Parascheva" Iasi, for their availability, kindness and cooperation.

I would also like to thank the distinguished members of the Doctoral Committee for their works in reviewing and evaluating this doctoral thesis.

At the same time, I thank both the management of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "Ion Ionescu de la Brad" Iasi and the Faculty of Veterinary Medicine for the conditions and opportunities offered during the doctoral studies.

I thank the steering committee for their suggestions and support during their doctoral studies. I thank my colleagues and the team for the help, support, trust and goodwill offered during the years we spent together.

I bow to my dear and loving family and thank them for all the support, trust and understanding they have given me all along. None of this would have been possible if you had not believed in me.

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 redate 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 redate 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 „adulți”. 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).

Detecția 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 detecția 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 detecția 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 emergență în România.

SUMMARY

Key words: *arboviruses, zoonosis, sero-neutralisation, High-Throughput Real-Time PCR*

The present PhD thesis, entitled "*Arboviruses with zoonotic character transmitted by mosquitoes in Romania*", is structured according to the rules in force in two main parts: the first part, represented by "**Current state of knowledge**" which summarises updated information from the literature on the topic addressed and the second part, that of „**Personal Contributions**”, in which are described the working methods and the results obtained as a result of the research undertaken during the doctoral period.

The first part, "*The current state of knowledge*", structured in three chapters includes a brief systematization of information identified from the literature on the main arboviruses, clinical manifestations in humans and animals, the main insects that can act as vectors and vectorial capacity with the factors involved in transmission of pathogens.

The **first chapter** entitled "*The main zoonotic arboviral infections with emergence and re-emergence potential in Romania*" describes, as the title shows, the main families and viral genera that include viruses whose transmission involves the participation of a hematophagous insect. Besides, the clinical syndromes associated with the infection with the mentioned viruses in humans and animals are also reported. The main viral families described in this chapter are the Flaviviridae family, with the viruses: West Nile, Usutu and tick-borne encephalitis virus, the Togaviridae family, with the Sindbis virus and the Peribunyaviridae family, with the Tahyna virus.

Regarding the main species of mosquitoes involved in the transmission of viruses described above, in the **second chapter** entitled "*The main culicidae involved in the transmission of pathogens to human and animals in Romania*", describes indigenous and invasive species, which are found in our country. Out of the 55 species of mosquitoes recognized as native to Romania, this chapter describes the species: *Culex pipiens*, with the two bioforms, *Culex modestus*, *Aedes vexans* and the invasive species, *Aedes albopictus*.

Chapter III "*Vectorial capacity of mosquitoes*" focuses on vector capacity and vector competence, crucial aspects for the transmission of pathogens.

The second part of the thesis "*Personal contributions*" is structured in five chapters (IV - VIII), each of them presenting the working methods approached, the results obtained during the doctoral period and the conclusions drawn from the analysis presented.

Chapters IV and V, respectively "*The aims and objectives of research*" and "*Description of the organizational and institutional framework in which the research was*

conducted" briefly describe the purpose and objectives pursued, as well as the place of activities necessary to achieve the proposed objectives.

Thus, this thesis resulted from the implementation of a surveillance program in the eastern part of the country. Surveillance action focused on three major aspects involved in the arboviral life cycle: (i) mosquito communities (Diptera: *Culicidae*); (ii) detection and characterization of arboviruses found in captured mosquitoes; (iii) active serological surveillance of susceptible species.

Chapter VI, entitled „*Serological investigations regarding the main arboviral infection in animals and human*”, is structured in four subchapters. The division into subchapters emphasize the broad approach of the topic and of the targeted receptive species, which represent essential links in the transmission and maintenance cycle of arboviruses in nature. Thus, the serological investigations aimed the detection and prevalence of specific antibodies, in serum samples from horses, birds, dogs and people, from the eastern part of Romania.

The aim of the first seroepidemiological investigation was the detection of antibodies against West Nile, Usutu and tick-borne encephalitis viruses, in clinically healthy horse serum samples from three counties and 14 places. For the mentioned purpose, the tested samples were harvested from Iași (n = 118), Vaslui (n = 208) and Tulcea (n = 28) and were collected simultaneously with the samples intended for testing for equine infectious anaemia, during February - April and in May and July. The individual data of the animals included in the study were obtained from the owners and were systematized in two variables: age category and gender.

Serological testing of the 354 samples was initially performed by enzyme-linked ELISA assay, for IgG detection, using the commercial ID-Screen West Nile Competition kit (IDVet Diagnostics, Montpellier, France). Subsequently, the positive samples were analysed for confirmation by the seroneutralization assay. The techniques were performed according to the internal ANSES protocols.

The results of the first serological assay revealed a prevalence of anti-WNV antibodies of 46.6% (165 positive samples). Regarding the studied variables, the largest percentage corresponded to the age category "adult" (5-14 years), while there were no noticeable differences between the sexes.

To rule out false-positive results, due to cross-serological reactions with other flaviviruses, positive and doubtful samples by ELISA technique, were analysed by micro-neutralization virus (MNT) test. Thus, neutralizing anti- WNV antibodies were detected in 136 out of the 168 tested samples, with an overall seroprevalence of 38.4% (136/354). As a result of micro-neutralization assay testing, four positive samples were found positive for WNV and USUV. Because the condition for specific antibodies to be assigned to a particular virus is that a virus has an antibody titre four times higher than the second, the four samples were considered positive for WNV. Regarding the detection of neutralizing

antibodies against tick-borne encephalitis virus, there was no antibody detection in any of the tested serum samples.

The second serological investigation aimed at the detection of IgG antibodies in serum samples from wild birds from four different locations in the Danube Delta Biosphere Reserve (DDBR): Caraorman, Furtuna, Murighiol and Sălcioara. The status (migratory or resident) of the captured birds was established as well as the age category: youth or adult.

To achieve the goal, 68 samples were collected in stages from the four places mentioned above. The samples were tested using the ID Screen® West Nile Competition Multispecies commercial kit (IDVet, Grabels, France), for the detection of anti-WNV antibodies, following the manufacturer's instructions.

Out of the 68 wild birds, 22 were grouped in the “youth” category (hatched in the 2016 season) and 46 were classified as “adult”. Regarding adult birds: 12 were females and 14 males, and for another 20 birds, sex was not determined.

Following testing by the competition ELISA assay, the presence of specific anti-WNV antibodies were detected in eight samples out of 68 tested (11.8%, CI95% 11.5% – 12.1%). The confirmation of the positive samples by seroneutralization was performed on 51 samples from two sites, while for 17 samples, the initial amount of serum did not allow further testing. Thus, out of the total samples tested for the detection of neutralizing anti-WNV antibodies, six samples were confirmed [11.8%, CI95% 2.92% -20.61%).

The third seroepidemiological survey included samples from dogs, with various diseases or healthy, from six counties in the eastern side of the country. To achieve the proposed objective, 363 samples were collected from dogs from paddocks, private households and veterinary clinics, from: Suceava (n = 12), Iași (n = 237), Bacău (n = 24), Brăila (n = 16), Galați (n = 53) and Tulcea (n = 21).

Detection of specific anti-WNV antibodies (IgG) was performed gradually, using the competition ELISA assay, with two ready-to-use veterinary commercial kits: ID-Screen West Nile Competition (IDVet Diagnostics, Montpellier, France) and Ingezim WNV Compaq kit (Ingenasa).

In the first phase, 179 samples were serologically tested by ELISA enzyme immunoassay, using the commercial ID-Screen West Nile Competition kit (IDVet Diagnostics, Montpellier, France), following the protocol, derived from the supplier's instructions. In the second step, 184 samples were tested using the commercial kit INGEZIM West Nile COMPAC (Ingenasa, Madrid, Spain).

Depending on the availability of individual data, the animal gender, age, breed size and degree of exposure were considered as variables.

Following the testing of the 179 samples, in the first stage, anti-WNV antibodies were detected in 79 samples [(44.1%) 95% CI 36.86-51.41], while in the second stage, after testing 184 samples, we obtained a prevalence of anti-WNV antibodies of 51% [(94/184) 95% CI 43,86-58,31].

In order to verify the sensitivity and specificity of the used test, the 94 positive samples resulting from the testing in the second stage, were analysed by the competition technique, using the ID Screen WNV Competition kit. Thus, out of the 94 positive samples, depending on the amount of serum available, 86 samples were reanalysed, obtaining a degree of fidelity and a positivity of 100% between the two kits.

In order to reduce the bias given by the intrinsic values of the two screening tests used and to have statistical significance, to establish an overall seroprevalence, were considered only the results obtained from the test using the ID Screen WNV Competition kit. Thus, out of 363 tested samples, specific antibodies for WN virus and other antigenically related flaviviruses were detected in 165 samples (79 from the first stage and 86 confirmed as a result of the second analysis), with an overall seroprevalence of 45.5% (95% CI: 40.33 - 50.58).

ELISA seropositive samples were retested by micro-virus neutralization (MNT) technique for the detection of specific neutralizing antibodies for West Nile, Usutu and tick-borne encephalitis viruses. Thus, in order to confirm seropositivity and depending on the amount of sample available, 161 out of 165 positives were tested.

Specific neutralizing antibodies against WNV were detected in 131 out of 363 samples, anti-USUV antibodies (antibody titre 160) were detected in a single sample, while for TBEV there was no positive sample.

The simultaneous reveal of anti-WNV and anti-USUV antibodies was observed in 10,3% of the samples (17/165). In 16 of them, the titre of anti-WNV-specific neutralizing antibodies was significantly higher, compared to that of Usutu virus-specific antibodies.

The last step of the serological investigations aimed at the detection of IgG and IgM antibodies against West Nile virus and IgG for Usutu virus. In order to establish the prevalence of antibodies in humans, samples collected in two phases (2015 and 2019) from patients of the "Sfânta Parascheva" Infectious Diseases Hospital in Iași were analysed. Patients who agreed to take the samples filled a questionnaire designed to collect information regarding demographic and clinical dates, or the place of origin.

The analysis of 176 human serum samples, revealed a prevalence of specific anti-WNV antibodies (IgG) of 3.4% (6/176). Following the testing of 88 samples, collected in 2019, for the detection of anti-WNV IgM, a seroprevalence of 9.1% (8/88) was observed. Regarding the detection of anti-USUV (IgG) antibodies, out of 88 serum samples collected in 2019 and tested, there was no positiveness.

Chapter VII, entitled "*High-Throughput detection of moboviruses*" encompass the results obtained from vector surveillance conducted in two counties from the eastern part of the country. This chapter includes the results obtained from the detection and isolation of viral pathogens from mosquitoes, through molecular biology techniques and in vitro culture techniques.

In the framework of this study were analysed mosquitoes captured during the transmission seasons in seven collection points, distributed within two counties in the eastern part of Romania (Iași and Tulcea), in 2018 and 2019.

Mosquitoes were captured using four types of automatic and manual devices. The collected specimens were stored at -20 ° C for 5 minutes and subsequently identified based on morphological characteristics and gonotrophic stage (fed / not fed, pregnant) on ice plates. Subsequently, the specimens were grouped into pools according to the date of collection, sex, species, collection point and gonotrophic stage. For arboviruses detection, fed females were grouped in pools of 1 to 19 specimens, and unfed females were analysed in monospecific pools containing 20 up to 50 specimens per pool.

The total RNA from monospecific mosquito pools was extracted automatically. To obtain complementary DNA, reverse transcription of extracts was performed using the Reverse Transcriptase Master Mix kit (Fluidigm Corporation, USA) while the pre-amplification of reactions was performed using the PreAmp Master Mix Kit (Fluidigm Corporation, USA).

Eventually, pre-amplified cDNA samples were tested for the detection of 41 mosquito-borne viruses by the microfluidic real-time PCR assay, using the BioMark real-time PCR system (Fluidigm, USA) developed by Moutailler and others, 2019.

The corresponding samples to the positive signals in microfluid real-time PCR assay were subsequently tested for confirmation, by a series of techniques that followed each other in cascade. Thus, the positive samples were retested by real-time TaqMan PCR, isolated on cell cultures (Vero and C6 / 36), specific sequences were obtained, by Pan-flavivirus RT-PCR and sequencing.

Out of the 17.694 mosquitoes identified, 16.827 mosquitoes were analysed and grouped in 365 pools, and subjected to viral detection.

In total, 11 species of mosquitoes and an unspecified taxon were collected and identified. Of these, six species and the unidentified taxon were analysed for the presence of possible arboviruses.

As a result of microfluidic real-time PCR method, out of 365 tested mosquito pools, 11 pools belonged to three taxa (*Culex pipiens* s.l, *Culex modestus* and *Aedes vexans*) were positive for arboviruses. The most commonly detected virus was West Nile - in ten samples and one pool was positive for Sindbis virus.

The WNV positive samples by real-time microfluidic PCR technique were confirmed performing a duplex real-time PCR, targeting for amplification the 3'NC and ProC regions of the genome.

Confirmation of the positivity of molecular results, followed by in vitro isolation and disseminated of the virus on mammalian cell cultures and insect-derived cell cultures, revealed the appearance of rounded and refractive cells in Vero-type cell cultures four days post-infection. The cytopathic effect of degenerative changes was noticed in three flasks of infected cell cultures. A first passage on mosquito-derived cells was performed for samples

initially inoculated on mammalian cell cultures. The supernatant from both types of cell cultures was subjected to viral genome detection by real-time PCR, using as targets, the 3'NC and ProC regions of WNV.

The virus was detected in the cell culture supernatant from a single pool, using the ProC region as a target.

Subsequently, amplification by Pan-flavivirus PCR (NS5 region of interest), two sequences could be obtained, and the bioinformatics analysis of the fragments indicated that the isolates belong to WNV, genetic line 2.

For the sample positive for Sindbis virus, the interaction between the inoculum and the cell monolayer did not reveal the appearance of any morphological changes of the cells, their detachment or individualization.

This thesis brings a significant contribution and emphasizes the dynamics of WNV circulation, supported by a wide range of receptive vectors and hosts, in the areas covered in framework of the study.

The **last chapter**, "*Final Conclusions*" focuses on the essential conclusions drawn from the actions of vectors surveillance and four seroepidemiological investigations for the detection of specific antibodies against flaviviruses.

Viral amplification by classical PCR, for Sindbis virus envelope protein "E", for mosquito RNA, from Vero cell supernatant and C6 / 36 line supernatant, did not confirm the positive signal obtained after the initial amplification technique.

The novelty of this thesis is given by the first molecular reporting of Sindbis virus and Usutu virus, by serological tests.

Regarding the investigations on the two viruses mentioned above, synchronized entomological, molecular and serological researches are needed, over a wider area, in order to succeed the isolation and characterisation of Sindbis and Usutu viruses.

However, the results obtained serve as basic data for further studies that will focus on the study of vector populations and the implementation of an interdisciplinary system of active and passive surveillance for the control of arboviruses with emergency potential in Romania.

PARTEA I
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

PART I
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

CAPITOLUL I PRINCIPALELE ARBOVIRUSURI ZOONOTICE CU POTENȚIAL DE EMERGENȚĂ ȘI RE-EMERGENȚĂ ÎN ROMÂNIA

CHAPTER I THE MAIN ZOONOTIC ARBOVIRAL INFECTIONS WITH EMERGENCE AND REEMERGENCE POTENTIAL IN ROMANIA

De la începutul secolului douăzeci, Europa numără până la zece virusuri transmise prin intermediul țânțarilor (*mosquito-borne viruses* = virusuri transmise de țânțari), virusuri endemice sau care circulă temporar în anumite țări de pe continent. Aceste mobovirusuri sunt încadrate în trei familii: *Togaviridae* (virusurile Chickungunya și Sindbis), *Flaviviridae* (virusurile West Nile, Usutu și Dengue) și *Bunyaviridae* (virusurile Batai, Tahyna, Inkoo, Lednice, *Snowshoe hare*) (Hubálek 2008). Dintre acestea, cea mai mare parte dintre virusurile circulante aparțin familiei virale *Flaviviridae* (Török E. ș.a., 2016).

Până în prezent, s-a demonstrat că virusuri precum Usutu (VUSU), Sinbis (VSIN), Batai (VBAT), Tahyna (VTAH), Inkoo (VINK), virusul Lednice (VLED), West Nile, (VWN), Chickungunya (VCHIK) și virusul Dengue (VDEN) sunt endemice sau circulă temporar în țări din Europa. Exceptând virusul Lednice, toate celelalte opt virusuri sunt potențial patogene pentru oameni și animale, majoritatea infecțiilor trecând neobservate sau prezentând semne clinice ușoare, frecvent asociate cu o gripă de vară (Scheuch D. ș.a., 2018a). Cu toate acestea, virusuri precum WN, CHIK și DEN sunt asociate cu boli fatale, fiind transmise, alături de celelalte virusuri, prin intermediul speciilor de țânțari indigene dar și de specia invazivă *Aedes albopictus*, depistată și în România în anul 2012 (Prioteasa, Dinu, Fălcuță, 2015).

În ceea ce privește situația epidemiologică a arbovirozelor în România, în intervalul 2010-2020, conform rapoartelor publicate de Centrul Național de Supraveghere și Control al Bolilor Transmisibile (CNSCBT) și de Centrul European de Prevenire și Control al Bolilor (ECDC), au fost notificate cazuri de infecție cu virusurile West Nile, Zika și Dengue. Astfel, în perioada menționată au fost raportate trei cazuri de infecție cu virusul Zika și 43 de cazuri de infecție cu virusul Dengue, pentru ambele boli cazurile fiind de import. Situația epidemiologică pentru infecția cu virusul West Nile a fost una în dinamică, prezentă anual, la finele anului 2020 prevalența cumulativă fiind de 665 de cazuri (CNSCBT, ECDC).

1.1 Familia *Flaviviridae*

1.1 *Flaviviridae* family

Din punct de vedere taxonomic, familia *Flaviviridae* include patru genuri (*Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* și *Pegivirus*), cu o organizarea similară a genomului, dar cu strategii de replicare și proprietăți fizico-chimice distincte din punct de vedere biologic (Simmonds ș.a., 2017).

Genul *Flavivirus* cuprinde 53 de specii virale, majoritatea având acțiune patogenă asupra oamenilor (Beck ș.a., 2013) și este constituit din serocomplexe virale cu o relevanță epidemiologică considerabilă. Multe din ariile naturale în care acestea evoluează dețin atât faună vectorială, cât și condiții geografice compatibile co-circulației, „importului” și emergenței virusurilor din aceste serocomplexe (dos Santos Franco ș.a., 2019). Deși imprecise, studiile serologice au permis diferențierea flavivirusurilor în serocomplexe precum: Seromplexul Encefalitelor Japoneze (VWN și VUSU, în Europa), virusul febrei galbene (Yellow Fever), cele patru serotipuri ale virusului Dengue sau serocomplexul Ntaya (virusul Bagaza în Europa) (Beck ș.a., 2013; Dong, Zhang, și Shi, 2008).

Toate virusurile încadrate în genul *Flavivirus* posedă un genom ARN, monocatenar, cu sens pozitiv, de aproximativ 11kb. De cele mai multe ori, genomul (fig 1.1) virusurilor codifică un singur cadru de citire (ORF), flancat la capetele 5' și 3' de regiuni netraduse (NTR), de aproximativ 100 până la 400-700 nucleotide (nt), existând și flavivirusuri la care genomul codifică o proteină adițională. Cadrul de citire al ARN-ului de transcripție codifică o singură poliproteină, care prin clivaj co- și post-translațional generează trei proteine structurale desemnate ca fiind capsidală (C), premembranară/membranară (prM/M) și proteina de înveliș (E), precum și șapte proteine nestructurale (NS) în ordinea genelor: 5'–C – prM (M) – E – NS1 – NS2A – NS2B– NS3 – NS4A – 2K – NS4B – NS5–3' (Blitvich și Firth 2015).

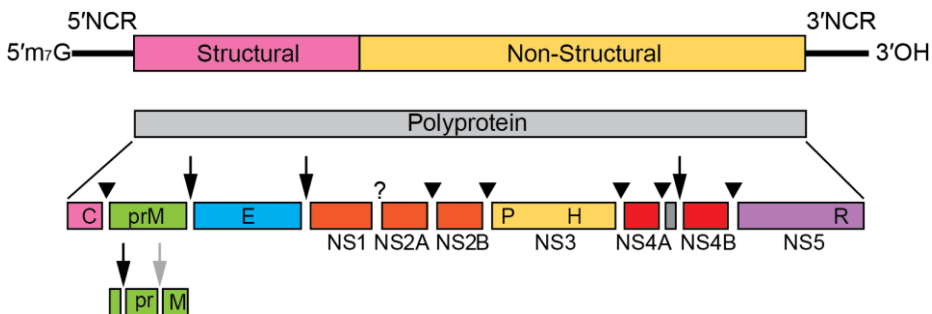


Figura 1.1 Structura genomului la flavivirusuri, cu proteinele structurale și nestructurale
 Figure 1.1 Flaviviruses genome organization and it's structural and non-structural proteins
 (talk.ictvonline.org)

Replicarea virusurilor din familia *Flaviviridae* se produce prin sinteza unui antigenom ca matrice pentru producția ARN-ului genomic. La rândul lui, ARN-ul genomic

acționează ca un șablon de translație pentru sinteza proteinelor virale. Complexele de replicare sunt reținute în structurile membranoase ale reticulului endoplasmatic. Asamblarea virionului, cu dobândirea învelișului lipidic ce conține glicoproteina, se produce prin înmugurire iar particulele virale sunt transportate în vezicule citoplasmatică și eliberate prin exocitoză (Simmonds ș.a., 2017).

Cea mai mare parte dintre flavivirusurile cunoscute sunt transmise pe cale orizontală între artropode hematofage și gazde vertebrate, fiind considerate virusuri cu gazdă dublă. Acestea sunt divizate în virusuri țânțar/vertebrat (virusul Dengue, virusul febrei galbene, virusul encefalitei Japoneze, VWN), agenți patogeni de interes pentru sănătatea publică și virusuri căpușă/vertebrat, cum ar fi: virusul encefalitei transmise de căpușe, virusul Langat și virusul Powassan (Blitvich și Firth 2015).

În ceea ce privește ciclul de menținere a virusurilor în natură, contrar mecanismului majoritar (insectă hematofagă/vertebrat), există flavivirusuri ce sunt menținute în cicluri ce includ doar vertebratele, fără implicarea artropodelor, cunoscute ca virusuri „*no known vector*” și virusuri specifice insectelor „*insect-specific flaviviruses*”. În prima categorie sunt incluse izolate obținute de la rozătoare și lilieci iar cea de-a doua categorie cuprinde virusuri precum *Culex* flavivirus (CxFV), virusul Kamiti River și virusul Chaoyang (Blitvich și Firth 2017; Bolling ș.a., 2011).

Virusurile cu gazdă dublă, din cadrul familiei *Flaviviridae*, au fost subdivizate în două grupuri în funcție de vector: flavivirusuri transmise de *Culex spp.* și respectiv cele transmise prin de *Aedes spp.* Virusurile încadrate în primul grup au ca rezervor păsările, prezintă neurotropism și produc frecvent meningo-encefalite, în timp ce virusurile din cel de-al doilea grup au ca rezervor primatele, nu au neurotropism și determină, în principal, boli hemoragice (fig. 1.2).

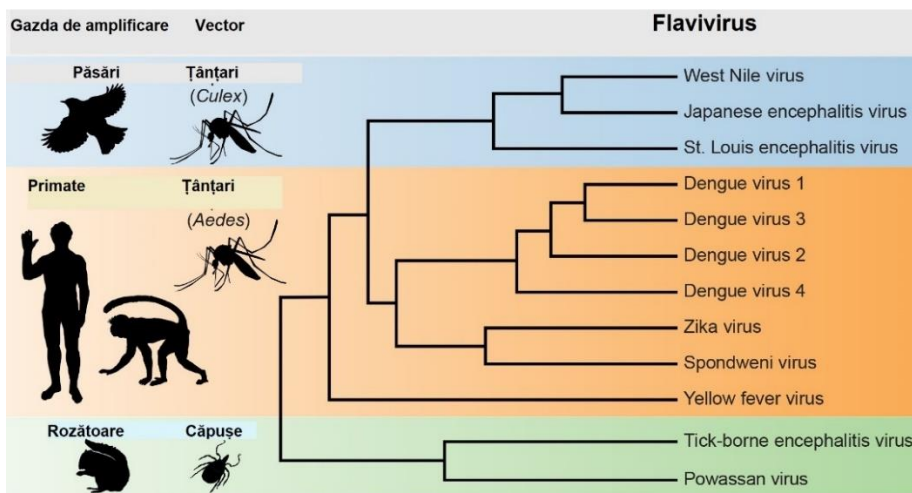


Figura 1.2 Înrudirea genetică a flavivirusurilor

Figure 1.2 Genetic relatedness of flaviviruses

(Lazearlab.org)

Virusurile transmise prin intermediul căpușelor pot fi subdivizate, la rândul lor, în două grupuri. Un grup se regăsește la păsările marine iar ce de-al doilea grup, cel al encefalitelor transmise de căpușe, este asociat, în primul rând, cu rozătoarele. Comparativ cu mobovirusurile, virusurile transmise prin intermediul căpușelor evoluează cu o frecvență mai redusă, probabil ca urmare a unui nivel mai scăzut al replicării virale și o perioadă mai îndelungată de timp între generații (Beck ș.a., 2013).

1.1.1 Virusul West Nile (VWN)

1.1.1 West Nile Virus (WNV)

Virusul West Nile este încadrat în familia *Flaviviridae*, genul *Flavivirus*. VWN este un membru al serocomplexului Encefalitelor Japoneze, ce încadrează virusuri importante din punct de vedere medical, asociate cu encefalite la oameni (encefalitele Japoneze, encefalitele Saint Luis). Strânsa înrudire antigenică dintre flavivirusuri, în special cele aparținând complexului encefalitelor Japoneze, are o implicație importantă în diagnostic datorită reacțiilor serologice încrucișate (Petersen & Marfin, 2002).

Circulația VWN implică insectele hematofage și păsările sălbatice. Acestea din urmă îndeplinesc rolul de gazde rezervor iar insectele hematofage, în special țânțarii, au rolul de vectori biologici. Tiparul de răspândire al VWN este unul complex, implicând diferite specii de vectori și gazde - rezervor din diverse zone și condiții ecologice, depinzând în principal atât de abundența cât și de densitatea speciilor celor două verigi implicate. Adaptabilitatea virusului la diferite habitate a permis expansiunea mondială, îngreunând monitorizarea acestuia (Calzolari ș.a., 2015).

Caracteristicile virusului. Studiile referitoare la structura virionului, efectuate cu ajutorul microscopiei electronice, au evidențiat faptul că acesta este asemănător celorlalte flavivirusuri. Virionul, este sferic, are înveliș și un diametru de aproximativ 40-60 nm (Kramer, Styer, și Ebel 2008).

VWN are un genom ARN monocatenar, de aproximativ 11 Kb, ce conține zece gene flancate de regiunile necodante 5' și 3' (Chancey ș.a., 2015). Regiunea non-structurală 5' are o lungime de 96 nucleotide iar regiunea 3' are o lungime ce variază între 337 și 649 nucleotide (Brinton, 2013).

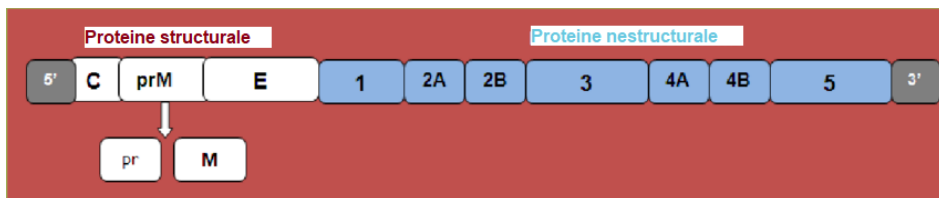


Figura 1.3 Structura genomului VWN, ce cuprinde ambele tipuri de proteine: structurale și nestructurale

Figure 1.3 WNV genomic structure, encompassing both structural and non-structural proteins

(După Lwande ș.a, 2015)

Regiunile necodante ale genomului viral formează structuri esențiale pentru replicarea virală. Genomul codifică o singură poliproteină și șapte proteine nestructurale (NS). Poliproteina este scindată co și post-tranlațional în trei proteine structurale (fig.1.3): premembranară/membranară (preM/M), proteina capsidei și una de înveliș, E (Chancey ș.a., 2015).

La nivel structural, virionul este o particulă icosaedrică, înconjurată de un strat bilipidic. Nucleocapsida este compusă din proteina C, asociată genomului ARN și mediază asamblarea virală. În timpul asamblării, heterodimerii proteinelor prM și E se integrează în stratul bilipidic al virusului, fiind exprimați la suprafața virionului. Proteina prM, de la suprafața virionului imatur, are rolul de a-l proteja de fuziunea prematură, ce se produce înaintea înmuguririi virale de la suprafața celulei și este scindată în timpul procesului de maturare virală. În timpul infecției, particulele de virus matur, parțial matur sau imatur sunt produși de replicare ce au pe suprafață un număr variabil de molecule de proteine prM imature. Proteina E mediază atât legarea de receptorul de la suprafața celulei, cât și fuziunea cu membrana celulei gazdă. Hemaglutinina virală E are o importanță imunologică mare prin inducerea anticorpilor neutralizanți. Proteina E prezintă trei domenii structurale, dintre care ultimul (domeniul III) reprezintă ținta anticorpilor neutralizanți (Chancey C. ș.a., 2015). Glicoproteina E reprezintă hemaglutinina virală și mediază legarea virusului de celula gazdă. Fiind cea mai importantă proteină structurală cu rol imunologic, glicoproteina E atrage majoritatea anticorpilor neutralizanți (Petersen și Marfin 2002).

Cele șapte proteine nestructurale (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B și NS5) joacă un rol critic atât în sinteza cât și în asamblarea ARN-ului, fiind responsabile de reglarea mecanismelor de transcripție, translație și replicare și de a atenua răspunsul antiviral al gazdei (Valiakos ș.a., 2013). NS1 are un rol precoce în reglarea replicării virale. NS3 are multiple funcții enzimactice iar alături de NS2B scindează alte proteine nestructurale din poliproteina virală. Proteina NS5 este necesară replicării virale și conține un domeniu ARN polimerază la capătul C terminal esențial pentru replicarea virusului și un domeniu metiltransferaza la capătul terminal al regiunii N. Proteinele NS2A, NS2B, NS4A și NS4B sunt proteine de mici dimensiuni, hidrofobe, ce nu au funcții enzimactice, dar pot acționa ca și cofactori pentru replicare, asamblare și localizare virală. Proteinele NS ale VWN pot modula răspunsul imun. În mod particular, proteina NS1 are efect antagonist asupra mecanismelor de apărare antivirală ale gazdei, inhibând activarea complementului. De asemenea, suprafața celulară asociată NS1 constituie o țintă majoră pentru anticorpii gazdei, ceea ce contribuie la *clearance*-ul celulelor infectate prin fagocitoză (Chancey C. ș.a., 2015).

Epidemiologie. VWN prezintă importanță de ordin medical atât din punctul de vedere al sănătății omului cât și al sănătății animalelor, respectiv al conceptului *One Health*, prin prisma abilității virusului de a infecta oameni și alte specii de mamifere, în special caii (Calzolari ș.a., 2015).

VWN este menținut în natură printr-un ciclu enzootic ce implică țânțarii și păsările. După ce au trecut prin trei stadii acvatice (ou, larvă, pupă), țânțarii adulți încep să apară primăvara, în regiunile cu climă temperată. Amplificarea virală are loc în ciclul de transmitere păsare-țânțar-păsare până toamna devreme, când femelele de țânțari intră în diapauză. Acest ciclu de amplificare virală poate fi afectat de o serie de factori de mediu, cum ar fi: clima, prădătorii, paraziții gazdă și vector sau statusul imunitar al gazdelor. Atunci când condițiile de mediu sunt favorabile amplificării virale, un număr considerabil de țânțari cu rol de vectori intermediari sau de legătură („*bridge vectors*”) - care se hrănesc atât pe oameni cât și pe păsări - se infectează la sfârșitul verii, reprezentând o reală sursă de infecție pentru oameni. (Petersen și Marfin 2002).

Deși studii experimentale au dovedit că transmiterea VWN se poate realiza eficient de către majoritatea speciilor de țânțari, VWN este vehiculat, la nivel mondial, în special de către membrii complexului *Culex pipiens* (Colpitts ș.a., 2012). Această specie de țânțari este divizată în două bioforme: *Culex pipiens*-biotipul *pipiens* și *Culex pipiens*-biotipul *molestus* (Ciota 2017).

VWN este transmis gazdelor vertebrate în timpul procesului de hrănire al țânțarilor infectați. Țânțarii inspectează țesutul epidemic cu ajutorul proboscisului, pentru a injecta saliva ce conține substanțe active din punct de vedere farmacologic și pentru a localiza vasele superficiale, respectiv, sursa de sânge. Deși multe insecte hematofage pot priza sânge fără ajutorul unor glande salivare funcționale, eficiența comportamentului hematofag este strict dependentă de combaterea sistemului hemostatic al gazdei. În timpul hrănirii, toate insectele hematofage inoculează cel puțin o substanță vasodilatatoare, un inhibitor al coagulării și un inhibitor plachetar iar de cele mai multe ori saliva mai conține și proteine imunomodulatoare și antimicrobiene (Colpitts ș.a., 2012).

Deși vasele de sânge de la nivelul pielii reprezintă locul de elecție pentru insectele hematofage, în timpul sondării saliva țânțarului este injectată, în mare parte, extravascular, în straturile dermice. Pentru a localiza aceste structuri, proboscisul trebuie să parcurgă un mediu foarte elastic, ce are o rezistență crescută. Pentru a putea acționa eficient prin acest mediu, saliva poate conține componente care lichefiază locul de pătrundere (Colpitts ș.a., 2012).

Structurile pielii gazdelor acționează ca o barieră importantă pentru multe infecții, cu toate că antigenul VWN a fost detectat în piele în mai multe faze ale infecției. Replicarea virală a fost observată în țesutul dermic, la locul de inoculare, la una și la trei zile post-infecție iar în cazul VWN s-a dovedit că difuzează și în zonele laterale ale pielii față de locul de inoculare și că virusul infecțios persistă pe piele la locul de inoculare timp de cel puțin 14 zile după infectare (Colpitts ș.a., 2012).

Replicarea virală are loc în citoplasma celulei gazdă, după care virionii sunt asamblați în reticulul endoplasmatic și sunt transportați prin formarea de vezicule în afara celulei, prin exocitoză (Garcia, Hasbun, și Murray 2015).

Principalul vehicul epidemiologic ce asigură dispersia virusului în diferite zone geografice este reprezentat de păsările migratoare. Acestea sunt infectate de către țânțarii care în timpul prizei de sânge inoculează saliva încărcată viral. În cazul păsărilor naive din punct de vedere imunologic, pot dezvolta o viremie de până la 100 de zile, timp în care pot infecta țânțarii (Garcia, Hasbun, și Murray 2015).

În ciclul de transmitere al virusului (fig. 1.4), atât oamenii cât și restul mamiferelor au rolul de „fundătură epidemiologică”, datorită incapacității acestora de a asigura un nivel suficient de crescut al viremiei pentru a permite infectarea ulterioară a țânțarilor. Gazdele accidentale sunt capabile să genereze un răspuns imunologic și semne clinice, ca rezultat al infectării (Garcia, Hasbun, și Murray 2015). Aproximativ 8% din caii infectați cu VWN dezvoltă semne clinice neurologice, în special encefalomielită și ataxie, în timp ce la oameni infecția se manifestă clinic la aproximativ 20-40% din subiecții umani (Calzolari M. ș.a., 2015).

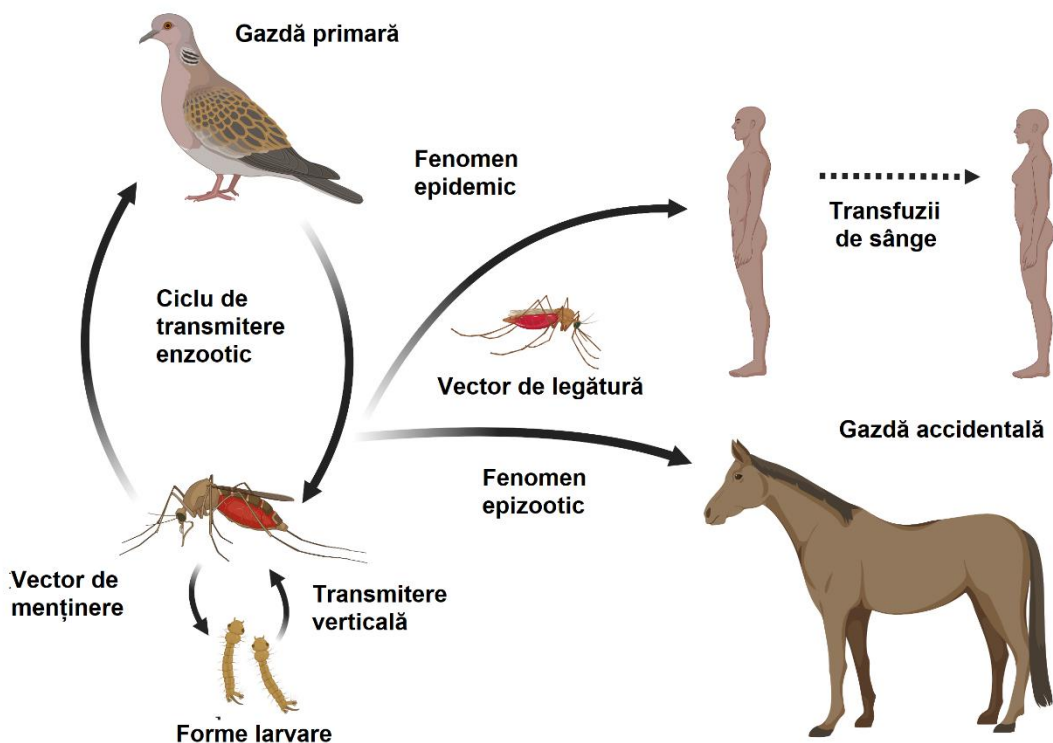


Figura 1.4 Mecanismele de transmitere ale VWN

Figure 1.4 Overview of WNV transmission cycle
(După Tomazatos A., 2020)

Infecția cu VWN la gazdele incidentale, nu este importantă pentru integritatea ciclului de transmitere a virusului. Prin urmare, cazurile umane și cele de la cai apar după amplificarea virală, ce are loc între țânțari și gazdele vertebrate competente (Calzolari M. ș.a., 2015). În ceea ce privește transmiterea interumană a virusului, studiile au confirmat

vehicularea virusului ca urmare a expunerii în timpul sarcinii (de la mamă la făt) sau prin intermediul altor rute, cum ar fi transfuziile de sânge sau transplantul de organe (Pisani ș.a., 2016; Paty ș.a., 2013).

Epidemiologie moleculară. În prezent, VWN poate fi încadrat în nouă linii genetice posibile (Benzarti ș.a., 2019, Ciota ș.a., 2017), deși, ca urmare a gradului ridicat de divergențe a secvențelor și a diferențelor ecologice și biologice, multe dintre acestea ar putea fi încadrate ca sublinii (fig. 1.5).

Între liniile genetice și între tulpinile virale aparținând aceleași linii, pot exista variații care vizează patogenitatea și virulența (Benzarti ș.a., 2019). De exemplu, virusul Rabensburg, izolat în Cehia și încadrat inițial în linia 3 a VWN, prezintă o divergență a secvențelor de peste 25%, neavând nici o gazdă vertebrată (Ciota 2017) și nici nu a infectat, în condiții experimentale, culturile celulare de mamifere sau aviare ori ouăle embrionate (SPF) (Benzarti ș.a., 2019).

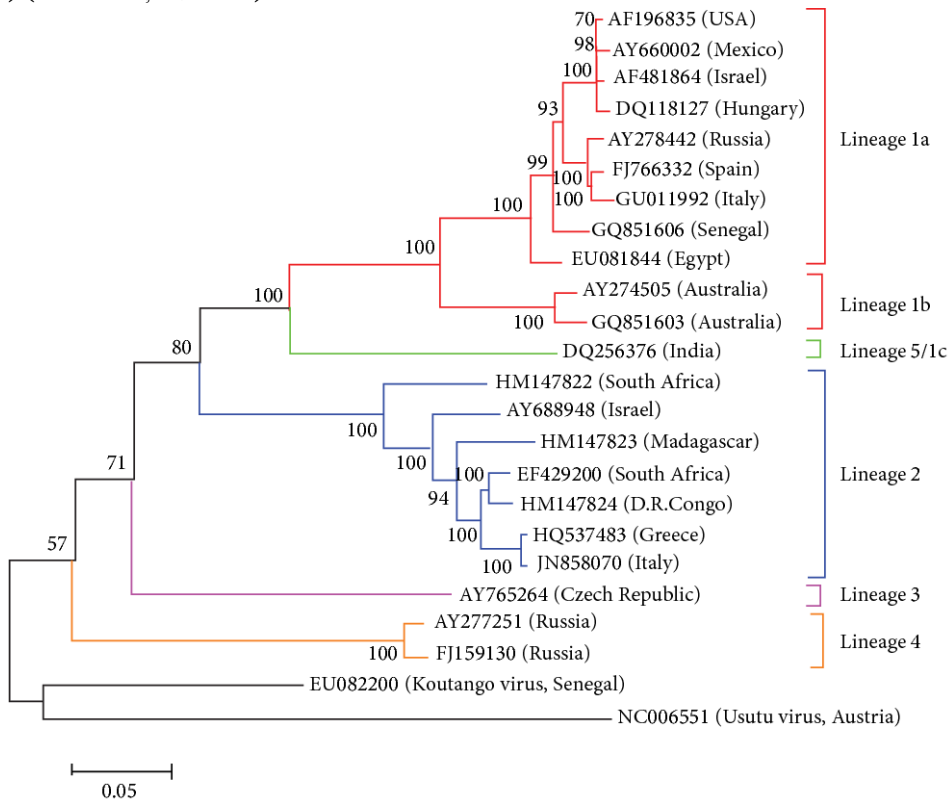


Figura 1.5 Principalele linii genetice ale VWN
Figure 1.5 Major WNV lineages
(După Chancey ș.a., 2015)

Clasificarea filogenetică a izolatelor nu este corelată în mod consecvent cu distribuția geografică a VWN, aflată într-o continuă dinamică, repartiția focarelor de boală

putând fi atribuită diseminării complexe prin intermediul păsărilor migratoare (Gray și Webb 2014).

Dintre cele nouă linii genetice, importanță medicală evidentă au doar liniile 1 și 2, ambele fiind considerate endemice în partea de sud-est a Europei (Kolodziejek ș.a., 2018). Primele două linii genetice au fost, de asemenea, responsabile pentru focarele majore înregistrate la animale și la oameni (Benzarti ș.a., 2019).

Majoritatea tulpinilor responsabile de epidemiile din Europa au fost incluse în prima linie genetică iar mare parte dintre acestea sunt grupate într-o ramură denumită „grupul Mediteranean European/Kenyan”. Tulpinile aparținând acestui grup au o patogenitate redusă pentru cai și oameni iar față de păsări au un grad redus de patogenitate sau nu sunt patogene. În schimb, tulpinile grupate în ramura Israeliană/Americană, se individualizează printr-o patogenitate exaltată față de păsări iar în Statele Unite determină îmbolnăviri și mortalitate la cai (Chancey ș.a., 2015).

Prima linie genetică este divizată la rândul său în trei ramuri, 1a, 1b (sau virusul Kunjin) și 1c, fiind cea mai răspândită în SUA (tulpina NY99), Africa (KN3829), Europa și Orientul Mijlociu. Ramura 1a include izolate din Africa, Europa, Orientul Mijlociu, Asia și America. Ramura 1b este reprezentată sub forma virusului Australian Kunjin (VKUN) (Lanciotti ș.a., 2002). În ceea ce privește ramura 1a, Zehender și autorii, au divizat această ramură în subramurile A și B, acestea conținând majoritatea izolatelor din estul și vestul Europei (Zehender ș.a., 2011). Ultima ramură a liniei 1 include izolate din India (Lanciotti ș.a., 2002; Ciccozzi ș.a., 2013)

Până în anul 2000, cea de-a doua linie genetică cuprindea tulpini endemice din Africa Sub-Sahariană și Madagascar, fiind considerate ca având o patogenitate redusă (Tsai ș.a., 1998). După anul 2005, episoadele cauzate de această linie au început să se extindă în Europa, ulterior aceasta fiind implicată în apariția cazurilor umane cu forme neuro-invazive și deznodământ fatal în Rusia, Italia, Ungaria și Grecia dar și în focare de boală la cabaline și păsări (Gray și Webb 2014). Analizele filogenetice au relevat faptul că linia genetică 2 detectată în estul Europei este împărțită în două ramuri: central europeană/Ungară și est-Europeană/Rusă. Prima ramură a provocat epidemii explozive în Grecia și Serbia, iar cea de-a doua, în Volgograd și în România (Zehender ș.a., 2017).

Studiile bazate pe analiza filogenetică și filogeografică, efectuate pe baza secvenței întregului genom, au demonstrat că majoritatea tulpinilor din ramura central europeană, sunt împărțite în două grupuri: central/sud-vest european și unul balcan. De asemenea, s-a demonstrat că o dată pătrus într-o regiune, virusul suferă modificări locale (Christova ș.a., 2020)

În România, linia genetică 2 a VWN a fost detectată în anul 2010, când a provocat 57 de cazuri umane. Spre deosebire de distribuția geografică din alte țări, unde cazurile au fost grupate în anumite zone, în România distribuția cazurilor este extinsă pe cea mai mare parte a teritoriului. Până în anul 2015, prevalența la om a fost cuprinsă între 11 și 32 de cazuri iar în anul 2016 a ajuns la 93 de cazuri confirmate. Investigațiile moleculare au

relevant faptul că tulpina virală implicată în episoadele din perioada 2010-2013 este înrudită cu tulpina Volgograd 2007 (Sebastián Napp, Petrić, și Busquets 2018).

Persistența virusului în țânțarii aflați în diapauză, urmată de transmiterea acestuia pe cale verticală și apoi completarea ciclului de transmitere prin infectarea păsărilor, fără a fi necesară reintroducerea virală, se presupune că ar fi mecanismul de continuitate virală și endemizare în Europa a liniei genetice 2 (Rudolf ș.a., 2017).

Linia genetică 3 a VWN este reprezentată de o pereche de izolate de la specia de țânțari *Culex pipiens* colectați din regiunea de graniță a Republicii Ceha cu Austria în anii 1997 și 1999. Studiile experimentale au demonstrat că această linie afectează doar țânțarii, fiind denumită și virusul Rabensburg (Chancey ș.a., 2015).

Linia 4 cuprinde virusuri circulante în Rusia încă din 1988, incluzând un izolat de la o căpușă (*Dermacentor marginatus*) din Caucaz și izolate de la reptile și țânțari din zona râului Volga. Linia 5, considerată inițial ca fiind ramura 1c a primei linii genetice, include izolate de la oameni și țânțari din India începând cu anul 1955 (Chancey ș.a., 2015; (Gray și Webb 2014).

Alte linii genetice potențiale ale VWN mai includ: tulpina Sarawak a virusului Kunjin, izolată din Malaezia și care a fost încadrată ca fiind linia genetică 6, virusul Koutango din Africa, care este strâns înrudit cu celelalte linii ale virusului și care poate fi considerat a șaptea linie genetică a VWN (Chancey ș.a., 2015) iar o linie raportată în Senegal a fost considerată o posibilă a opta linie (Pachler ș.a., 2014).

Pe lângă liniile genetice propuse, analiza filogenetică a unui izolat detectat într-un extras dintr-un eșantion de țânțari din specia *Uranotenia unguiculata* a dus la propunerea includerii liniei WNV-Uu-LN-AT-2013, din Austria, fie ca o posibilă nouă linie sau ca sublinia 4c a liniei genetice 4 (Pachler ș.a., 2014).

Iernarea VWN și sezonabilitatea infecțiilor. VWN a fost izolat pentru prima dată în anul 1937, în districtul West Nile din Uganda. În Europa, virusul a fost detectat în anul 1958, în Albania iar ulterior a fost detectat în mod curent, atât la oameni cât și la cai (Chaskopoulou ș.a., 2016).

Amplificarea virală și infectivitatea țânțarilor este dependentă complet de prezența unei populații-rezervor de păsări, naive din punct de vedere imunologic, acestea fiind responsabile de menținerea virusului în mediu și ca o verigă critică în lanțul de transmitere a virusului (Montgomery și Murray 2015).

Conform Napp, Petrić, & Busquets (2018), țările care au fost afectate într-un an de episoade de infecție cu VWN vor avea cazuri noi în următorul an, menținându-se focalitatea din anii precedenți. Rezultatele studiului respectiv au demonstrat că există o proporționalitate directă între numărul de cazuri dintr-o anumită regiune și probabilitatea reapariției cazurilor în zona respectivă în următorul an. Astfel, în 100% dintre situații, dacă într-un an incidența cazurilor umane este de minim 15, în următorul an focalitatea se menține în zona respectivă. Probabilitatea reapariției cazurilor de infecție cu VWN scade la 73%, dacă incidența este cuprinsă între 10 și 15 cazuri sau la 40%, dacă sunt raportate între

patru și nouă cazuri. Așadar, numărul cazurilor umane dintr-o anumită zonă, într-un anumit an, pare să fie corelat pozitiv cu riscul reapariției VWN în zona respectivă în următorul an (Sebastián Napp, Petrić, și Busquets 2018).

Evaluarea sezonality transmiterii VWN indică faptul că, de obicei, cazurile umane încep să fie raportate la debutul lunii iulie. Transmiterea virusului continuă până în lunile august, septembrie, uneori chiar și în octombrie sau chiar mai târziu (Sebastián Napp, Petrić, și Busquets 2018).

Durata relativ redusă a sezonului de transmitere a VWN evidențiază faptul că fenomenul de iernare sau „*overwintering*”, indiferent de mecanism, trebuie să permită supraviețuirea virusului timp de mai multe luni în absența difuzării sale de către vectori. Infecția virală la anumite specii de păsări pare să determine persistența și evoluția virusului în unele țesuturi (creier), chiar și pentru câteva luni de la prima infecție (Sebastián Napp, Petrić, și Busquets 2018). Această formă cronică de infecție, cu persistența virusului la nivelul creierului, ar putea contribui la propagarea prin transmitere orală la păsările de pradă. Pe de altă parte, persistența virusului în femelele de țânțari aflate în hipobioză, în locurile ferite de îngheț, explică supraviețuirea virusului în timpul iernilor europene (Bakonyi ș.a., 2016; Montecino-Latorre și Barker, 2018).

În ciuda progresului înregistrat în domeniul medical, epidemiile infecțioase încă au efecte nefaste și imprevizibile asupra oamenilor. Un astfel de agent patogen, a cărui infecție are ca rezultat o plajă variată de simptome clinice, este infecția VWN, un agent patogen din categoria B, endemic în diferite părți ale Africii, Asiei și Europei. VWN prezintă tropism neurologic, are capacitatea de provoca epidemii de mare intensitate și imprevizibile (Chaskopoulou ș.a., 2016), fiind strâns înrudit cu virusurile ce provoacă febra Dengue, febra galbenă și encefalita Japoneză (Bigham ș.a., 2011).

Factori ce contribuie la implicarea neurologică. Creșterea permeabilității barierei hemato-encefalice, ca urmare acțiunii citokinelor, prezintă o importanță deosebită în susceptibilitatea la neuroinfecția cu VWN. Elementele care duc la scăderea integrității barierei hemato-encefalice contribuie la sporirea susceptibilității la infecția cu VWN. Pasajul virusului către sistemul nervos central poate fi facilitat de acțiunea citokinelor, moleculele de adeziune, proteaze, de pasajul leucocitelor și al macrofagelor infectate, de celule T sau neutrofile. Factorii de necroză tumorală alfa (cașectina) pot contribui în formele severe de boală la creșterea permeabilității barierei hemato-encefalice sau pot avea rolul de a proteja encefalul, prin susținerea pasajului monocitelor în creier (Montgomery & Murray, 2015).

Imunitatea adaptativă. În infecția cu VWN, imunitatea adaptativă are rolul de a produce anticorpi specifici protectivi, IgM și IgG. Acești anticorpi apar la scurt timp după instalarea viremiei și înainte ca nivelul de ARN să devină nedetectabil, fenomen ce are loc, în medie, la 13,2 zile post-infecție. Diferite studii au demonstrat că nivelul seric al anticorpilor anti-VWN (anti proteină de înveliș) a rămas relativ constant până la un an iar uneori până la opt ani de la infecție, neexistând diferențe notabile între nivelurile

anticorpilor pacienților ce au suferit de forme severe și cei cu un istoric asimptomatic de infecție cu VWN (Montgomery & Murray, 2015).

Manifestări clinice. De cele mai multe ori, infecția cu VWN este asimptomatică, semnele clinice fiind reprezentate de episoade febrile și simptome asemănătoare gripei (artralgie, mialgie și slăbiciune musculară, cefalee, și frisoane). În cazurile grave, cu forme nervoase neurodegenerative (aprox. 1% din cazuri), aspectele clinice sunt caracterizate prin meningită, encefalită, paralizie flască acută și sechele neurologice (Montgomery & Murray, 2015; Jean, Honarmand, Louie, & Glaser, 2007).

Factorii individuali de risc, dependenți de subiecți, ce au fost identificați în mod particular ca determinanți, sunt reprezentați de vârsta înaintată precum și de imunosupresia. De asemenea, s-a demonstrat că oamenii care locuiesc în proximitatea apelor stătute, unde femelele de țânțari își depun ponta și unde acestea își au habitatele, sunt mai expuși riscului de a fi infectați (Montgomery & Murray, 2015).

Studii efectuate pe pacienți internați încă de la debutul infecției cu VWN, confirmă invariabil că factorii de risc implicați frecvent în dezvoltarea formelor severe de infecție cu virusul West Nile sunt reprezentați de vârsta înaintată, imunosupresia, bolile cardiovasculare, hipertensiunea și diabetul (Bode, Sejvar, Pape, Campbell, & Marfin, 2006; Jean ș.a., 2007). De asemenea, pacienții care au raportat un consum excesiv de alcool și tutun au fost mai expuși riscului. În cazul pacienților cu encefalită cu virus West Nile (EWN), deznodământul fatal a fost asociat cu vârsta înaintată, imunosupresia, intubarea endotraheală și un istoric de accident vascular cerebral. Alături de aceștia, alți factorii individuali incriminați sunt reprezentați de bolile renale în forme cronice, infecția cu virusul hepatitei C (Montgomery & Murray, 2015) dar și sexul masculin (Jean ș.a., 2007).

Dintre factorii menționați, hipertensiunea și diabetul au ponderea cea mai crescută în rândul pacienților, aportul celor două afecțiuni asociate la formele severe de infecție cu VWN datorându-se slăbirii sistemului imunitar și creșterii intensității nivelului și duratei viermiei, în cazul diabetului, în timp ce hipertensiunea arterială perturbă bariera hemato-encefalică, favorizând pătrunderea virusului în sistemul nervos central (Jean ș.a., 2007).

Febra West Nile (FWN). Din punct de vedere clinic, FWN este o boală autolimitativă ce afectează toate categoriile de vârstă dar cu preponderență tineretul, febra WN fiind forma cea mai frecventă de infecție. După o perioadă de incubație de până la 14 zile, apar manifestările clinice sub forma unui puseu febril, dureri de cap, oboseală și mialgii. Alături de aceste forme, mai sunt prezente simptome gastrointestinale ce includ nausea și vomă, manifestări ce conduc la deshidratare. Sindromul febril mai poate fi asociat și cu apariția unor erupții cutanate nepruriginoase la nivelul extremităților, palme sau tălpi. FWN este urmată de vindecarea completă, uneori persistând unele sechele manifestate printr-o stare de oboseală, cefalee sau dificultăți de concentrare. Cazurile de mortalitate întâlnite ca urmare a acestei forme de boală au fost remarcate la persoanele în vârstă sau imunocompromise, mortalitate cauzată frecvent de apariția complicațiilor cardio-pulmonare (Sejvar, 2014).

Forme neuroinvazive apar în mai puțin de 1% dintre cazuri, fiind frecvente la persoanele regăsite în categoriile de risc: vârstă înaintată, imunosupresie și boli cardiovasculare.

Deși încărcătura virală a urinei la pacienții cu forme neuroinvazive este mai crescută, comparativ cu cea a pacienților cu febră, aceștia din urmă, cei fără implicații neurologice, elimină virusul prin urină o perioadă mai îndelungată decât cei cu forme neuroinvazive. Urina pacienților infectați este un mediu complex ce conține numeroși inhibitori ai reacției de polimerază în lanț (PCR) și factori care contribuie la alterarea conservării probei. (Garcia, Hasbun, și Murray 2015).

Meningita West Nile (MWN). Debutază brusc, cu un sindrom febril, dureri de cap și rigiditate nuchală. La acestea se mai asociază fotofobie, simptome gastrointestinale (nausea, vomă, diaree) și deshidratare, exacerbând durerea de cap. MWN este asociată frecvent cu un prognostic favorabil, deși, ca în cazul FWN, pot persista cefaleea, oboseala și mialgia (Sejvar, 2014).

Encefalita West Nile. În ceea ce privește semnele clinice întâlnite în Encefalita West Nile (EWN), acestea variază de la forme ușoare până la encefalopatii, comă și în final exitus. Manifestările acestei forme sunt mai frecvente la indivizii mai în vârstă, în special la cei peste 55 de ani, precum și la cei imunocompromiși (Ravindra ș.a., 2004). Pacienții cu EWN dezvoltă un tremur bilateral, în special la nivelul extremităților superioare, acest tremur tinzând să fie postural. În această formă se mai întâlnesc mioclonii în timpul somnului, predominant la nivelul feței și a extremităților superioare. Alături de aceste semne clinice, mai poate fi prezentă o formă de Parkinson, ce include bradikinezie, astazie, simptome asociate cu ataxie și dificultăți funcționale. A mai fost descrisă și ataxia cerebeloasă asociată cu instabilitatea trunchiului și dificultăți de deplasare (Sayao ș.a., 2004). Aceste mișcări anormale apar după debutul schimbărilor statusului mental și, în mod normal, se remit cu timpul. În cazul pacienților care se recuperează din forme severe de encefalită, tremurul și parkinsonismul mai pot persista (Sejvar 2014).

Formele clinice de evoluție din EWN denotă neurotropismul specific al virusului pentru structurile extrapiramidale (Sejvar, 2014).

Poliomielita cu virus West Nile (PWN). Acest sindrom apare la aproximativ 13 % din pacienții care prezintă forme neuroinvazive. PWN este produsă ca urmare a afectării neuronilor motori de la nivelul măduvei spinării, concretizându-se clinic prin parezie sau paralizia flască a membrelor. Aceste caracteristici clinice dramatice permit diferențierea față de starea de slăbiciune musculară difuză descrisă de pacienții cu alte forme întâlnite în infecția cu VWN. De obicei, PWN apare la scurt timp de la debutul bolii, în general în decursul a 24-48 de ore, paralizia fiind asimetrică. În această formă clinică mai poate fi observată o slăbiciune bilaterală a nervilor faciali. Cea mai severă manifestare a PWN presupune implicarea structurilor respiratorii, ceea ce duce la paralizia mușchilor intercostali și diafragmatici și, în consecință, la stop respirator (Hayes ș.a., 2005).

Alte manifestări clinice mai comune întâlnite în infecția cu VWN sunt reprezentate de coriorietinită și vitrită, aceste manifestări apărând după FWN și boala neuroinvasivă (Sejvar 2014). La pacienții cu infecție cu VWN au mai fost raportate disfuncții ale vezicii urinare și modificări ale transpirației, inclusiv hiperhidroza și anhidroza (Bai ș.a., 2019).

1.1.2 Virusul Usutu (VUSU)

1.1.2 Usutu Virus (USUV)

Virusul Usutu are un genom ARN, monocatenar și este inclus în grupul mobovirusurilor din genul *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Aparținând complexului antigenic al encefalitelor Japoneze, VUSU este strâns înrudit cu agenți patogeni precum VWN, virusul encefalitei Murray Valley (VEMV) și virusul encefalitei St Louis (VESL) (Gaibani și Rossini 2017). Asemeni VWN, ciclul de transmitere al VUSU este dependent de existența țânțarilor și a păsărilor iar oamenii, precum și alte mamifere, reprezintă gazde accidentale (Benzarti ș.a., 2019).

Structura genomului. VUSU este un virus de mici dimensiuni, sferic cu un înveliș lipidic derivat din membrana celulei gazdă. Virionul are între 40 și 60 nm în diametru și conține un genom ARN cu sens pozitiv, cu lungimea de 11 Kb. Genomul este de tip ARN monocatenar, cu un cadru unic de citire deschis (ORF) și două regiuni necodate (UTR). Capetele 5 și 3 au o lungime variabilă la diferite tulpini, cuprinsă între 95-96 nt și 63-664 nt (Gaibani și Rossini 2017).

Cadrul de citire prevăzut este tradus printr-o poliproteină unică de 3434 aminoacizi, care este clivată post-tranlațional în trei proteine structurale (a capsidului, de înveliș și pre-membranară) și opt proteine nestructurale (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B și NS5) (fig. 1.6). Asemănător altor flavivirusuri transmise de țânțari, genele care codifică proteinele structurale sunt localizate la capătul 5' al genomului viral (Gaibani și Rossini 2017).

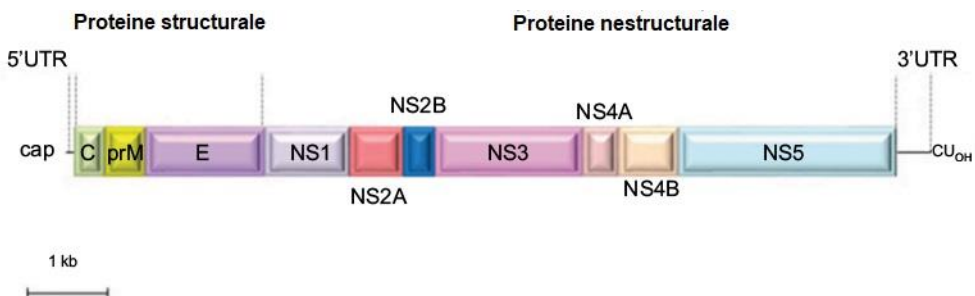


Figura 1.6 Organizarea genomului VUSU

Figure 1.6 Genomic structure of USUV

(După Saiz și Blázquez, 2017)

Proteina capsidei (C) formează nucleul central al virionului și este asociată ARN-ului viral. Glicoproteina de înveliș (E) mediază leagarea de celulele gazdă și susține pătrunderea virusului în celulele gazdei. Proteina pre-membranară (prM) este necesară asamblării și maturării virionului. Proteinele nestructurale deservește diferite funcții în timpul infecției virale (Gaibani și Rossini 2017).

Confirmând apartenența la grupul arbovirusurilor, VUSU prezintă un aspect valabil pentru toate virusurile transmise prin intermediul insectelor hematofage, justificând evoluția în continuă dinamică a acestora: abilitatea de a invada teritorii noi (Benzarti ș.a., 2019). Astfel, mecanismul natural de transmitere implică ciclul țânțar-pasăre-țânțar, în care țânțarii cu rol de vectori facilitează transmiterea virală la păsările cu rol de gazde amplificatoare, dar și la oameni, cai și rozătoare, acestea din urmă fiind gazde accidentale (Ashraf ș.a., 2015).

La vertebratele cu rol de gazde amplificatoare (păsări), virusurile Usutu, West Nile, Tembusu și Bagaza, sunt considerate epornitice, capabile să cauzeze epizootii în rândul păsărilor (Benzarti ș.a., 2019).

VUSU a fost izolat pentru prima dată din țânțarii din specia *Culex neavei*, capturați în proximitatea râului Usutu, în Swaziland, Africa de Sud în anul 1959, virusul dispersându-se ulterior pe continentul african. În ultimele decenii, virusul a fost introdus în repetate rânduri și în Europa, de către păsările migratoare.

În ceea ce privește tropismul virusului, s-a demonstrat că acesta prezintă capacitate infectantă asupra unui număr mare de linii celulare provenite de la diferite specii: oameni (celule dendritice și Hela), ecvine (ED), bovine (MDBK), porcine (PK – 15), hamster (BHK – 21, BF), canine (MDCK, DK), feline (CR), maimuță (LLC-MK2, Vero), iepure (RK – 13), șobolan (C6), țestoasă (TH1), păsări (GEF). Efectul citopatic a fost observat pe următoarele linii celulare: Vero, GEF, CRFK, DN1.Tr, E, EA.hy.926, FoLu, OHH1.K, OK, PK(15), Sf 1 Ep, A549, Hep-2, KB și Mv 1 Lu (Clé ș.a., 2019).

Epidemiologie. Deși prima raportare a VUSU în Europa a fost asociată unei mortalități considerabile în populațiile de mierle (*Turdus merula*), rândunici (*Hirundo rustica*) și huhurezi bărboși (*Strix nebulosa*) din împrejurimile Vienei, în anul 2001 (Benzarti ș.a., 2019), introducerea virusului a fost dovedită retrospectiv, în urma analizei unor eșantioanele de țesut colectate de la păsări moarte în regiunea Toscana (Italia), în anul 1996 (Weissenböck ș.a., 2013). În anii următori, a fost confirmată extinderea virusului în țările vecine, inclusiv Italia, Germania, Spania, Ungaria, Elveția, Polonia, Anglia, Republica Cehă, Belgia, Serbia și Grecia (Sebastián Napp, Petrić, și Busquets 2018). Locul de proveniență a virusului izolat în centrul Europei s-a considerat a fi Senegal iar identificarea unei tulpini africane în august 2015 în Berlin (Germania) a relevat re-introducerea continuă virusului (Benzarti ș.a., 2019).

În anul 2018, virusul s-a extins rapid în partea de vest a Europei, asociat unei epidemii de ampolare cu VWN (fig. 1.7). Această raportare nu sugerează doar expansiunea continuă a virusului dar și colonizarea unor noi nișe ecologice.

Endemizarea în diferite țări din Europa ar putea fi explicată prin transmiterea remanentă în populația de păsări din regiunile cu focalitate, dar fără semne clinice semnificative sau detectabile. Mai mult decât atât, presupusele mecanisme ale persistenței virale între două episoade epizootice implică fie țânțarii infectați aflați în diapauză, fie gazdele naturale cu rol de rezervor, fie transmiterea verticală, în descendență, a virusului la țânțari (Clé ș.a., 2019).

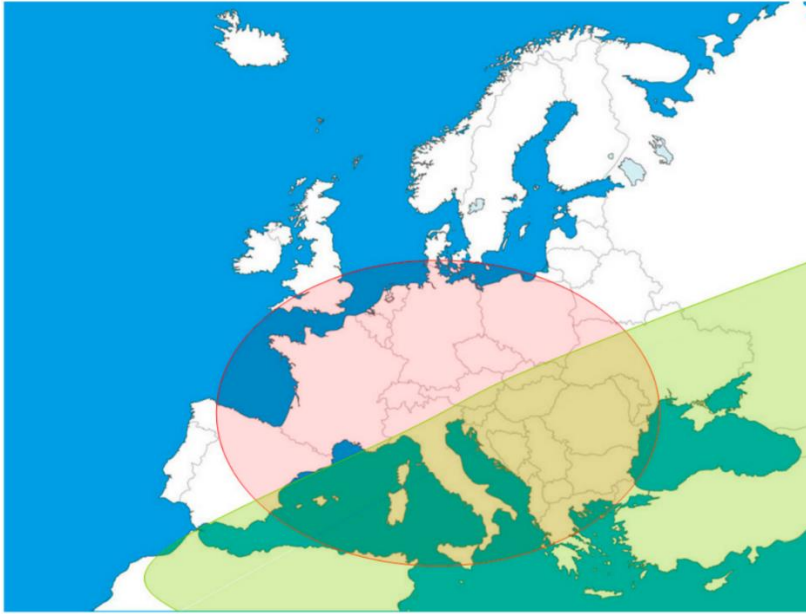


Figura 1.7 Distribuția virusurilor Usutu (roșu) și WN (verde) la nivelul Europei
 Figure 1.7 Geographic distribution of Usutu (red) and West Nile (green) viruses in Europe
 (După Zannoli și Sambri, 2019)

Gazde, vectori și mecanismul de transmitere. Ciclul natural de transmitere al VUSU implică țânțarii ornitofili ca vectori și păsările ca și gazdă amplificatoare. Mecanismul de transmitere a virusului este similar cu cel al altor flavivirusuri încadrate în serocomplexului VEJ, oamenii fiind considerați gazde accidentale. Păsările din diferite specii pot fi infectate cu VUSU iar o parte dintre ele pot dezvolta simptome ale infecției. Virusul a fost detectat la 62 de specii de păsări din țările africane și europene (Gaibani și Rossini 2017).

Principalul agent de difuzare pe distanțe mari și de introducere a virusului în Europa este reprezentat de păsările migratoare, structura genetică a virusului urmărind geolocalizarea și tiparul rutelor migratorii ale păsărilor (Benzarti ș.a., 2019). S-a demonstrat că VUSU are capacitatea de a infecta 58 de specii de păsări din 13 ordine și 16 familii (Clé ș.a., 2019). Diferite specii de păsări sălbatice migratoare (de exemplu, *Falco tinnunculus*, *Acrocephalus scirpaceus*, *Sylvia curruca*, *Sylvia communis* și *Ficedula hypoleuca*) sunt considerate ca fiind responsabile de introducerea USUV în Europa din Africa, în timp ce passeriformele (*Pica pica*, *Passer domesticus*, *Gallus gallus* și *T. merula*), cu rol de gazde

amplificatoare, sunt considerate responsabile de diseminarea și menținerea virusului într-un ciclu enzootic în Europa (Gaibani și Rossini 2017).

În ceea ce privește vectorii, virusul a fost izolat de la diferite specii de țânțari dar spre deosebire de VWN, acesta nu a fost găsit în căpușe. Deși virusul a fost depistat în țânțari din genurile *Aedes*, *Anopheles*, *Ochlerotatus*, *Coquilletidia* și *Mansonia*, cel mai frecvent vector pentru VUSU în Europa este țânțarul din specia *Culex pipiens* (Gaibani și Rossini 2017). La această specie, studiile de vector-competență au demonstrat o capacitate de transmitere mai mare a VUSU decât pentru VWN, în condiții climatice de 28 °C (Clé ș.a., 2019).

Privitor la transmiterea prin contact direct a virusului, studiile experimentale efectuate pe găini și găște domestice, specii la care infecția letală nu a fost descrisă, nu au demonstrat această modalitate de transmitere (Benzarti ș.a., 2019).

Epidemiologie moleculară. Variabilitatea genetică a VUSU a fost explorată utilizând analiza filogenetică, prin secvențierea întregului genom dar și prin secvențierea parțială a genelor de înveliș și a proteinei nestructurale 5 (NS5) (Roesch ș.a., 2019). Până în prezent, izolate virale au fost încadrate în opt linii genetice, împărțite, pe baza originii geografice a izolatelor, în două grupuri majore: African și European. Pe baza analizelor filogenetice utilizând gena NS5, s-a demonstrat că tulpinile izolate din Africa sunt încadrate în trei linii distincte, în timp ce grupul european este compus din cinci linii diferite (Gaibani și Rossini 2017): Africa 1, 2 și 3 și Europa 1, 2, 3, 4 și 5. Studiile moleculare efectuate pe secvențele de nucleotide și aminoacizi ale acestor izolate de la vectori, oameni și păsări, evidențiază substituții semnificative, pentru unele dintre ele sugerându-se legătura cu neuro-invazivitatea virală (Benzarti ș.a., 2019).

Manifestările clinice la om. Dacă la începutul anilor 2000 infecția cu VUSU era considerată a fi non-patogenică pentru om, nefiind cazuri clinice confirmate (Hubálek 2008), în anul 2009, două cazuri neuro-invazive asociate virusului Usutu au fost raportate în Italia. Actualmente, deși infecțiile asociate VUSU sunt de cele mai multe ori asimptomatice sau cu un tablou clinic pauper (Clé ș.a., 2019), co-existența cu VWN reprezintă un real risc pentru transfuziile de sânge (Domanović ș.a., 2019).

Atunci când sunt exprimate clinic, simptomele variază de la febră persistentă, migrene (Vázquez ș.a., 2011) și erupții cutanate, la meningoencefalită. Recent, VUSU a fost detectat și la donatorii de sânge din Austria (Sebastián Napp, Petric, și Busquets 2018).

Studii recente, efectuate prin PCR, pe probe de ser obținute de la donatori de sânge din Germania, au demonstrat portajul virusului la subiecții asimptomatici, situație similară observată și la donatorii din Austria (Zaaijer HL ș.a., 2019).

Până în prezent, în Europa au fost confirmate 46 de cazuri de infecție acută cu VUSU la oameni, mare parte dintre acestea fiind descoperite la donatorii de sânge (Clé M ș.a., 2019).

Co-circulația VUSU împreună cu VWN a fost confirmată la oameni, atât serologic, prin detecția anticorpilor neutralizanți (Vilibic-Cavlek ș.a., 2014), cât și prin detecția ARN-

ului (Aberle ș.a., 2018). Co-existența celor două virusuri, în același areal geografic și în aceleași nișe ecologice, ar putea conduce la o competiție între cele două entități. O competiție asemănătoare între două flavivirusuri înrudite a fost observată între VWN și virusul Encefalitei St. Louis (VESL). Deși ESL era endemică în sudul Californiei, circulația virală a scăzut drastic în 2003, după emergența VWN. Aceasta a condus la ipoteza conform căreia VESL mai poate produce doar re-emergențe sporadice, atât timp cât VWN infectează aceleași gazde și are aceleași specii de țânțari ca vectori (Roesch ș.a., 2019).

Manifestări clinice la animale. În infecția naturală, păsările prezintă manifestări clinice la extreme: fie simptome ușoare, fie forme severe. Acestea din urmă includ encefalită, degenerare miocardică și necroza ficatului și a splinei (Gaibani și Rossini 2017).

Infecția cu VUSU, la păsările sălbatice și la cele captive, are un caracter înalt patogen, ca o consecință a tropismului și a virulenței într-o varietate mare de organe și țesuturi. În infecția naturală la păsări au fost descrise multiple tulburări ale sistemului nervos central. Cele mai frecvente semne clinice sunt prostrație, dezorientare, ataxie și pierderi în greutate. Anatomopatologic, au fost observate infiltrate inflamatorii, formate din celule limfoide și histiocitare, în cord, ficat, rinichi, spină și creier iar principalele aspecte macroscopice remarcate au fost hepato- și splenomegalia (Clé ș.a., 2019).

Exceptând păsările, virusul a mai fost detectat și la mamifere, fiind izolat din creier de la lilieci (*Pipistrellus*) în Germania. Semnale serologice au fost raportate și la cai, în Italia, Serbia, Croația, Polonia și Spania, la câini militari, în Maroc, la porci mistreți, în Serbia, la rumegătoare sălbatice, în Spania (Clé ș.a., 2019), la rozătoare, în Senegal (Diagne ș.a., 2019), precum și la căprioare și veverițe, specii la care virusul nu are un efect patogen la fel de puternic ca la gazdele aviare (Roesch ș.a., 2019).

1.1.3 Virusul encefalitei de căpușă (VEC)

1.1.3 Tick borne encephalitis virus (TBEV)

Encefalita transmisă de căpușă/*Tick borne encephalitis* (TBE) este o importantă infecție virală a sistemului nervos central (Bogovic 2015), produsă de un virus de mici dimensiuni, anvelopat, ce aparține familiei *Flaviviridae*, genul *Flavivirus*, serocomplexul Encefalitelor transmise de căpușele din specia *Ixodes ricinus*. TBEV este endemică într-un areal geografic extins, din Europa Centrală și Peninsula Scandinavă până în Japonia (Vilibić-Čavlek b ș.a., 2014). În Europa, primul caz de infecție cu TBEV la oameni a fost raportat la începutul anilor 1930 iar anual sunt înregistrate peste 3000 de cazuri (Knap și Avšič-Županc, 2015).

Etiologie. Virionul matur este compus din trei proteine structurale: capsidă (C), membrană (M) și de înveliș (E). Proteina E este antigenul major care induce producția de anticorpi neutralizanți. Pe baza analizelor genetice, TBEV prezintă trei subtipuri, strâns înrudite din punct de vedere genetic: European (Eu), Siberian (Sib) și Orientul Îndepărtat

(FE), variațiile dintre secvențele aminoacizilor fiind de 5 – 6% (Bogovic, 2015) dar diferențiate din punct de vedere geografic, clinic și al căpușelor implicate în transmitere (Vilibić-Čavlek b ș.a., 2014). În ciuda similarității genetice pronunțate, fenomenele de sănătate induse individual de fiecare subtip nu sunt echivalente (Bogovic, 2015).

Epidemiologie. TBE este endemică în țări din Europa, Siberia, nordul Chinei și Japonia. În ultimele decenii, arealul geografic al regiunilor endemice s-a extins, concomitent cu creșterea numărului de cazuri raportate. Creșterea ratei incidenței în zonele endemice poate fi consecința interacțiunilor complexe dintre factorii socio-ecologici dar și ca urmare conștientizării riscului în rândul populației precum și a evoluției metodelor de diagnostic (Bogovic, 2015). Alți factori ce au concurat la acest trend sunt reprezentați de schimbarea climatică, ce atrage după sine extinderea zonelor endemice la altitudini mai mari (până la 1500 m) și de schimbarea habitatului căpușelor dar și activitățile desfășurate în aer liber (Vilibić-Čavlek b ș.a., 2014). Deși tendința incidenței este în creștere, numărul cazurilor umane raportate anual este subestimat, deoarece TBE se declară obligatoriu doar în 16 din cele 27 de țări endemice din Europa (Bogovic 2015).

Virusul este menținut în natură în cadrul așa-numitelor „focare naturale”, prin interacțiuni dintre căpușe și vertebrate sălbatice, în principal rozătoare mici -șoricide și muridele (Vilibić-Čavlek ș.a., 2014) și mamifere insectivore (Jaenson ș.a., 2012). În ciclul de transmitere a virusului, rozătoarele au rol atât de gazde cât și de rezervor primar (Bogovic 2015). La acestea, nivelul viremic ajunge la un titru suficient de crescut pentru a infecta căpușele, pentru câteva zile (Jaenson ș.a., 2012). De asemenea, rozătoarele au și rol de sentinelă (Knap și Avšič-Županc 2015), în timp ce oamenii nu au un rol semnificativ în menținerea virusului în natură, fiind gazde incidentale, ca în cazul VWN, VUSU sau VSIN (Bogovic 2015). Mamiferele de talie mare, cum ar fi cerbii, caprele, oile și vitele, în comparație cu mamiferele mici, se consideră ca au o viremie de scurtă durată, acest mod de transmitere prin intermediul unguțelor având o importanță nesemnificativă în întreținerea TBEV (Jaenson ș.a., 2012).

În Europa, transmiterea TBEV la oameni se realizează prin intermediul căpușelor tari (familia *Ixodidae*), principalul vector fiind reprezentat de *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*). În estul Europei, în Rusia și partea de est a Asiei, căpușele din specia *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*) reprezintă vectorul implicat în mecanismul de transmitere (Bogovic, 2015). Un rol primordial în transmiterea virusului la oameni îl au nimfele de *Ixodes ricinus*, în timp ce de la *Ixodes persulcatus* femelele adulte transmit virusul la oameni (Vilibić-Čavlek ș.a., 2014). Se presupune că aproximativ 1% din totalul cazurilor de infecție cu TBEV la oameni sunt dobândite ca urmare a consumului produselor lactate nepasteurizate (virusul putând fi inactivat prin pasteurizare) provenite din turme infectate, în special de la capre. Această modalitate de transmitere trebuie considerată în special, în epidemiile locale. Focare cauzate de transmiterea orală a virusului se regăsesc în țări precum Cehia (Kriz B ș.a., 2009) și Slovenia (Hudopisk N ș.a., 2013) și în țările baltice (Bogovic, 2015). O altă modalitate de transmitere este reprezentată de infecția dobândită în laborator (Avšič-Županc ș.a., 1995).

În ceea ce privește caracterele demografice ale indivizilor afectați, în toate grupele de vârstă bărbații sunt mai afectați decât femeile și, în medie, până la 10 - 20 % dintre subiecți sunt reprezentați de copii. La această din urmă categorie, stabilirea diagnosticului poate fi indusă în eroare din cauza exprimărilor clinice nespecifice, infecția cu TBEV fiind confundată cu o meningită aseptică sau de etiologie necunoscută (Bogovic 2015).

Frecvența cazurilor de infecție cu TBEV este mai crescută în lunile calde, între aprilie și noiembrie, perioadă ce corespunde activității căpușelor (Bogovic, 2015). Intensitatea transmiterii TBEV, în timp și spațiu, depinde de prevalența infecției în populația de căpușe, de densitatea și activitatea gazdelor susceptibile și a gazdelor competente. Prevalența infecției cu TBEV în populația de căpușe este asociată disponibilității stadiilor imature care caută gazde vertebrale competente pentru transmitere, îndeosebi specii de mamifere mici (Jaenson ș.a., 2018) iar cazurile par a fi mai dependente de dinamica populației gazdă decât de factorii climatici (Palo, 2014).

În populația de căpușe, TBEV se menține în cadrul unui „triunghi” biologic ce implică interacțiunile dintre căpușa-vector, virus și gazda căpușei (Răileanu, 2016). Virusul poate fi vehiculat în timpul hrănirii pe aceeași gazdă (Vilibić-Čavlek ș.a., 2014), vertical, transovarian, trans-stadial (de la o etapă de dezvoltare la alta) și în timpul copulației, prin intermediul salivei sau lichidului seminal (Jaenson ș.a., 2012). Vectorii biologici, o dată infectați, transmit virusul toată viața (Vilibić-Čavlek ș.a., 2014).

După inocularea virusului, odată cu saliva infectantă în momentul hrănirii, acesta se replică local, la nivelul celulelor dendritice (celulele Langerhans) iar ulterior este transportat către limfonodurile locale. De la nivelul situsului inițial, virusul diseminează către țesuturile extraneurale (splină, ficat și măduva osoasă), unde multiplicarea menține viremia pentru câteva zile. În timpul fazei viremice, care clinic corespunde fazei inițiale a TBEV, virusul ajunge în creier (Bogovic, 2015).

În ceea ce privește infecția la oameni, ponderea cea mai mare a cazurilor este reprezentată de formele asimptomatice. Perioada de incubație este cuprinsă între două și 28 de zile iar în cazul transmiterii pe cale orală, perioada de incubație este redusă la trei - patru zile. La aproximativ 75% dintre pacienții diagnosticați cu TBE cu subtipul european, fenomenul de sănătate are un curs bifazic. La pacienții cu formă monofazică apar manifestări ale sistemului nervos central (meningită, meningoencefalită), în timp ce o mică parte dintre pacienți prezintă febră cu dureri de cap, dar fără meningită, formă clinică denumită „abortivă”. Faza inițială este corelată cu viremie și semne nespecifice (febră moderată, dureri de cap, mialgii și artralгии, oboseală, anorexie), având o durată de până la o săptămână și este urmată de ameliorarea stării de sănătate, cu o durată de până la 21 de zile. Ulterior, în cea de-a doua fază, la aproximativ 50% dintre pacienți sunt prezente semne de meningită, la 40% meningoencefalită și la 10% din pacienți sunt prezente semne de meningoencefalomielită (Bogovic, 2015). Rata letalității pentru subtipul european este de 1% - 2% (Vilibić-Čavlek ș.a., 2014) și până la 50% dintre pacienți au sechele pe termen lung (Bogovic, 2015).

Manifestări clinice la animale, (mămuțe, câni și cai), Encefalita transmisă de căpușe poate fi considerată o boală a sistemului nervos central, cu potențial fatal (Rushton ș.a., 2013). Rumegătoarele, precum caprele, oile și bovinele, pot fi sporadic infectate, prezentând manifestări subclinice (Holzmann ș.a., 2009; Rushton ș.a., 2013). La câini, semnele clinice sunt severe, având exclusiv un deznodământ fatal. Cele mai comune manifestări somatice sunt reprezentate de hipertermie, schimbări în comportament (refuzul hranei, agresivitate, apatie), paralizii, ataxie, mioclonii, sindrom vestibular (strabism), pierderea sensibilității în zona capului, nistagmus, mioză sau pierderea reflexului de închidere a pleoapelor. Toate aceste semne indică o tulburare neurologică multifocală (Pfeffer și Dobler, 2011).

1.2 Alphavirusuri (genul *Alphavirus*, familia *Togaviridae*)

1.2 Family *Togaviridae*, Genus *Alphavirus*

1.2.1 Virusul Sindbis (VSIN)

1.2.1 Sindbis Virus (SINV)

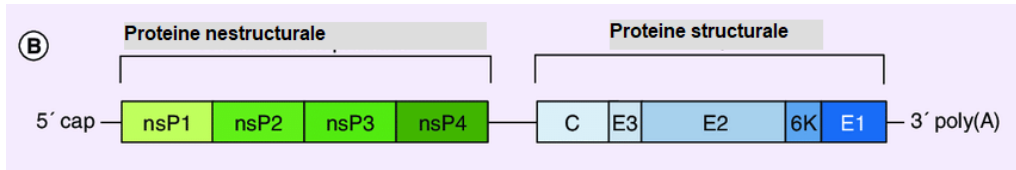
Alphavirusurile sunt virusuri mici, cu înveliș, monocatere și cu polaritatea pozitivă. Majoritatea virusurilor încadrate în acest gen sunt transmise prin intermediul țânțarilor, putând infecta o mare varietate de păsări și mamifere (Atkins, 2013).

Din punct de vedere taxonomic, genul *Alphavirus* cuprinde 31 de virusuri iar pe baza analizelor filogenetice și a distribuției geografice au fost propuse două ramuri majore: alphavirusuri ale Lumii Vechi „*Old World*” (Europa, Africa și Asia) și alphavirusuri ale Lumii Noi „*New World*” (America de Nord și de Sud, Oceania). În afară de cele două ramuri, genul *Alphavirus* mai cuprinde patru subgrupe: virusul Semliki Forest, virusul encefalitelor ecvine de Venezuela, virusul encefalitei ecvine de est și complexul encefalitelor ecvine de vest, VSIN fiind încadrat în ultimul complex viral (Lundström și Pfeffer, 2010; Adouchief ș.a., 2016).

Pe baza exprimărilor somatice, virusul Sindbis, alături de virusul Chikungunya, virusul Ross River, Barmah Forest, Mayaro și O’nyong, este încadrat în grupa alphavirusurilor artritogene. Virusurile care produc sindroamele encefalitice ecvine de vest, est și de Venezuela aparțin categoriei virusurilor encefalitice (Adouchief ș.a., 2016). Implicațiile pentru sănătatea publică, atât în zonele endemice cât și în cele ne-endemice, sunt redată de caracterul slab recognoscibil al aspectelor clinice (Adouchief ș.a., 2016).

VSIN a fost izolat pentru prima dată în anul 1952, din speciile de țânțari *Culex pipiens* și *Culex univittatus*, capturați în districtul Sindbis din Cairo (Napp, Petric, și Busquets, 2018).

Structura virusului. VSIN are un genom de tip ARN monocatenar, cu o dimensiune de aproximativ 11,7 kb și două cadre de citire (fig. 1.8), ce codifică patru proteine nestructurale (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4) și cinci proteine structurale: C, E3, E2, 6K/TF și E1 (Navaratnarajah și Kuhn 2007; Ling ș.a., 2019).



Figură 1.8 Organizarea genomului la alphavirusuri – Sindbis

Figure 1.8 Genome organization of alphaviruses – SINV

(După Ong, Lum, și Ng, 2014)

Pe baza analizelor filogenetice a genei E2, au fost identificate șase genotipuri virale, de la I la VI, (Ling ș.a., 2019), ce reflectă principalele rute migratorii ale păsărilor sălbatice (Adouchief ș.a., 2016). Astfel, genotipul SIN-I a fost izolat în Europa, Africa și Orientul Mijlociu, genotipurile SIN-II și VI au fost izolate în Australia, al treilea genotip, în partea de sud-est a Asiei, SIN-IV a fost izolat în Asia și Orientul Mijlociu iar cel de-al cincilea genotip, regăsit și sub denumirea de virusul Whataroa, a fost izolat din Noua Zeelandă. Primul tip, SIN-I este asociat epidemiilor din Africa de sud, precum și din nordul Europei (Ling J ș.a., 2019), reprezentând de altfel primul izolat din țânțari (Cairo, 1952) și prima raportare a acestui virus epornitic (Ling J ș.a., 2019).

Epidemiologie. Virusul are o distribuție la nivel mondial, inclusiv în Eurasia, Africa și Oceania, fiind transmis gazdelor aviare, în special paseriformelor, care au rol de gazde amplificatoare, prin intermediul țânțarilor (Napp, Petrić, și Busquets, 2018). Cu toate că a fost izolat și din căpușe, principalii vectori implicați în transmitere sunt țânțarii, în mod particular cei din specia *Culex torrentium/pipiens* s.l. (inclusiv forme hibride), *Culiseta morsitans*, dar și speciile *Aedes cinereus* și *Ochlerotatus annulipes*, aceștia din urmă fiind considerați ca având potențial de vectori intermediari pentru oameni (Turell, Lundström, și Niklasson, 1990). Abundența principalilor vectori ornitofili (*Culex* și *Culiseta*) din ultima parte a verii justifică numărul mare de cazuri clinice în intervalul iulie - octombrie din Finlanda (Kurkela ș.a., 2005).

Deși au o distribuție cosmopolită, infecțiile exprimate clinic sunt raportate cu preponderență în partea de nord a Europei și în sudul Africii, această focalitate fiind motivată de circumstanțe ecologice și de factori genetici dependenți de gazde (Adouchief ș.a., 2016). În Suedia, infecția cu VSIN poartă numele de boala Ockelbo, în Finlanda, Pogosta iar în Rusia, febra Karelian (Tingström ș.a., 2016).

La păsări, virusul poate provoca episoade sporadice (encefalita porumbeilor) și rareori mortalitate la exemplarele bătrâne (Napp, Petrić, și Busquets, 2018).

Primele semnale serologice la subiecți sănătoși, în Europa, au fost raportate în anul 1965, în Italia și Finlanda iar ulterior, în anul 1967, fiind depistați pacienți și în Suedia. Consecutiv acestor raportări, în Finlanda, în intervalul 1974 - 2002, epidemiile s-au desfășurat cu un caracter ciclic de aproximativ șapte ani (Lundström ș.a., 2019), cu un vârf al incidenței în anul 1995 (1310 pacienți diagnosticați). În anii următori, numărul de cazuri raportate în Finlanda a avut tendință descrescătoare comparativ cu anul 1995. Ca o consecință a persistenței virale, actualmente, Finlanda este singura țară care are implementat un sistem de supraveghere a virusului (Adouchief ș.a., 2016).

Prin tehnici de biologie moleculară și serologice, prezența virusului a fost depistată pe continentul european în Germania, unde virusul a fost izolat din țânțari capturați în așezările urbane în 2009 (Jöst ș.a., 2010) și de la ciori în 2010 (Eiden ș.a., 2014). Tot în același an, analiza serologică a relevat prezența anticorpilor și în populația umană (Jöst ș.a., 2011). În Cehia, circulația virusului la oameni a fost demonstrată serologic, în anul 2002 (Hubálek ș.a., 2005) iar la păsări în anul 2006 (Juřicová ș.a., 2009). Tot la păsări, au fost depistați anticorpi specifici în Marea Britanie, în anii 2001, 2002 și 2004 (Adouchief ș.a., 2016).

La oameni, simptomatologia somatică este reprezentată de episoade febrile, stări de indispoziție, mialgii și artralгии. Cele din urmă simptome debilitante pot persista, la o parte semnificativă a pacienților, câțiva ani (Napp, Petrić, și Busquets, 2018). Un alt aspect clinic indus de agentul cauzal este reprezentat de erupțiile cutanate maculo - papulare (Jöst ș.a., 2010). Deși circulația virusului este una „ silențioasă”, ea nu trebuie desconsiderată, atâta timp cât simptomele corespund și altor boli infecțioase (Napp, Petrić, și Busquets, 2018).

1.3 Familia *Peribunyaviridae*, Genul *Orthobunyavirus*

1.3 Family *Peribunyaviridae*, Genus *Orthobunyavirus*

1.3.1 Virusul Tahyna (VTAH)

1.3.1 Tahyna virus (TAHV)

Virusul are apartenență la familia *Peribunyaviridae*, genul *Orthobunyavirus*, fiind totodată încadrat în serocomplexul bunyavirusurilor de California (Li ș.a., 2014). VTAH este strâns înrudit cu virusurile LaCrosse și Snowshoe Hare (Hubálek, 2008).

Virusul a fost izolat pentru prima dată dintr-un eșantion de țânțari din specia *Aedes caspius* (Lu ș.a., 2009), în Slovacia, în anul 1958. Prima raportare a infecției la oameni a fost în anii 1960 (Li ș.a., 2014), fiind primul mobovirus patogen pentru om izolat în Europa (Hubálek, 2008).

Epidemiologie. Atât prezența virusului cât și a cazurilor umane este documentată în multe țări din Europa de est, de vest (Li ș.a., 2014) și, unde au fost obținute izolate virale din țânțari și au fost detectați anticorpi specifici anti VTAH. Semnale serologice au fost detectate la diferite specii de mamifere și păsări, în timp ce la oameni s-a putut observa o prevalență a anticorpilor de 13% (Lu ș.a., 2009). În România, anticorpii anti-VTAH au fost detectați în probe de ser recoltate de la porci mistreți din Galați, Bacău și Iași (Camp J.V. ș.a., 2018).

În sudul Europei, vectorii implicați în transmiterea virusului Tahyna sunt reprezentați de insectele aedine (*Aedes vexans*, *cinereus*, *caspius*, *cantans*, *punctos*, *communis*, *flavescens*, *excrucians*), culicini (*Culex modestus* și *Culex pipiens*), culisetine (*Culiseta annulata*) și de țânțarii din specia *Anopheles hyrcanus* (Hubálek, 2008).

Principalele gazde vertebrate sunt lagomorfele (*Lepus europaeus*), ariciul (*Erinaceus roumanicus*) și rozătoarele (Hubálek, 2008).

Manifestări clinice la oameni și animale. VTAH este agentul cauzat al „Febrei Valtice”, un sindrom febril ce poate avea o durată de până la o săptămână, ce afectează mai frecvent copiii dar și adulții (Hubalek ș.a., 2014).

Manifestările clinice la oameni sunt descrise ca fiind nediferențiate de cele din gripă, incluzând febra, tulburări digestive, forme atipice de pneumonie, pleurezie și mai rar tulburări ale sistemului nervos, cu meningoencefalită și artralгии (Gao, Nasci, și Liang, 2010; Li ș.a., 2014; Lu ș.a., 2009).

La animale, manifestările clinice nu sunt cunoscute, în schimb seroconversia a fost demonstrată la căprioară (*Capreolus capreolus*), cerb (*Cervus elaphus*) și mistreț (*Sus scrofa*) (Camp ș.a., 2018).

CAPITOLUL II

PRINCIPALELE SPECII DE CULICIDE CU ROL ÎN TRANSMITEREA AGENȚILOR PATOGENI LA ANIMALE ȘI OAMENI ÎN ROMÂNIA

CHAPTER II

MAIN CULICIDAE SPECIES INVOLVED IN THE TRANSMISSION OF HUMAN AND ANIMAL PATHOGENS

2.1 *Culex (Culex) pipiens* (Linnaeus, 1758)

Taxonul *Cx.pipiens* s.l. este nativ în Europa, având o distribuție într-o continuă dinamică (ECDC; 2020), fiind foarte frecvent în partea centrală a continentului (Becker N ș.a., 2012).

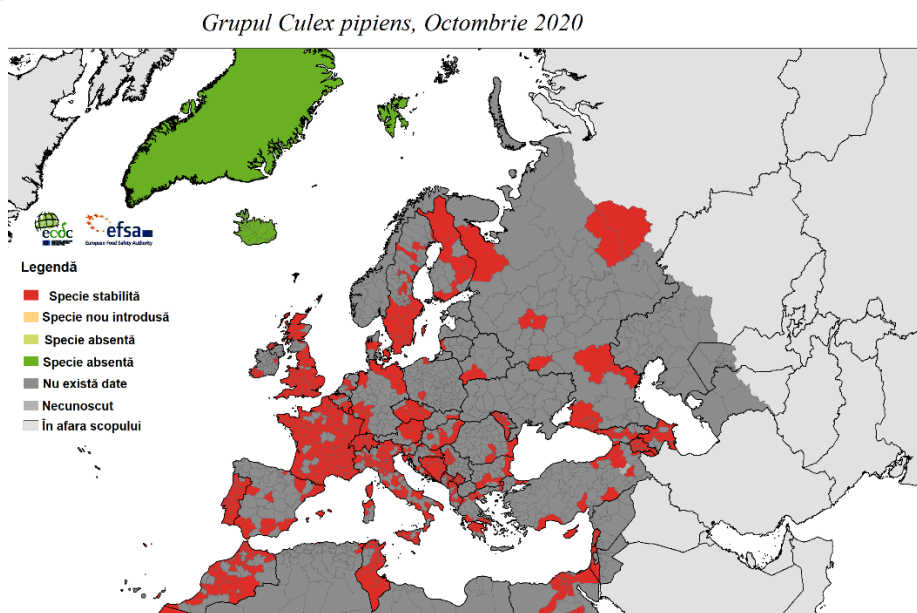


Figura 2.1 Distribuția țânțarilor din taxonul *Cx.pipiens* la nivel European, în luna octombrie, 2020
Figure 2.1 The current known distribution of the *Cx.pipiens* group in Europe, in October 2020
(ECDC, EFSA 2020)

Această specie cuprinde două biotipuri identice din punct de vedere morfologic: *pipiens* și *molestus*, precum și hibrizii lor. Cele două biotipuri, precum formele lor hibride,

prezintă aspecte morfologice similare cu specia *Culex torrentium*, cu care sunt simpatrice în mare parte din țările din Europa. Acești taxoni pot dezvolta până la câteva generații pe an, dependent de condițiile climatice (Napp, Petric, și Busquets, 2018).

Larvele acestei specii își pot avea habitatele în aproape orice tip de apă colectată, artificială sau naturală, tolerând chiar și o salinitate moderată (Napp, Petric, și Busquets, 2018).

Bioformele taxonului *Culex pipiens* sunt cel mai frecvent asociate atât VWN cât și USUV (Napp, Petric, și Busquets, 2018), creșterea temperaturii sporind competența vectorială pentru VUSU (Hernández-Triana ș.a., 2018), în timp ce studiile de vector competență efectuate au demonstrat că această specie reprezintă unul dintre principalii vectori implicați în transmiterea flavivirozelor (Mancini ș.a., 2017).

2.1.1 *Culex pipiens* biotipul *pipiens* (Linnaeus, 1758)

Culex pipiens, biotipul *pipiens*, are un comportament alimentar strict ornitofil și, prin urmare, are un rol major atât în transmiterea VWN cât și în cea a VUSU.

În timpul iernii, femelele intră în diapauză, iar primăvara când temperatura medie zilnică crește peste 10 ° C, acestea caută sânge pentru a-și depune ponta (150-240 de ouă) pe suprafața apei. Larvele eclozează în decurs de una sau două zile și în funcție de temperatură, ajung la maturitate în 1-4 săptămâni (Napp ș.a., 2018).

2.1.2 *Culex pipiens* biotipul *molestus* (Forskal, 1775)

Biotipul *molestus* apare mai frecvent în așezările umane, cele mai frecvente habitate larvare fiind reprezentate de canalizarea rutieră, de spații subterane de canalizare și alte vase de colectare a apei. Acest biotip are un comportament alimentar mamalofil - antropofil, exofag, endofag, manifestat după apusul soarelui și în cursul nopții. Deoarece este o specie autogenă, femelele au capacitatea de a depune ponta fără să se hrănească cu sânge (Napp, Petric, și Busquets, 2018). Atunci când larvele provin din locuri de reproducție eutrofice (de exemplu, rezervoarele septice), ele pot dezvolta un strat de grăsime proeminent datorită nivelului ridicat de nutrienți. Stratul de grăsime, transferat în stadiul de adult, devine o sursă de proteină (vitelină), necesară formării ovulelor și totodată suficientă finalizării dezvoltării ovariene (Becker ș.a., 2010).

Culex pipiens molestus, prezintă patru criterii biologice: este autogen, stenogam (se poate împerechea în spații restrânse), antropofil și homodinam – cu creștere continuă (Osório H ș.a., 2008) și rămâne activă în perioada de iarnă (Becker ș.a., 2010)

Hibrizii celor două biotipuri sunt vectori de legătură/intermediari („*bridge vectors*”) ideali pentru virusurile West Nile și Usutu iar în ceea ce privește competența vectorială,

formele hibride europene s-au dovedit a fi capabile pentru a transmite VWN și virusul Febrei Văii Rift (Napp, Petrić and Busquets, 2018).

În raport cu eficiența competenței vectoriale, cele două biotipuri ale speciei *Culex pipiens* se raportează diferit cerințelor de temperatură. Astfel, temperaturile înalte cresc rata de transmitere a biotipului *pipiens* și a hibrizilor, fenomenul nefiind valabil și în cazul bioformei *molestus* (Vogels ș.a., 2017).

2.2 *Culex (Barraudius) modestus* (Ficalbi, 1889)

Specia *Culex modestus* are o distribuție vastă în ecozona Palearctică, în timp ce în Europa, prezintă o distribuție neuniformă, în special în partea de sud, unde se comportă ca și vector intermediar pentru VWN. Din anul 2012, specia a fost semnalată și în Marea Britanie (Golding N ș.a., 2012).

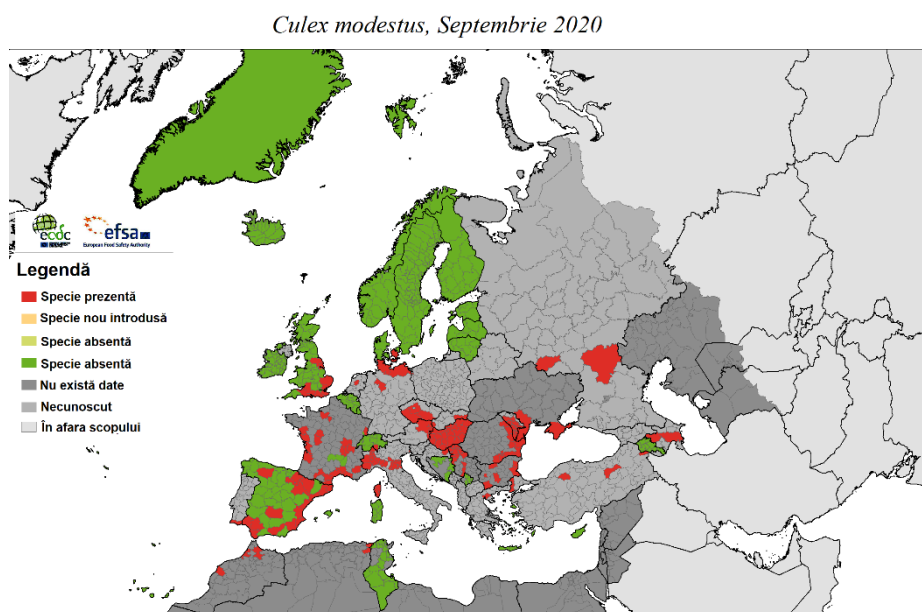


Figura 2.2: Distribuția țânțarilor din specia *Cx.modestus* la nivel European, în luna septembrie, 2020

Figure 2.2: The current known distribution of the *Cx.modestus* in Europe, in September 2020

(ECDC, EFSA 2020)

De obicei, existența habitatelor larvare este limitată la apele proaspete sau ușor salinate ale mlaștinilor, la canalele de irigare și zonele de inundare.

Abilitatea de dispersie a acestei specii este foarte scăzută, astfel încât femelele agresive rămân localizate în jurul locurilor de reproducere, ceea ce îi diminuează importanța în transmiterea mobovirusurilor la oameni în mediul semi-urban și urban. Cu toate acestea, ar putea servi ca un vector enzootic important dar și ca vector de legătură în medii umede naturale/rurale din întreaga Europă (Napp, Petrić, și Busquets, 2018).

În funcțiile de condițiile meteorologice, abundența speciei este maximă de la începutul lunii iulie până la sfârșitul lunii septembrie. Femelele prezintă un comportament alimentar oportunist (ornitofil și mamalofil), exofil, aproape de locul de depunere a pontei, diurn, chiar și în zonele expuse vântului sau la soare (Napp, Petrić, și Busquets, 2018).

2.3 *Aedes (aeditomus) vexans* (Meigen, 1830)

Aedes vexans este o specie autohtonă, cu o distribuție pe scară largă în întreaga Europă de est. În funcție de nivelul apelor și ale temperaturii unde s-a depus pontă (peste 9°C), ar putea avea chiar mai multe generații pe an. Locurile preferate pentru depunerea pontei sunt reprezentate de zonele inundate, în care se formează porțiuni de acumulare a apei. Femelele depun pontă într-un interval de cinci până la opt zile după hrănire, în locurile ce urmează să fie inundate. În zonele cu climă temperată, pontă poate rezista câteva zile la -10°C, diapauza persistând din luna septembrie până în luna martie. Femelele se pot deplasa pe distanțe cuprinse între 10 și 30 km de la locul depunerii pontei (Napp, Petrić, și Busquets, 2018).

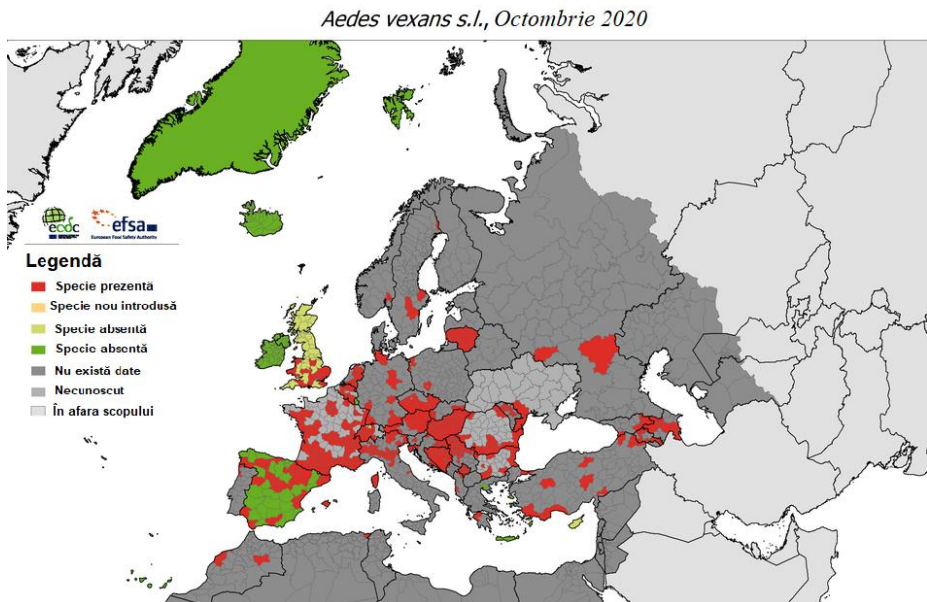


Figura 2.3 Distribuția țânțarilor din specia *Ae.vexans* la nivel European, în luna octombrie, 2020

Figure 2.3 The current known distribution of the *Ae.vexans* in Europe, in October 2020
(ECDC, EFSA 2020)

Datorita comportamentului alimentar mamalofil, importanța medicală a acestei specii este dată de capacitatea de a transmite virusuri precum Tahyna și Zika, având o implicare minimă în transmiterea VWN (Napp, Petrić, și Busquets, 2018).

2.4 *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895)

Țânțarul tigru (asiatic) este una dintre cele mai răspândite specii invazive de insecte în regiunile tropicale și temperate. Această specie este incriminată în transmiterea unor virusuri precum Chikungunya, Dengue și potențial vectorial pentru Zika, LaCrosse, virusul Encefalitei Japoneze, West Nile și pentru virusul Febrei galbene (Ponce ș.a., 2018).

Aedes albopictus, o specie cu origini tropicale și subtropicale, a invadat zone temperate și tropicale din America, Europa, Australia sau Africa (Ponce ș.a., 2018). Acest taxon, recunoscut ca fiind unul dintre 100 cele mai invazive specii din lume, a fost detectat pentru prima dată în Europa în anul 1979, în Albania (Di Luca ș.a., 2017). În România, prima raportare a acestei specii a fost făcută în anul 2012 (Prioteasa ș.a., 2015), în București, pentru ca în următorii ani să devină o specie stabilită în capitală. În anul 2018, prezența vectorului în stadiu de adult a fost confirmată în nouă localități din România (București, Petru Rareș, Jilava, Bragadiru, Giurgiu, Ploiești, Constanța, Dubova și Oradea) iar în Sibiu au fost colectate ouă de *Ae. Albopictus* (Prioteasa ș.a, 2020).

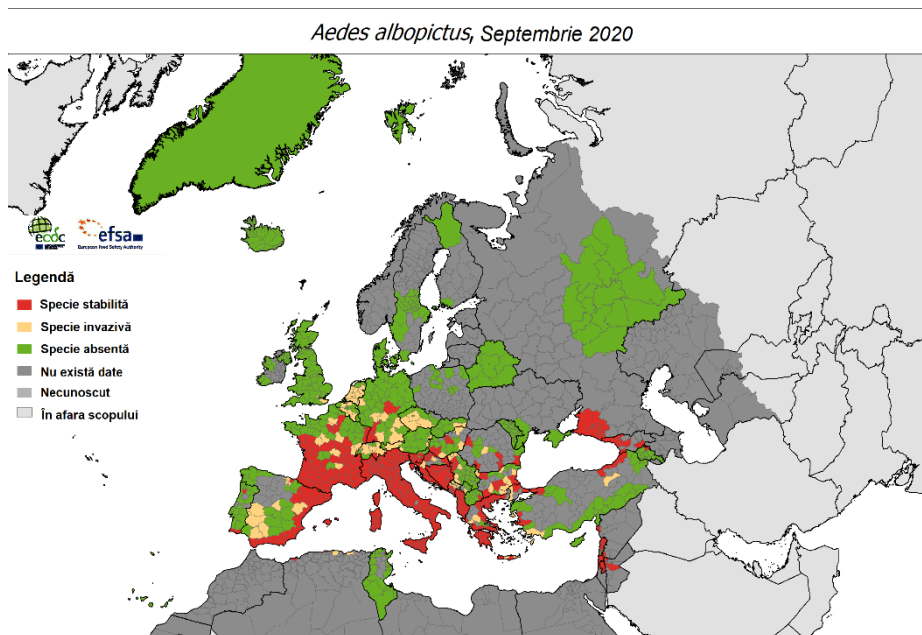


Figura 2.4 Distribuția țânțarilor din specia *Ae.albopictus* la nivel European, în luna septembrie 2020

Figure 2.4 The current known distribution of the *Ae.albopictus* in Europe, in September 2020 (ECDC, EFSA 2020)

Globalizarea în domeniul comerțului, intensificarea mișcării populației și schimbările climatice, facilitează introducerea și răspândirea speciei invazive în afara arealului geografic nativ (Benallal ș.a., 2016). Introducerea și răspândirea rapidă, în cea mai

mare parte a Europei, este pusă pe seama dispersiei pasive, prin comerțul cu anvelope uzate și cu plante ornamentale (*Dracaena* sp.) (Becker ș.a., 2010).

Stadiile imature se regăsesc într-o mare varietate de recipiente sau locuri de acumulare a apei iar ponta depusă în astfel de locuri este rezistentă la desicare, ceea ce facilitează transportul pe distanțe lungi. În timpul iernii, în Europa, ouăle țânțarului tigru intră în diapauză în stadiul de embrion (Becker ș.a., 2010).

Comportamentul alimentar al femelelor, majoritar antropofil, ocazional mamalofil (se pot hrăni pe iepuri, câini, veverițe și bovine) sau ornitofil (se hrănesc pe passeriforme sau columbiforme), se pretează pentru transmiterea diferitelor arbovirusuri ce folosesc ca și gazde principale mamiferele sau păsările. Pentru a-și manifesta comportamentul antropofil, femelele pătrund în locuințe la amurg și seara (Becker ș.a., 2010).

Luând în considerare comportamentul invaziv și competența vectorială pentru diverse entități patologice ce produc îmbolnăviri supravegherea și strategiile de control ale țânțarului tigru reprezintă puncte de referință și ar trebui să fie implementate la nivel național (Di Luca ș.a., 2017) .

CAPITOLUL III
CAPACITATEA VECTORIALĂ A ȚÂNȚARILOR

CHAPTER III
VECTORIAL CAPACITY OF MOQUITOES

Menținerea și perpetuarea ciclurilor de transmitere a arbovirusurilor, în natură, sunt dependente de o serie de factori. Acești factori, intrinseci și extrinseci, influențează biologia virusurilor, vectorilor și a gazdelor, dar și interacțiunile corespunzătoare.

Importanța factorilor implicați în transmiterea și menținerea arbovirusurilor este evaluată în contextul capacității vectoriale (CV).

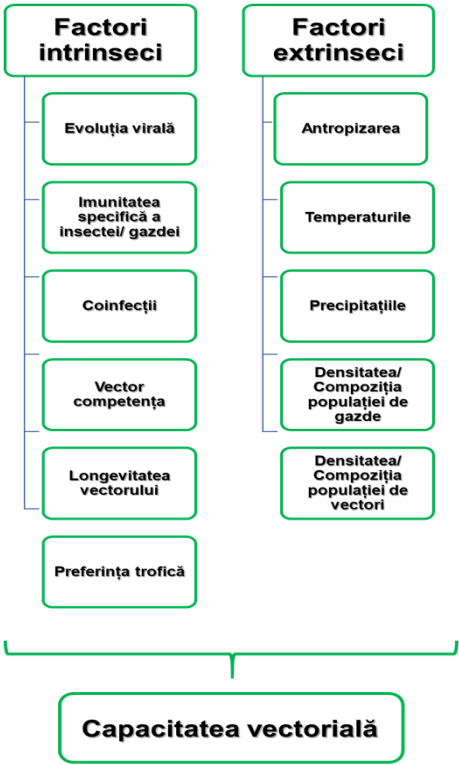


Figura 3.1 Prezentarea schematică a factorilor ce influențează capacitatea vectorială
Figure 3.1 Schematic representation of factors involved in vectorial capacity
(După Leggewie M., 2016)

Episoadele de boală provocate de mobovirusuri sunt influențate de factori extrinseci (ex. temperaturile, precipitațiile, practicile agricole) și intrinseci (evoluția virală, imunitatea specifică a gazdei și a vectorilor, competența de vector și cea a gazdei), ce au impact asupra activității virale și asupra biologiei țânțarilor în diverse moduri. Factorii dependenți de gazdă includ: competența gazdei, dinamica populației și statusul imun, pot influența, de asemenea, dinamica transmiterii arbovirusurilor. Complexitatea acestor interacțiuni este exacerbată de faptul că nu numai gazdele divergente pot produce o alterare virală, însuși virusul poate afecta atât gazda vertebrată cât și cea nevertebrată, în moduri prin care poate altera semnificativ tiparul de transmitere (Ciota și Kramer, 2013).

Capacitatea vectorială definește eficiența unei populații de vectori de a transmite un patogen către o populație susceptibilă. Capacitatea vectorială integrează factori precum: numărul de femele de pe o gazdă (m), comportamentul alimentar, rata zilnică de hrănire (a), rata de transmitere printre țânțarii expuși (b), perioada de incubare extrinsecă (EIP) (n), rata de supraviețuire zilnică (p), dar și abundența țânțarilor. CV se poate calcula matematic utilizând următoarea formulă:

$$CV = \frac{m * a^2 * b * p^n}{-\log_e p}$$

Deoarece numai vectorii competenți pot asigura vehicularea virusurilor, un aspect esențial și determinant pentru capacitatea vectorială este competența vectorială (Vogels ș.a., 2017; Ciota și Kramer, 2013).

Pentru a putea persista în natură, agenții virali infecțioși trebuie să fie transmiși de la o gazdă susceptibilă la alta, unde să inducă manifestări somatice. Perpetuarea agenților infecțioși necesită multiple mecanisme de transmitere, care includ atât contactul direct dintre gazde, cât și cel indirect. O mare parte dintre acești agenți virali, pentru a putea fi transmiși gazdelor vertebrate, necesită implicarea artropodelor, în principal țânțari și căpușe (Rückert și Ebel, 2018).

În general, pentru a putea fi perpetuate, arbovirusurile necesită o viremie indusă de o gazdă vertebrată, astfel încât, o dată cu asimilarea nutrienților, în momentul hrănirii cu sânge, insectele hematofage să poată prelua și particulele virale (Rückert și Ebel, 2018).

Așadar, arbovirusurile sunt entități care, pentru a putea persista în natură, au dezvoltat o interdependență intimă între două gazde îndepărtate din punct de vedere evolutiv (vertebrat - artropod) și, deși acestea pot fi transmise de diferite insecte hematofage, printre care căpușe și flebotomi, cel mai adesea ele sunt transmise prin intermediul țânțarilor. Comportamentul hematofag al acestora influențează caracterul emergent și re-emergent al arbovirusurilor (Rückert și Ebel, 2018).

3.1 Factori intrinseci implicați în transmiterea agenților patogeni

3.1 Intrinsic factors involved in pathogen transmission

Factori intrinseci implicați în transmiterea vectorială, sunt reprezentați de longevitatea vectorilor, evoluția virală, competența vectorială, imunitatea specifică. Alți factori ce au un impact considerabil asupra capacității vectoriale, sunt reprezentați de co-infecțiile cu alte microorganisme, cum ar fi flavivirusuri specifice insectelor sau proteobacteria din genul *Wolbachia*, precum și de preferințele trofice.

3.1.1 Competența vectorială

Pentru ca artropodul să poată transmite virusul către o gazdă vertebrată, acesta trebuie să fie vector competent (fig. 3.1). În entomologia medicală, noțiunea de „competență vectorială” se referă la abilitatea inerentă a unei insecte hematofage de a transmite un anumit virus. Vectorii competenți dobândesc agentul patogen în momentul hrănirii cu sânge, susțin replicarea acestuia la nivelul țesutului intestinal și ulterior diseminarea către situsurile secundare de replicare, în special în glandele salivare. De la acest nivel, virusul este eliminat o dată cu secrețiile salivare și inoculat, ulterior, în țesutul vascular cutanat al gazdei vertebrale (Rückert și Ebel, 2018).

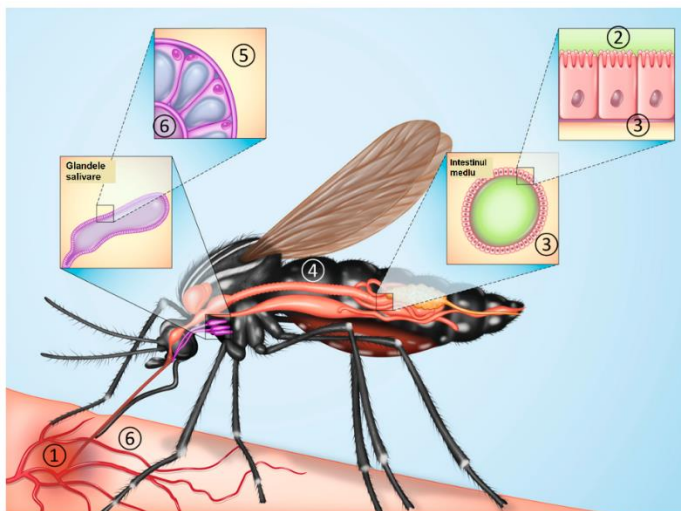


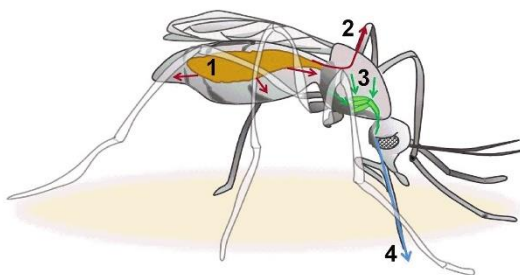
Figura 3.2 Etapele transmiterii virusului de către un vector competent (Vector competența): 1) Preluarea virusului o dată cu sângele în momentul hrănirii, 2) infectarea celulelor epiteliale de la nivelul intestinului mediu și replicarea virusului la același nivel, 3) diseminarea virusului la nivelul hemocelului, 4) infecția și replicarea virusului la nivelul țesuturilor periferice, 5) infecția glandelor salivare, 6) descărcarea particulelor virale la nivelul cavităților apicale ale acinilor descărcarea particulelor virale la nivelul cavităților apicale ale acinilor salivari și prezența virusului în salivari și prezența virusului în salivă

Figure 3.2 Sequential steps in viral transmission (Vector competence): 1) Viral loading during feeding process, 2) infection and viral replication in midgut epithelial cells, 3) viral dissemination to hemolymph, 4) the infection of and replication in peripheral tissues, 5) the infection of salivary glands, 6) shedding the viral particles into the apical cavities of acinar cells and its presence in mosquito saliva

(După Azar și Weaver, 2019)

Competența vectorială, proprietate determinată atât de factori genetici cât și de factori de mediu, este o caracteristică cantitativă exprimată procentual, dependentă de speciile de țânțari și de tipul de virus ce urmează să fie transmis. Astfel, competența vectorială a unui țânțar devine irelevantă dacă se hrănește doar rareori pe gazde susceptibile (Rückert și Ebel, 2018), în schimb speciile de țânțari fără competență vectorială pot contribui la întreținerea focarelor cu arbovirusuri (Ciota și Kramer, 2013)

În general, pentru a putea fi transmis, virusul trebuie să depășească patru bariere (fig. 3.2). După ingerare, particulele virale trebuie să se replice la nivelul celulelor epiteliale din intestin. Prima barieră, cu potențial de limitare a infecției virale, atât mecanic cât și prin răspunsuri imune, este membrana peritrofică. Această structură, cu aspect de sac, are în compoziția sa chitină, proteine și glicoproteine ce formează, în primele ore de la ingestia prizei de sânge, o matrice filamentoasă cu pori de aproximativ 20 nm. Deși dimensiunile porilor sunt reduse, flavivirusurile reușesc să pătrundă în celulele epiteliale în primele opt ore de la ingestia de sânge, evitând genele ce determină generarea membranei peritrofice (Vogels ș.a., 2017). La acest nivel apar primele interacțiuni virus - țânțar, ce pot contura rezultatul infecției (Rückert & Ebel, 2018).



Bariere fizice ce pot împiedica transmiterea agenților patogeni

1. Bariera de infecție (intestinul mediu)
2. Bariera de diseminare
3. Bariera de infecție de la nivelul glandelor salivare
4. Bariera de diseminare de la nivelul glandelor salivare

Figura 3.3 Prezentarea schematică a barierelor anatomice pe care virusul trebuie să le depășească pentru a putea fi transmis.

Figure 3.3 Overview of the anatomical barriers involved in virus transmission
(După Grubaugh ș.a., 2016)

După traversarea primei bariere, pentru a putea disemina, virusul trebuie să traverseze lamina bazală ce înconjoară epiteliul intestinului, pentru a ajunge în hemocel. Lamina bazală este o matrice densă constituită din proteine care blochează trecerea entităților de mari dimensiuni (bacterii, fungi și virusuri de mari dimensiuni). Densitatea acesteia prezintă particularități printre speciile de țânțari, putând împiedica progresarea virionilor către hemocel. Ca în cazul membranei peritrofice, lamina bazală nu reprezintă o barieră solidă pentru flavivirusuri (Vogels ș.a., 2017).

O dată depășită bariera fizică și infectarea hemolimfei, diseminarea particulelor virale este urmată de replicarea în țesuturile secundare (grăsime corporală, hemocite, țesuturi nervoase și musculare), precedând bariera anatomică de la nivelul glandelor salivare. Aici virusul se replică și crește titrul viral până la nivelul de platou, fiind cantonat în polul apical al acinilor salivari, pentru ca apoi să fie expectorat o dată cu saliva în timpul hrănirii (Rückert și Ebel, 2018). La rândul lor, lobii glandelor salivare sunt înveliți în lamina bazală, cu rol de barieră fizică (Vogels ș.a., 2017).

În ceea ce privește vector competența pentru virusuri precum West Nile, în cazul lui *Culex pipiens* și al lui *Culex modestus* studiile experimentale au demonstrat lipsa barierei de la nivelul glandelor salivare, obținându-se o rată de transmitere de 100% pentru *Culex pipiens* inoculați intratoracic (Vogels ș.a., 2016), în timp ce pentru *Culex modestus*, rata de transmitere a fost de 40 - 50% iar cea de de diseminare de 89 - 91%, sugerând prezența acestei barierei pentru VWN (Balenghien ș.a., 2008). În consecință, competența vectorială a speciilor de țânțari din Europa depinde strict de depășirea barierelor de la nivelul intestinului și a celei de la nivelul glandelor salivare (Vogels ș.a., 2017).

Priza de sânge și ulterior depășirea barierelor de la nivelul intestinului și glandelor salivare este succedată de perioada de incubație extrinsecă, reprezentată de numărul de zile parcurse de la ingerarea sângelui viremic până la atingerea viremiei suficiente pentru infectarea unei noi gazde (Ciota și Kramer, 2013).

Evaluarea ratei de infecție, diseminare și transmitere oferă o înțelegere mai profundă a diferitelor stadii ale dispersiei virale, dependente de cele două bariere anatomice principale: intestin și glande salivare (Vogels ș.a., 2017).

În studiile de vector competență, rata de infecție se stabilește prin utilizarea întregului corp al țânțarului și denotă depășirea barierei de la nivelul intestinului. Rata de diseminare se determină prin testarea porțiunilor periferice ale corpului țânțarilor (capul și picioarele), oferind o perspectivă asupra ponderii de țânțari la care particulele virale au pătruns în hemocel. Rata de transmitere se stabilește prin testarea salivei pentru prezența virusului, oferind o perspectivă asupra proporției de țânțari care pot transmite efectiv virusului. Aceasta din urmă reprezintă cel mai relevant parametru pentru competența vectorială, întrucât doar țânțarii a căror salivă conține particule virale pot contribui la vehicularea virusurilor (Vogels ș.a., 2017).

Competența vectorială a unei populații de țânțari poate varia în timp și este modulată de prezența și interacțiunea factorilor intrinseci și extrinseci (genetici și de mediu) (Ciota și Kramer, 2013).

3.2 Factori extrinseci implicați în transmiterea agenților patogeni

3.2 Extrinsic factors involved in pathogen transmission

Factorii extrinseci sunt focalizați pe elementele ce modulează interacțiunile dintre gazdă și vector.

Factori extrinseci ce au un impact considerabil asupra competenței vectoriale sunt reprezentați de doza infectantă, temperatură și densitatea ambelor populații. Probabilitatea infecției, a diseminării și a transmiterii virale este strict dependentă de doza virală. Titrul viral este un produs al competenței gazdei de amplificare, intensitatea și durata viremiei setând încărcătura virală iar nivelul acesteia prezentând variații printre speciile de păsări receptive (Ciota, 2017).

Arbovirusurile reprezintă sisteme dinamice cu o ecologie complexă, ce tind să se ajusteze permanent în funcție de temperatură. Condițiile climatice au o influență directă asupra competenței vectoriale, asupra dinamicii populației de vectori și asupra replicării virale în țânțari (Paz, 2015)

În ceea ce privește temperatura ambientală, rata de replicare în țânțari este direct proporțională cu temperatura, accelerând diseminarea particulelor virale și scurtând perioada de incubație extrinsecă (Ciota, 2017; Paz, 2015). Creșterea temperaturilor curente și preconizate la nivel global, induse de modificările climatice, tinde să afecteze în mod semnificativ mecanismele de transmitere a arbovirusurilor. Studiile experimentale efectuate pe specimene din genul *Culex* indică faptul că la temperaturi crescute dezvoltarea țânțarilor este accelerată, demonstrând corelația pozitivă dintre temperatură și rata de dezvoltare. În contrast, o corelație negativă între temperaturile crescute și longevitatea țânțarilor adulți și a stadiilor imature, duce la un declin al capacității vectoriale, în pofida ratei de dezvoltare accelerată (Ciota și Kramer 2013). Alte efecte ale temperaturilor sporite sunt reprezentate de scăderea intervalului dintre hrăniri, de reducerea perioadei de incubație extrinsecă, de accelerarea evoluției virale și creșterea eficienței competenței gazdelor aviare. De asemenea, temperaturile extreme micșorează activitatea țânțarilor (Paz, 2015).

În privința precipitațiilor, interferența dintre acest fenomen și populațiile de țânțari este una dinamică, specifică speciei. Scăderea precipitațiilor a fost asociată cu creșterea prevalenței infecției cu VNW la cai, păsări și oameni. Acest lucru s-ar putea datora parțial creșterii densității populației de vectori, a sporirii ratei de dezvoltare dar și ca urmare a intensificării activității acestora (Crowder ș.a., 2013). O dogmă frecventă în epidemiologia bolilor vectoriale, conform căreia, precipitațiile abundente ar putea favoriza abundența speciilor de țânțari și, totodată, dezvoltarea epidemiilor, a fost demonstrată pentru VWN. Deși această asocieră pozitivă este confirmată în cazul infecțiilor cu VWN, corelația negativă dintre nivelul precipitațiilor peste medie și supraviețuirea țânțarilor se explică prin diluarea nutrienților necesari diferitelor stadii larvare (Paz, 2015).

Eficiența competenței vectoriale poate fi influențată, din punct de vedere nutrițional, de compoziția mediului unde se dezvoltă larvele, de densitatea acestora și de temperatura de pe parcursul stadiilor de dezvoltare (Vogels ș.a., 2017). Impactul pe care disponibilitatea nutritivă o are asupra stadiilor și a vector-competenței sunt particulare virusului și vectorului. Studiile efectuate pe *Culex tarsalis* au demonstrat că privarea larvelor de nutrienți determină un timp de dezvoltare mai îndelungat și scăderea ratei de dezvoltare între stadii, iar femelele adulte sunt tarate. În ceea ce privește ratele de infecție, diseminare și transmitere, acestea nu sunt influențate de nivelul nutritiv. La țânțarii din specia *Cx. pipens*, rata de supraviețuire este direct proporțională cu aportul de zaharoză. În schimb, speciile cu rezerve nutritive reduse, ca o consecință a unui aport de zaharoză mai redus, sunt mai predispuse să transmită agenți virali pe cale orală (Ciota și Kramer, 2013).

Un factor care modulează capacitatea vectorială este reprezentat de comportamentul alimentar al insectelor hematofage. Preferințele trofice ale țânțarilor pot varia de la un comportament strict față de o singură specie până la un comportament oportunist sau generalist. Insectele hematofage cu niveluri variate ale competenței vectorial pentru VWN se pot hrăni atât pe gazde aviare cât și pe mamifere iar vectorii intermediari, pentru a transmite virusul, se hrănesc prima dată pe o gazdă aviară și ulterior pe oameni (Ciota și Kramer, 2013).

Fiind determinate genetic, preferințele pot fi înlocuite cu disponibilitatea gazdelor preferate. De exemplu, vectorii ornitofili vor fi afectați de locul unde este amplasat cuibul păsărilor, de momentul când acestea sunt active și de locul unde se hrănesc. Distribuția populației aviare este un factor critic, secetele ducând adesea la agregarea țânțarilor din genul *Culex* și a păsărilor sălbatice (Ciota și Kramer, 2013) în jurul surselor de apă, ceea ce conduce la accelerarea ciclului epizootic și a amplificării virale. Interacțiunile dintre vectori și gazdele aviare sunt accentuate în timpul perioadelor de caniculă, când acumulările de apă, habitate propice depunerii pondei, devin bogate în nutrienți și atrag astfel diverse specii de păsări (Paz, 2015).

De asemenea, competența vectorială mai este influențată de variabilitatea genetică a sușei virale (Hernández-Triana ș.a., 2018), de interacțiunile complexe dintre genotipul viral, genotipul țânțarului și comunitățile microbiene. Acestea din urmă pot influența considerabil competența vectorială, în special prin capacitatea endosimbionului *Wolbachia pipientis* de a modula competența diferitelor virusuri (Ciota, 2017) cât și prin efectul antiviral al acestuia. *Wolbachia* se găsește în mod normal în insecte, inclusiv în țânțari. Această bacterie are capacitatea de a media protecția antivirală împotriva anumitor virusuri cu genom ARN, interferând cu mecanismul de transmitere al acestora (Johnson, 2015).

Complexitatea interacțiunilor dintre virusuri și gazda nevertebrată poate avea efecte și asupra insectelor hematofage. Dacă acest tipuri de interacțiuni sunt în mod normal descrise ca fiind avirulente, și de cele mai multe ori necaracterizate, infecțiile arbovirale pot afecta în mod considerabil caracteristicile insectelor în care se replică, afectând totodată și

capacitatea vectorială. Studiile experimentale, efectuate pe țânțari din speciile *Cx.tarsalis* și *Cx.pipiens*, au demonstrat că aceste interferențe sunt foarte specifice, având ca rezultat scăderea fecundității și creșterea ratei de hrănire și scăderea longevității la cei din urmă (Schwartz și Koella, 2001). Un alt studiu, efectuat pe *Cx. Quinquefasciatus*, a demonstrat că infecția poate fi asociată lizei tisulare la nivelul glandelor salivare și apoptoza celulelor de la nivelul intestinului (Vaidyanathan și Scott, 2006).

Alături de competența vectorială, competența și disponibilitatea gazdelor reprezintă alți factori care au impact asupra transmiterii virale. Competența gazdei-rezervor este un indice ce reflectă numărul relativ de țânțari deveniți infecțioși după hrănirea pe fiecare specie gazdă. Această valoare depinde de susceptibilitatea gazdei, de concentrația particulelor virale din sânge și de durata viremiei la speciile studiate. Luând în considerare nivelul viremiei, la gazdele aviare, în mod particular paseriformele și păsările migratoare, intensitatea transmiterii este cea mai crescută. La mamifere, competența gazdei este limitată datorită viremiei și perioadei de incubație scăzute, neputând infecta alți țânțari (Ciota și Kramer, 2013).

**PARTEA A II–A
CONTRIBUȚII PERSONALE**

**PART II
PERSONAL CONTRIBUTIONS**

CAPITOLUL IV SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

CHAPTER IV GOAL AND OBJECTIVES

În ultimul deceniu, cea mai vizibilă consecință a încălzirii globale, a antropizării și a schimbării rutelor migratorii ale vectorilor, capabili să se deplaseze pe distanțe considerabile, este reprezentată de creșterea impactului agenților patogeni cu caracter zoonotic. De asemenea, bolile transmise prin intermediul vectorilor au cunoscut o expansiune atât la nivel teritorial cât și în ceea ce privește diversitatea agenților patogeni transmiși. De un real interes pentru sănătatea publică sunt arbovirusurile (virusurile transmise prin intermediul artropodelor), în special virusurile cu genom ARN. Arbovirusurile sunt cunoscute pentru ciclul de viață complex determinat de evoluția rapidă și de rolul insectelor hematofage cu o înaltă adaptabilitate ecologică.

Vectorii frecvent implicați în transmiterea agenților patogeni, sunt reprezentați de țânțari, căpușe, culicoizi, flebotomi, muște, purici și păduchi. Dintre antropodele hematofage, principalii vectori implicați în transmiterea agenților patogeni de natură virală sunt reprezentați de țânțari.

Deoarece menținerea arbovirusurilor în natură este în strânsă și inextricabilă legătură cu ecologia vectorilor și a gazdelor, anumite zone, datorită caracteristicilor geografice, sunt mai predispuse introducerii și persistenței agenților patogeni vectorizați de insecte. România, prin particularitățile geo-climatice, cu cinci ecoregioni, cu o mare biodiversitate, cu puncte de hrană și odihnă pentru păsările migratoare, reprezintă un punct important pentru Europa în ceea ce privește potențialul emergent și re-emergent al arbovirozelor.

Aflată sub egida conceptului *One health*, lucrarea intitulată „*Arboviroze cu caracter zoonotic transmise de țânțari în România*” și-a propus ca scop studiul infecțiilor vectorizate de țânțari, la diferite niveluri și din perspective interdisciplinare. Astfel, s-a urmărit cercetarea nișei entomologiei medicale responsabilă de țânțari, nișă aflată la joncțiunea circuitului de transmitere a arbovirusurilor de la animale la om.

Primul obiectiv vizat în cadrul tezei, ce a urmărit să confirme gama variată de gazde receptive, l-a reprezentat efectuarea unor investigații sero-epidemiologice în zona de est a României, pentru a putea detecta potențiale semnale serologice. Activitățile conexe acestui obiectiv au fost reprezentate de recoltarea de probe de sânge de la gazde receptive incidentale sau cu rol de gazde amplificatoare și realizarea a patru anchete sero-

epidemiologice. Primele două anchete au urmărit detecția anticorpilor IgG anti-flavivirusuri, la gazde incidentale, respectiv la cai din gospodării private și la câini din padocuri, gospodării și clinici. Cele două specii au fost alese pe baza studiilor anterioare, ce au avut ca substrat investigații serologice publicate în literatura de specialitate, conform cărora ambele specii pot avea rol de santinele în infecțiile cu diferite arbovirusuri. A treia anchetă seroepidemiologică a avut ca scop detecția anticorpilor anti-VWN la păsări din Rezervația Biosferei Delta Dunării. Cele trei anchete au fost realizate folosind două metode de depistare serologice (tehnica imunoenzimatică ELISA și testul de seroneutralizare). Ultima analiză serologică, aflată sub umbrela conceptului „*One health*”, a vizat detecția anticorpilor specifici anti-VWN (IgG și IgM) și anti-virusului Usutu (IgG), pe cohorte din zona de est a României.

Al doilea obiectiv urmărit în cadrul studiului a fost reprezentat de detecția agenților patogeni de natură virală din țânțari, din două zone din partea de est a României, utilizând tehnici clasice și în timp real de biologie moleculară și tehnici *in vitro* (cultivarea pe culturi celulare de mamifere și derivate din țânțari). Activitățile ce au stat la baza acestui obiectiv și care au precedat detecția virală propriu-zisă, au fost reprezentate de colectarea țânțarilor, sortarea lor pe specii, sex și stadiu gonotrofic și aplicarea unor tehnici de laborator ce s-au succedat în cascadă, tehnici aliniate la cele mai actualizate standarde.

Ultimul obiectiv din cadrul tezei a urmărit identificarea și caracterizarea sușelor virale ale VWN circulante în zonele de studiu și analiza filogenetică a acestora, cu stabilirea relațiilor filogenetice cu celelalte tulpini identificate anterior în România și Europa și care se regăsesc în GenBank.

CAPITOLUL V DESCRIEREA CADRULUI ORGANIZATORIC ȘI INSITUȚIONAL ÎN CARE S-AU DESFĂȘURAT CERCETĂRILE

CHAPTER V DESCRIPTION OF THE ORGANIZATIONAL AND INSTITUTIONAL FRAMEWORK WHERE THE RESEARCH WAS DEVELOPED

Activitățile de cercetare menite să concure la realizarea scopului și a obiectivelor propuse în cadrul tezei, s-au desfășurat etapizat în patru instituții:

- Laboratorul de Serologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași (FMV-IS);
- Spitalul Clinic de Boli Infecțioase "Sfanta Parascheva" Iași;
- Laboratorul pentru entomologie medicală și capacitate vectorială, din cadrul *Institute of Infectology* (IMED), Friedrich-Loeffler, Germania;
- Departamentul pentru Sănătatea Animală, Unitatea de Virusologie, din cadrul *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*, Maisons-Alfort, Franța (ANSES-FR).

În cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași s-au realizat activitățile de-a lungul perioadei studiilor doctorale (2015-2020). În laboratorul de Serologie au fost realizate o parte din studiile serologice desfășurate pe câini, păsări, cai și oameni. De asemenea, în cadrul aceleași unități, s-au realizat activitățile de entomologie medicală: colectarea, sortarea și depozitarea specimenelor colectate.

Pentru realizarea analizei sero-epidemiologice conduse pe cohorta de pacienți umani, activitatea de recoltare a probelor și de colectare a datelor individuale ale pacienților s-a realizat în cadrul Spitalului Clinic de Boli Infecțioase "Sfanta Parascheva" din Iași. Activitatea s-a desfășurat în intervalul mai-septembrie 2019.

În perioada iulie-august 2018, activitatea s-a desfășurat în cadrul Laboratorului de Infectiologie al Institutului Friedrich-Loeffler, Germania, laborator de referință OIE, unde s-a realizat testarea serologică prin tehnica de seroneutralizare a probelor recoltate de la păsări.

În perioada octombrie 2019-februarie 2020, activitatea doctorală s-a derulat în cadrul Departamentului pentru Sănătate Animală, Unitatea de Virusologie, ANSES, Franța. În cadrul laboratoarelor din acest departament s-au desfășurat activitățile din cadrul tezei

doctorale ce necesită existența facilităților dintr-un laborator cu nivel de biosecuritate 3 (BSL3). Astfel, s-au realizat testări serologice prin tehnica imunoenzimatică ELISA, confirmarea rezultatelor pozitive prin tehnica de micro-virus neutralizare precum și extracțiile de ARN din eșantioanele de țânțari, urmate de amplificare virală, izolare virală și secvențiere.

CAPITOLUL VI
INVESTIGAȚII SEROLOGICE PRIVIND
PRINCIPALELE INFECȚII TRANSMISE DE ȚÂNTĂRI
LA OM ȘI ANIMALE

CHAPTER VI
SEROEPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION
REGARDING THE MAIN ARBOVIRAL INFECTION IN
ANIMALS AND HUMAN

Pentru realizarea detecției anticorpilor specifici în populațiile de animale clinic sănătoase, abordarea de primă intenție este reprezentată de testarea prin tehnica imunoenzimatică - ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Această tehnică se pretează *screening*-ului serologic cât și supravegherii epidemiologice, fiind cea mai uzitată și facilă metodă pentru acest scop, nefiind necesare condiții stricte de biosecuritate. Deoarece, prin tehnicile de detecție indirecte sau de competiție, poate fi detectată orice clasă de imunoglobuline (IgG, IgM etc.) și din cauza reacțiilor antigenice încrucișate cu alte flavivirusuri din același serocomplex, o probă considerată pozitivă prin ELISA necesită confirmare prin teste mai specifice: seroneutralizare sau metoda plajelor de liză (OIE.int 2020).

În cadrul răspunsului umoral, majoritatea anticorpilor neutralizanți împotriva flavivirusurilor recunosc proteina structurală E, înalt imunogenă, deși există și anticorpi care se atașează de prM/M. De asemenea, anticorpii pentru proteina nestructurală 1 (NS1), care este absentă din virion, sunt protectivi împotriva VWN *in vivo* (Diamond, Pierson, și Fremont, 2008).

Glicoproteina E este cea mai mare proteină de suprafață de la nivelul virionului și reprezintă principalul antigen care determină apariția anticorpilor neutralizanți. Această proteină prezintă însușiri comune la virusuri precum Dengue, virusul encefalitei de căpușă sau VWN. Ectodomeniul solubil al proteinei E prezintă trei domenii structurale DI, DII, DIII (Diamond, Pierson, și Fremont, 2008) dintre care DII este înalt conservat printre flavivirusuri iar domeniile DI și DIII conțin epitopii specifici virusului (Beck ș.a., 2017), DIII mediind, de asemenea și atașarea la membrana celulei (Beck ș.a., 2015).

6.1 Anchetă sero-epidemiologică privind infecția cu flavivirusuri la cai din zona de est a României

6.1 Seroepidemiological investigations regarding flavivirus infections in horses in the Eastern Romania

Infecția cu VWN la cai determină apariția unui sindrom neuro-invaziv sever, la 1% până la 10% din caii infectați. Febra cu VWN este o boală declarabilă, fiind obligatorie raportarea cazurilor la Oficiul Internațional de Epizootii cât și la Comisia Europeană (Beck ș.a., 2017).

În țările din Europa, *screening*-ul variază de la supravegherea clinică a cailor și oamenilor până la supravegherea activă prin teste serologice la păsări și alte specii infectate, dar și prin capturarea țânțarilor și ulterior detecția virală prin tehnici de biologie moleculară. Acțiunile de supraveghere activă se desfășoară în țările sau zonele unde s-a demonstrat infecția cu VWN la cai sau unde se practică vaccinarea (Chevalier, Lecollinet, și Durand, 2011). Cu toate acestea, indiferent de metoda de supraveghere, datorită sensibilității clinice la infecție, caii au rol de santinele, cazurile la această specie putând fi depistate înaintea apariției cazurilor umane (Beck ș.a., 2017).

Programele de supraveghere serologică realizate pe cai utilizează ca metode de depistare tehnica imunoenzimatică ELISA indirectă pentru depistarea IgG și IgM, iar pentru confirmare, ținând cont de gradul ridicat de înrudire antigenică cu alte virusuri din aceeași familie, se practică testele de neutralizare ale virusului (VNT), respectiv metoda plajelor de liză (PRNT) și seroneutralizarea. Aceste metode oferă detalii privind dinamica temporo-spațială a dispersiei virale iar caii și alte ecvine care prezintă un deznodământ clinic fatal ca urmare a simptomelor de natură neurologică, trebuie să fie testate prin tehnici virusologice și de biologie moleculară, inițial pentru rabie și ulterior pentru infecția cu VWN (Kauffman ș.a., 2016).

În infecția cu VWN la cai, asemeni oamenilor, răspunsul imun utilizează atât răspunsuri înnăscute cât și adaptative, în reacția imună precoce apărând un răspuns imun ce utilizează interferonii (Ahlers și Goodman, 2018). Aceștia induc apariția răspunsului imun bazat pe oligoadenilat sintetaza (OAS1) iar variațiile în gena OAS1 la cai a fost asociată cu schimbări în susceptibilitatea la infecția cu VWN (Rios ș.a., 2010). Asemeni păsărilor, la cai se declanșează un răspuns imun umoral, cu producție de anticorpi (Bielefeldt-Ohmann ș.a., 2017), în timp ce la ponei este întâlnită imunitatea pasivă prin anticorpi maternali. Acest tip de imunitate folosește anticorpilor pentru activarea rapidă a răspunsului imun, în vederea protecției mânărilor de infecția cu VWN (Wilkins, Glaser, și McDonnell, 2006).

Pentru determinarea certă a etiologiei bolii, testarea eșantioanelor prin tehnica de micro-virus neutralizare se recomandă să se practice simultan pentru virusurile strâns înrudite antigenic. Departajarea rezultatelor se bazează pe cuantificarea titrului de anticorpi neutralizanți, iar condiția pentru ca anticorpilor specifici să fie atribuiți unui anumit virus este

ca acesta să aibă titrul anticorpilor de patru ori mai mare decât al celui de-al doilea (Di Gennaro ș.a., 2014).

Scopul studiului de față a fost reprezentat de estimarea complexității riscului de difuzare a virusului pe baza capacității sale de a traversa bariera de specie pentru mai multe gazde incidentale și anticiparea fenomenelor de sănătate ulterioare, pe baza detecției anticorpilor specifici virusului West Nile în probe de ser recoltate de la cai din zona de est a României. Pentru îndeplinirea obiectivului, s-a realizat o investigație serologică în trei județe: unul cu o endemicitate confirmată la oameni anual din 2011 (Iași), un alt județ în care evoluția infecției cu VWN a fost sporadică iar vârful incidenței a fost reprezentat de cinci cazuri (Tulcea) și unul în care infecția la oameni a debutat în anul 2018, cu trei cazuri raportate (Vaslui).

6.1.1 Material și metode

6.1.1 Materials and methods

6.1.1.1 Recoltarea și condiționarea probelor

Cercetările au vizat determinarea prevalenței anticorpilor anti-VWN și celor contra virusurilor Usutu și encefalitei de căpușă, la cai din regiunea de est a țării, respectiv din 14 locații de pe raza județelor Iași, Vaslui și Tulcea. Probele de ser din Iași și Vaslui ($n = 326$), pentru că au provenit din zone în care nu au fost raportate cazuri la OIE, au fost recoltate concomitent cu eșantioanele destinate testării pentru anemia infecțioasă ecvină, în perioada februarie - aprilie conform Ordinului ANSVSA 35/2016 iar probele de la Tulcea ($n = 28$), în lunile mai și iulie (fig. 6.1.).

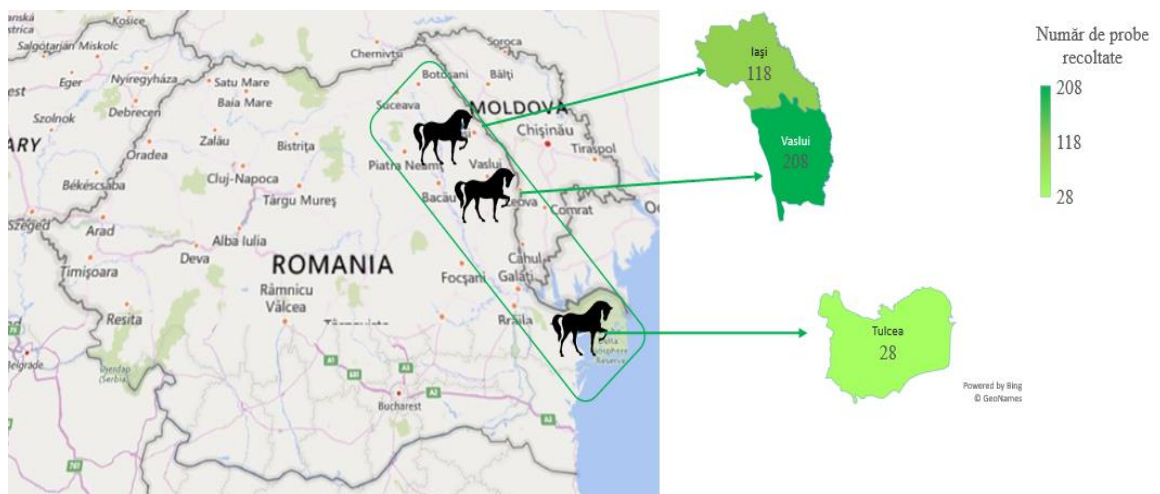


Figura 6.1 Zonele de recoltare a probelor incluse în studiu (original)

Figure 6.1 Collection points for counted for study (original)

Zonele au fost alese prin prisma continuării cercetărilor efectuate pe această specie (Ludu Oşlobanu L. ş.a., 2015; Crivei L. ş.a., 2019) pe raza judeţului Iaşi, unde, conform ECDC, evoluţia infecţiei cu VWN la oameni este una endemică, prin integrarea unui judeţ unde până în anul 2018 nu au fost raportate cazuri la oameni, respectiv judeţul Vaslui şi într-o zonă care, deşi abundă în factori biotici şi abiotici favorabili circulaţiei intense ale virusului (Tulcea), evoluţia infecţiei a fost una sporadică, cu un maxim de cazuri ($n = 5$) în anul 2019.

Probele au fost recoltate de către personalul veterinar autorizat cu acordul aparţinătorilor. Acestea au fost recoltate prin puncţia venei jugulare, transportate la laborator, centrifugate 10 min la 2000x g, pentru clarificare şi ulterior stocate la -20°C .

Eşantioanele au provenit de la cai crescuţi pentru tracţiune, reproducţie sau pentru echitaţie. În timpul perioadelor de odihnă, animalele au fost cazate în adăposturi colective semi-închise sau deschise, împreună cu alte specii de animale. Caii incluşi în studiu au provenit din gospodării cu un număr mic de cai, respectiv unul sau doi.

Datele individuale ale animalelor, colectate de la aparţinători, au fost împărţite în două variabile: categorie de vârstă şi sex. Prima variabilă a fost clasificată, după Epp ş.a., în trei categorii de vârstă: tineret (<5 ani), adult (între 5 şi 14 ani) şi senior (>14 ani) (Epp ş.a., 2007) iar cea de-a doua variabilă, în două categorii: masculi (ce include atât armăsarii cât şi exemplarele castrate) şi femele (Tabelul 6.1).

Tabel 6.1/ Table 6.1

Numărul de probe şi variabilele luate în considerare în studiu
Number and variables included in study

Judeţ	Sex				Categorie de vârstă				
	Femele	Masculi	NE	Total probe	Tineret	Adult	Senior	NE	Total probe
Iaşi	49	69	-	118	22	54	42	-	118
Vaslui	141	67	-	208	54	123	31	-	208
Tulcea	3	7	18	28	3	6	1	18	28
Total	193	143	18	354	79	183	74	18	354

NE:necunoscut

6.1.1.2 Testarea serologică

Testarea prin tehnica imunoenzimatică ELISA. Cele 354 probe de ser au fost testate utilizând *kit-ul* comercial ID-Screen West Nile Competition (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franţa), ce utilizează godeuri căptuşite cu un antigen purificat al virusului West Nile. Tehnica de lucru s-a realizat conform protocolului intern ANSES, fiind derivat din recomandările producătorului.

Tehnica permite identificarea anticorpilor împotriva virusului West Nile în probele de ser, diluate în prealabil $\frac{1}{2}$. În cazul în care, în serul de testat există anticorpi specifici anti-prM-E, aceştia se ataşează de antigen formând complexul antigen-anticorp. După o etapă de incubare şi de spălări succesive, conjugatul (anticorp secundar anti-prM-E, cuplat cu peroxidază) este distribuit în godeuri, fixându-se de situsurile antigenice, pentru a se

forma complexul antigen-conjugat. După cea de a doua etapă de incubare-spălare, se adaugă substratul cromogen, ce va determina virarea culorii în albastru, în cazul în care există complexul antigen-conjugat, deci lipsesc anticorpii specifici dirijați contra proteinelor prM și E. Dimpotrivă, dacă atașarea conjugatului la antigen este blocată de prezența anticorpilor specifici prezenți în proba de testat, conjugatul va fi eliminat prin spălare, nedeterminând schimbarea culorii în produsul de reacție.

În acest scop, prima etapă a constat în diluția probelor de testat, alături de martorii pozitiv și negativ și controlul intern, într-o placă de diluție de 96 de godeuri. Astfel, în toate godeurile s-au repartizat 60μl soluție Tampon de Diluție 2 și 60 μl din probele de testat și martorul pozitiv intern iar soluțiile pentru validarea rezultatelor, furnizate de producător, au fost repartizate la dublu. Ulterior diluției, din soluția rezultată, 100 μl au fost repartizați în placa ELISA, fiind urmată o perioadă de incubație de 90 minute, la temperatura ambientală (21 °C). După perioada de incubație, s-a realizat un lavaj triplu, cu 300 μl soluție, preparată în prealabil (10 ml soluție de spălare concentrată și 190 ml apă). Fixarea conjugatului s-a realizat prin adăugarea a 100 μl soluție 1X, preparată anterior (1 ml conjugat 10X cu 9 ml Tampon de Diluție 2), urmată de o a doua incubație de 30 minute, la temperatura de 21 °C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) și o nouă etapă de spălare, identică primei spălări. Următoarea etapă a fost reprezentată de adăugarea substratului cromogen, prin depunerea a 100 μl soluție revelatoare și incubarea pentru 15 minute, la 21 °C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), într-un loc întunecat iar după cele 15 minute necesare timpului de contact aceeași cantitate de soluție stop a fost depusă în godeuri.

În maxim 5 minute de la adăugarea soluției stop, s-a realizat măsurarea densității optice (DO), cu ajutorul unui spectofotometru, la 450 nanometri (nm). Conform protocolului, interpretarea rezultatelor este precedată de calcularea mediilor DO pentru perechile de martori: DO_{CN} (Densitatea optică pentru martorul negativ) și DO_{CP} (Densitatea optică pentru martorul pozitiv). Interpretarea rezultatelor implică calcularea procentului de negativitate (S/N), reprezentând raportul dintre valorile corectate ale densității optice ale eșantionului și respectiv ale controlului negativ, conform formulei:

$$\% \frac{S}{N} = \frac{DO \text{ a eșantionului}}{DO \text{ pentru media martorilor negativi}} * 100$$

Validarea rezultatelor presupune integrarea valorilor obținute între 0,700 și 0,300. Astfel, testul este considerat valid, dacă sunt îndeplinite următoarele criterii:

- Media valorilor densității optice pentru martorii negativi, depășește 0,700 (**$DO_{CN} > 0,700$**);
- Raportul dintre media densității optice pentru martorii pozitivi și media valorilor densității optice pentru martorii negativi este mai mică decât 0,3 (**$DO_{CP}/DO_{CN} < 0,3$**);
- Coeficientul de variație (CV) al martorilor negativi trebuie să fie mai mic decât 10% (**$CV_{CN} < 10\%$**).

Pentru validarea testului, valoarea procentuală a raportului S/N pentru probele pozitive (tabel 6.2) trebuie să fie mai mare sau egală cu 40% iar pentru cele negative mai mică sau egală cu 50%.

Tabel 6.2/Table 6.2

Valorile de referință pentru raportul S/P pentru interpretarea rezultatelor
Reference values of the S/P ratio for results interpretation

Rezultat	Status
$S/N \leq 40\%$	Pozitiv
$40\% < S/N \% \leq 50\%$	Dubios
$S/N \% > 50\%$	Negativ

Testarea prin tehnica de virus micro-neutralizare (MNT). Datorită gradului ridicat de înrudire antigenică existent între virusurile ce aparțin familiei *Flaviviridae* și pentru a exclude rezultatele fals pozitive, probele rezultate pozitive prin tehnica de detecție a IgG au fost testate printr-o tehnică de discriminare, mai specifică, respectiv tehnica de seroneutralizare. Aceasta este recomandată ca fiind tehnica „gold-standard”, conform Manualului de Diagnostic și Vaccinuri pentru Animalele Terestre elaborat de către Oficiul Internațional de Epizootii (OIE). Această metodă oferă un grad ridicat de specificitate (capacitatea unui test de depistare de a oferi un răspuns negativ pentru o pondere crescută de animale indemne) (Savuța, 2007), dar pare să fie mai puțin sensibilă (capacitatea unui test de depistare de a oferi un răspuns pozitiv pentru un număr mare de animale real infectate) (Savuța, 2007) decât tehnica imunoenzimatică ELISA și este de obicei folosită ca un instrument de confirmare și de titrare a anticorpilor neutralizați în infecția cu virusul West Nile (Beck ș.a., 2017).

Deoarece prezența sistemului complement din probele de testat ar putea determina activarea acestuia în mecanismele de apărare împotriva agenților patogeni, acesta reprezentând o punte funcțională între răspunsul imun innăscut și cel adaptativ (Dunkelberger și Song, 2010), înainte de a fi testate, probele de ser au fost diluate și inactivate.

Diluția probelor s-a realizat 1/5, însemnând 50 sau 100 μ l ser și 200 sau 400 μ l MEM fără ser fetal bovin (în funcție de cantitatea de ser disponibilă) iar inactivarea complementului s-a realizat la bain-marie, prin imersia tuburilor în apă, la 56 °C, pentru 30 de minute. Ulterior, probele au fost stocate la -20°C până la testarea prin tehnica de seroneutralizare.

Procedura urmărește cuantificarea titrului de anticorpi specifici diferitelor flavivirusuri și alphavirusuri, conform tehnicii de microneutralizare de referință descrisă în Manualul de Diagnostic pentru Animalele Terestre, ediția a șaptea, publicată în 2016 de către Oficiul Internațional de Epizootii (OIE), întreg protocolul desfășurându-se în condiții de biosecuritate de nivel 3.

Tehnica este utilizată pentru diagnosticul serologic, în cazul unei suspiciuni de infecție cu virusurile West Nile, Usutu, encefalite Japoneze, Bagaza sau virusul encefalitei de căpușe.

Testul de microneutralizare este o tehnică de seroneutralizare realizată în plăci de 96 de godeuri, ce urmărește detecția anticorpilor neutralizanți în proba ce urmează să fie testată. Principiul se bazează pe inhibarea *in vitro* a puterii infecțioase a virusurilor de către anticorpii neutralizanți prezenți în probă și direcționați în mod specific împotriva agentului infecțios de interes. Prezența anticorpilor neutralizanți specifici va bloca pătrunderea virusului într-o cultură de celule sensibile (celule VERO) și apariția efectelor citopatice (ECP).

Organizarea plăcilor. Etapa premergătoare tehnicii propriu-zise constă în organizarea plăcilor pentru diluții. Astfel, linia A a fost utilizată pentru urmărirea efectului citotoxic al eșantioanelor.

Linia H a fost utilizată pentru controlul suspensiei virale (în godeuri se regăsea doar suspensie celulară și suspensie virală, fără probă) și controlul suspensiei de celule (în godeuri se regăsea doar suspensia de celule, fără proba sau suspensie virală).

Coloanele 11 și 12 din prima placă au fost utilizate pentru verificarea titrului suspensiei virale (retro-titraj).

Coloanele de la 1 la 4, din prima placă, au fost utilizate pentru martorii pozitivi și negativi, depuși în duplicat.

Liniile de la B până la G au fost folosite pentru eșantioanele de testat, la diferite diluții: de la 1/5 la 1/160.

Înainte de adăugarea probelor de testat, în toate godeurile, exceptând coloanele 11 și 12 de la prima placă și liniile A și B, s-au adăugat 50 μ l mediu de întreținere DMEM.

Distribuirea și diluția serurilor. Următoarea etapă a constat în depunerea și realizarea diluțiilor seriate ale eșantioanelor. Astfel, în prima linie, respectiv linia menită verificării efectului citotoxic al probelor, au fost distribuiți 50 μ l probă, în timp ce în linia B au fost distribuiți 100 μ l probă. Ulterior, s-a realizat diluția seriată a probelor, pornind de la 1/5 până la 1/160, extrăgând 50 μ l probă din godeurile din linia B și adăugându-i în următoarea linie, peste cei 50 μ l mediu de întreținere DMEM. Tehnica a continuat în același manieră (50 μ l probă din linia anterioară, peste 50 μ l mediu existent) până la linia G, când după mixarea volumului final de 100 μ l (probă + mediu), se ejectează 50 μ l din proba diluată 1/160. La finalul etapei de diluție, în fiecare godeu se regăseau 50 μ l probă de diferite diluții.

Distribuirea suspensiei virale și incubarea plăcilor. Stocul viral necesar tehnicii de seroneutralizare (Tabelul 6.3) a fost produs prin pasaje pe linii celulare de mamifere (VERO) sau derivate din insecte (C6/36).

Sușele virale și diluțiile necesare pentru testul de seroneutralizare

Viral strains used for seroneutralisation test

Virus	Sușa virală	Diluția necesară pentru o placă de 96 de godeuri
West Nile (WNV)	IS98	1/1000
Usutu (USUV)	FR2018	1/500
Virusul encefalitei de căpușă (TBEV)	TBEV Hypr	1/4000

Anterior repartizării s-a procedat la prepararea unei suspensii virale 100TCID₅₀/50μl și s-a continuat cu realizarea retro-titrajului, cu patru godeuri/diluție (coloanele 11 și 12). Astfel, s-au adăugat:

- 50μl din diluția 10⁻⁴ a suspensiei în godeurile corespunzătoare (de la E12 la H12);
- 50μl din diluția 10⁻³ a suspensiei în godeurile corespunzătoare (de la E11 la H11);
- 50μl din diluția 10⁻² a suspensiei în godeurile corespunzătoare (de la A12 la D12);
- 50μl din diluția 10⁻¹ a suspensiei în godeurile corespunzătoare (de la A11 la D11).

Ulterior retro-titrajului, s-au depus 50μl suspensie virală în toate godeurile coloanelor de la 1 la 10, exceptând godeurile corespunzătoare verificării efectului citotoxic (linia A) și cele pentru controlul celulelor (linia H, coloanele 6 - 10), godeuri în care suspensia a fost substituită cu 50μl mediu de întreținere DMEM.

În vederea realizării fazei de absorbție, s-a realizat o etapă de incubare în care plăcile au fost introduse la 37°C (± 1 °C) și 5% de CO₂, pentru 90 de minute (± 9 minute), interval de timp în care s-a realizat prepararea suspensiei celulare.

Distribuirea suspensiei de celule. Pentru prepararea suspensiei de celule au fost tripsinate monostraturi de celule din flacoane cu o suprafață de 75cm² (tip T75) cu celule renale de maimuță (Vero), în număr dependent de numărul plăcilor integrate pentru analiză, după ce în prealabil a fost estimat gradul de confluență al celulelor. Tripsinarea s-a realizat după ce mediul de întreținere a fost îndepărtat și monostratul de celule a fost spălat cu soluție PBS. După adăugarea a 2-4 ml Tripsină, flacoanele au fost introduse la incubator (37°C) pentru cinci minute pentru detașarea celulelor de pe suprafața de creștere. Acțiunea tripsinei a fost stopată prin adăugarea de 6-8 ml mediu DMEM, cu care s-a realizat lavajul flaconului pentru detașarea completă a celulelor.

După resuspendarea celulelor în mediu de întreținere complet, s-a determinat numărul de celule viabile per ml, într-o diluție de 1/10. Pentru aceasta, s-au introdus în camera de numărare 10 μl celule și 90 μl albastru Trypan, numărarea celulelor realizându-se automat, utilizând robotul TC10 Automated Cell Counter (Bio-Rad, California, U.S.A). Pentru realizarea suspensiei virale, cu o concentrație finală de 2x10⁵ celule/ml pentru

virusurile West Nile și Usutu și de 4×10^4 celule/ml pentru virusul encefalitei de căpușă, s-a utilizat formula:

$$Vi \times Ci = Vf \times Cf,$$

unde: - Vi = volumul inițial; Ci = concentrația inițială; Vf = volumul final și Cf = concentrația finală.

Calcularea necesarului de celule pentru toate plăcile analizate a fost urmată de distribuirea a 100 μ l suspensie de celule în toate godeurile și ulterior, incubarea plăcilor la 37 °C (± 1 °C) până la 3 – 5 zile.

Validarea testului. Citirea plăcilor s-a realizat la microscop inversat, pentru a observa absența sau prezența efectului citopatic (observarea celulelor rotunjite și refringente, în infecția cu flavivirusuri). Pentru validarea testului, inițial s-a verificat titrul suspensiei virale. Astfel:

- la o diluție de 10^{-1} , efectul citopatic (ECP) trebuia să fie prezent în toate cele patru godeuri (A11 – D11);
- la o diluție de 10^{-2} , efectul citopatic trebuia să fie prezent în unul până la trei godeuri, din cele patru (A12 – D12);
- pentru următoarele diluții (10^{-3} , 10^{-4}), ECP nu trebuie să fie prezent în nici un godeu.

Verificarea godeurilor martorilor. Pentru validarea tehnicii, probele martor pentru suspensiile virale și celulare și linia pentru verificarea citotoxicității, trebuie să fie conforme:

- godeurile din ultima linie, cele menite „controlului suspensiei celulare”, permit verificarea creșterii și stării corespunzătoare a celulelor, precum și lipsa ECP;
- godeurile din ultima linie, cele menite „controlului suspensiei virale”, permit vizualizarea ECP, specific infecției cu virusul de interes;
- monostratul de celule din godeurile din prima linie (A), trebuie să fie intact, fără efect citotoxic. În eventualitatea în care proba de testat are efect citotoxic, aceasta trebuie retestată;
- serul de referință pozitiv are un efect neutralizant asupra virusului și blochează formarea ECP până la diluția corespunzătoare reversului titlului său de anticorpi neutralizanți;
- serul de referință negativ nu are efect neutralizant, deci ECP este prezent pentru toate diluțiile.

Citirea probelor. Un eșantion este considerat pozitiv dacă nu se observă niciun ECP la prima diluție testată.

Titrul anticorpilor din ser corespunde inversului ultimei diluții la care nu a fost observat niciun ECP. Serurile fiind diluate cu un factor de 2 în timpul distribuției virusului, titrurile sunt astfel între 10 și 320.

6.1.2 Rezultate și discuții

6.1.2 Results and discussion

Rezultatele au fost validate dacă au fost îndeplinite următoarele criterii: dacă celulele nu sunt protejate (ECP prezent), indiferent de concentrația serului, proba este considerată negativă; dacă, în schimb, celulele sunt protejate de la prima diluție, proba este considerată pozitivă iar titrul anticorpilor prezenți în probă corespunde inversului ultimei diluții fără ECP.

S-a considerat negativă proba la care infecția s-a produs indiferent de concentrația serului (Ayadi ș.a., 2017). O probă de ser a fost considerată pozitivă dacă celulele au fost protejate la prima diluție pentru unul dintre cele două virusuri (WN și USUV).

Identificarea flavivirusului infectant, pentru probele testate în paralel, s-a bazat pe considerarea virusului cu cea mai mare capacitate neutralizantă și cu un factor de diferențiere pentru titrul anticorpilor de minim patru (Beck ș.a., 2015).

6.1.2.1 Rezultate obținute în urma testării prin tehnica imunoenzimatică (ELISA).

În urma testării serologice de primă intenție, din totalul de 354 de eșantioane provenite de la cai sănătoși din punct de vedere clinic, din trei județe (Iași, Vaslui și Tulcea), anticorpii anti-VWN au fost depistați în 165 de probe, corespunzând unei prevalențe de 46,6% (95% CI 41,4 – 51,8%) iar șase probe au avut un rezultat dubios.

Ca urmare a acestei testări inițiale, s-a obținut astfel un prim semnal al existenței anticorpilor anti-VWN în probele de ser studiate.

Între județele incluse în studiu există diferențe notabile, ce pot fi corelate cu incidența cazurilor la oameni. Astfel, ponderea cea mai crescută a pozitivității a fost observată în județul Iași, urmată de Vaslui și Tulcea (tabelul 6.4).

Tabel 6.4/Table 6.4

Numărul total de probe ELISA pozitive în județele incluse în studiu

Number of ELISA positive samples by county

Județ	Nr. probe testate	Nr.probe ELISA pozitive	IC 95% pe Județ	Procent (%) / Județ
Iași	118	74	53,99 - 71,44	62,71
Vaslui	208	86	34,65 - 48,04	41,34
Tulcea	28	5	3,67 - 32,04	17,9
Total probe	354	165		

În ceea ce privește variabilele analizate, din totalul probelor testate ($n = 354$), între cele două sexe nu a existat o diferență semnificativă: prevalența la femele a fost de 25,7% iar la masculi de 20,33%. În schimb, s-a putut observa o diferență remarcabilă între categoriile de vârstă (tabelul 6.5). Astfel, vârful detecției anticorpilor anti-VWN a fost depistat la animalele adulte, cu vârsta cuprinsă între cinci și 14 ani, respectiv, 27,4 %, urmate de animalele de peste 14 ani (categoria senior) cu 15,25 %, iar la tineret s-a înregistrat o prevalență de 3,38%.

6.1.2.2 Rezultate obținute prin testul de virus neutralizare (MNT)

Pentru excluderea răspunsurilor fals-pozitive ca urmare a reacțiilor încrucișate cu alte flavivirusuri, după testarea serologică, probele pozitive ($n = 165$) și cele cu rezultat dubios ($n = 5$) au fost testate prin tehnica de neutralizare discriminantă. Astfel, din totalul de 170 de probe, pozitive și dubioase, dependent de cantitatea de ser, din probă, disponibilă, au fost retestate 168 de probe, urmărindu-se confirmarea legăturii directe dintre rezultatele pozitive obținute prin ELISA cu prezența anticorpilor neutralizanți specifici flavivirusurilor.

În urma testării prin tehnica de virus micro-neutralizare (MNT), s-a dovedit prezența anticorpilor specifici anti-VWN în 136 din cele 168 probe retestate (grad discriminare = 80,95 %), cu o seroprevalență cumulată de 38,4 % (136/354) față de 46,6 % la ELISA, cu valori ale titrului de anticorpi între 10 și peste 320, cele mai multe probe având valori ale titrului de 1:80 și 1:160 (tabelul 6.6). Aceste rezultate susțin gradul mai mare de specificitate al MNT față de ELISA.

Tabel 6.5/Table 6.5

Rezultatele obținute prin ELISA, în funcție de variabile
ELISA results according to variables considered in study

Variabilă: Sex				Variabilă: Categorie de vârstă			
	Nr probe pozitive prin ELISA	Ponderea (%) din totalul probelor pozitive (n=165)	Ponderea (%) din totalul probelor testate (n=354)		Nr probe pozitive prin ELISA	Ponderea (%) din totalul probelor pozitive (n=165)	Ponderea (%) din totalul probelor testate (n=354)
Femele	91	55,15	25,7	Tineret	12	7,27	3,38
Masculi	72	43,63	20,33	Adult	97	58,78	27,4
NE	2	1,21	0,56	Senior	54	32,72	15,25
Total	165	100	-	NE	2	1,21	0,56
				Total	165	100	-

În ceea ce privește variabilele luate în studiu, valorile cele mai crescute ale seropozitivității, obținute prin tehnica de MNT, au fost observate la femele (21,46%) și la exemplarele adulte, cu vârsta cuprinsă între cinci și 14 ani, respectiv 22,88% (tabelul 6.7).

De asemenea, au fost depistate patru probe pozitive atât pentru VWN cât și pentru VUSU, cu valori ale titrului pentru cel din urmă situate între 10 și 20. Întrucât condiția pentru ca anticorpii specifici să fie atribuiți unui anumit virus este ca acesta să aibă titrul anticorpilor de patru ori mai mare decât al celui de-al doilea, cele patru probe reacționate au fost considerate pozitive doar pentru VWN (tabelul 6.8).

De asemenea, două probe pozitive prin ELISA, provenite din Tulcea, au fost considerate negative prin MNT ca urmare a efectului citotoxic al serului.

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.

Tabel 6.6/Table 6.6

Titlul anticorpilor anti-VWN obținuți în urma testării prin MNT a probelor pozitive prin ELISA

Anti WNV antibodies titre resulted after MNT testing

Județ	Total probe testate serologic	Nr. probe testate prin MNT	Titlul anticorpilor specifici VWN							Total probe pozitive pentru VWN prin MNT
			1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	>320	
Vaslui	354	168	9	9	11	11	14	11	0	65
Iași			9	11	6	18	13	2	10	69
Tulcea			0	0	0	0	1	1	0	2
			18 (5%)	20 (5,6%)	17 (4,8%)	29 (8,2%)	28 (8%)	14 (4%)	10 (2,8%)	136

Tabel 6.7/Table 6/7

Rezultatele pozitive obținute în urma testării prin MNT, în funcție de variabilele incluse în studiu

MNT positive results based on studies variables

Variabile							
Variabilă: Sex				Variabilă: Categorie de vârstă			
Nr probe pozitive prin MNT		Ponderea (%) din totalul probelor pozitive (n=136)	Ponderea (%) din totalul probelor testate (n=354)	Nr probe pozitive prin MNT		Ponderea (%) din totalul probelor pozitive (n=136)	Ponderea (%) din totalul probelor testate (n=354)
Femele	76	55,88	21,46	Tineret	8	5,88	2,259
Masculi	60	44,11	16,94	Adult	81	59,55	22,88
Total	136	100		Senior	47	34,55	13,27
				Total	136	100	

Tabel 6.8/Table 6.8

Titrul comparativ al anticorpilor pentru probele pozitive pentru VWN și VUSU, prin testul de virus microneutralizare

Comparable antibodies titre in positive samples for WNV and USUV, by MNT

ID probă	Sexul animalului	Vârsta în ani	Categorie de vârstă	Titru anticorpi anti-VWN 7 zile p.i	Titru anticorpi anti-VUSU 3 zile p.i
VS 20	F	9	Adult	320	20
VS 48	F	6	Adult	160	10-20
VS 77	F	12	Adult	160	10
VS 2019	F	11	Adult	320	20

Studiul desfășurat pe probele de ser colectate de la cai din trei județe din estul României (Iași, Vaslui și Tulcea), a relevat o prevalență a anticorpilor anti-VWN de 38,4 % (136/354), această pondere reprezentând animalele infectate dar care nu manifestă semne clinice și care nu au fost raportate la Oficiul Internațional de Epizootii (OIE).

În ceea ce privește focarele notificate la OIE, în intervalul ianuarie 2006 - decembrie 2019, România a raportat focare în anii 2010 și în 2018. În anul 2010, au fost notificate în Brăila două focare, cu cinci cazuri și în Constanța un focar, cu un caz. În anul 2018 au fost confirmate, prin detecția IgM, două focare în județele Ilfov și Covasna, la caii de muncă (tracțiune) din gospodăriile populației. Astfel, în Ilfov, din cele 56 animale susceptibile, două au fost confirmate iar în Covasna, din cele 78 de animale susceptibile, patru au fost confirmate (OIE.int).

Valorile prevalenței anticorpilor specifici la cai din zonele de studiu din județul Iași [19,5 % (CI_{95%} 15,36-23,62)] și din județul Vaslui [18,4 % (CI_{95%} 14,33-22,39)] sunt pozitiv corelate cu existența habitatelor larvare artificiale și a zonelor de acumulare a apei antropizate, precum și cu abundența speciilor de animale sinantropice și a vegetației existente în gospodăriile private. În schimb, prevalența anticorpilor în serurile de la cai din Tulcea, deși redusă [0,6 % (2/354)] comparativ cu valorile observate în celelalte două județe, este pozitiv corelată cu prezența zonelor umede, cu prezența păsărilor sălbatice și cu abundența și diversitatea speciilor de vectori. Numărul relativ mic de probe recoltate din această zonă poate fi considerat o limitare a studiului, ceea ce poate conduce la probabilitatea subaprecierii valorii reale a seroprevalenței la cai.

În ceea ce privește valoarea seroprevalenței constatată de noi, comparativ cu studiile desfășurate anterior în zone endemice, aceasta este apropiată de cele obținute în urma unor acțiuni de supraveghere serologică din alte țări: 38% în regiunea Toscana din Italia (Autorino ș.a., 2002), 34% în Andaluzia, Spania (García-Bocanegra ș.a., 2011) și 34% în departamentul Var din Franța (Durand ș.a., 2005). Valori ușor mai scăzute au fost obținute în cadrul unui studiu derulat în patru insule din Oceanul Indian, care a urmărit stabilirea prevalenței anticorpilor anti-VWN cât și corelarea variabilelor sex, vârstă și loc de proveniență cu riscul de infecție al animalelor. Ca urmare a obținerii unei seroprevalențe

acumulate de 27%, s-au putut corela în mod semnificativ două variabile, respectiv vârsta și locul de proveniență a animalelor (Cardinale ș.a., 2017).

Rate superioare ale seroprevalenței au fost descrise în Maroc (60%) (Durand ș.a., 2016) și în Senegal (85%) (Chevalier ș.a., 2010). La polul opus, valori inferioare celei observate în cadrul studiului nostru (38,4%) au fost observate în Ucraina, unde prevalența anticorpilor specifici a fost detectată la 16,6% din cei 310 cai incluși în studiu (Ziegler ș.a., 2013a) și în Spania 7,1 % (García-Bocanegra ș.a., 2012).

În schimb, un studiu realizat în Germania între 2010 și 2012, ce a avut ca scop detecția anticorpilor specifici în serurile a 5178 de cai, a demonstrat totodată și sensibilitatea/specificitatea relativă a testelor de depistare comerciale ca urmare a reacțiilor serologice încrucișate pentru virusurile din aceeași familie. În urma studiului, seroprevalența inițială pentru virusul West Nile, obținută ca urmare a testării prin ELISA, nu a putut fi confirmată prin seroneutralizare, probele pozitive fiind legate de prezența anticorpilor anti-TBEV (Ziegler ș.a., 2013b) .

În privința variabilei „categoria de vârstă”, se poate observa o directă proporționalitate între vârsta animalelor și seroprevalență. Astfel, la animalele în vârstă de peste cinci ani s-a remarcat o seroprevalență crescută, semnificativă din punct de vedere statistic comparativ cu cele din categoria tineret, la care prevalența a înregistrat o pondere de 5,88%.

Rezultatele obținute sunt comparabile unui alt studiu, în urma căruia s-a demonstrat că valorile prevalenței sunt mai crescute la adulți, ca urmare a expunerii de-a lungul timpului și a persistenței anticorpilor anti-VWN pentru minim 15 luni (Franson ș.a., 2011). Vârsta animalelor ca factor de risc a mai fost demonstrată într-un studiu condus în 2004, de Salazar și autorii., conform căruia animalele de peste trei ani ar fi fost mai afectate, comparativ cu cele cu vârsta sub doi ani (Salazar ș.a., 2004).

În ceea ce privește sexul animalelor, deși diferența dintre femele și masculi nu este una semnificativă (patru cai), acesta ar putea influența seropozitivitatea cumulată. Rezultatele cercetărilor noastre sunt în conformitate cu un alt studiu, în care s-a observat faptul că femelele erau de 2,9 ori mai predispuse să moară în urma infecției cu VWN, comparativ cu masculii (Salazar ș.a., 2004). Contrar rezultatelor (predispoziția fatalității femelelor) și a studiului respectiv, Epp ș.a., 2007, în urma unui studiu descriptiv, au demonstrat faptul că masculii ar putea fi mai afectați decât femelele, în cadrul investigațiilor rata fatalității la aceștia fiind de 1,9 ori mai mare comparativ cu cea a femelelor. Argumentul ar fi susținut de faptul că, la unele mamifere, este întâlnit un aspect dihotomic al secreției de testosteron, respectiv sporirea caracterelor sexuale și afectarea funcționalității sistemului imunitar, aceștia având o imunitate mai redusă comparativ cu femelele (Epp ș.a., 2007).

Valoarea relativ crescută a seroprevalenței cumulate (38,4%) constatată de noi poate fi explicată prin existența unor posibili factori de risc, cum ar fi numărul mic de cai (unul sau doi) pe gospodărie și mișcarea animalelor în ultimele șase luni. Ipoteza primului factor de risc este susținută în cadrul studiului condus de Garcia-Bocanegra ș.a. în 2012,

conform căruia probabilitatea ca un cal să fie seropozitiv este de 4,6 ori mai mare la caii proveniți din grupuri cu maxim șase cai. Acest lucru este justificat prin faptul că animalele crescute în colectivități mai mari beneficiază de condiții de management sau bunăstare mai bune, la care se adaugă imunitatea de grup (un vector nu se poate hrăni decât pe un număr mic de animale într-o perioadă de timp dată). Aceeași ipoteză este demonstrată și într-un studiu condus de Epp ș.a., în 2007, unde majoritatea cailor afectați (73%) proveneau din turme de maxim zece indivizi. În cadrul aceluiași studiu, cel de-al doilea factor de risc, respectiv, mișcarea animalelor, a avut o pondere de 3,8% din totalul animalelor afectate, acestea deplasându-se minim 15 km de la locul de proveniență, cu trei săptămâni înainte de apariția semnelor clinice (Epp ș.a., 2007).

Un alt factor de risc, citat în același studiu, ar putea fi reprezentat de culoarea animalului, remarcându-se faptul că animalele cu o culoare a robei mai închisă ar fi mai afectate de infecția cu VWN. În studiul de față, această variabilă este luată în considerare numai pentru caii din Iași, la care culorile roib ($n = 46$) și murg ($n = 46$) sunt majoritare și la care seroprevalența este mai crescută 14,7 % (52/92) (95% IC 11 - 18,3).

Deși virusul s-a dovedit infecțios la un număr crescut de mamifere, cercetările s-au focalizat asupra ecvinelor, specie la care infecția este, în mod particular, mai prevalentă, cu exprimări clinice, fie șterse, fie fatale (Sejvar, 2003).

În România, studii efectuate de Ludu și colab., pe probe de ser provenite de la cai au fost desfășurate în trei ani succesivi (2006, 2007 și 2008). În urma acestora, au fost obținute valori ale seroprevalenței cuprinse între 15,2 % și 65,4%. Maximul a fost înregistrat în anul 2007, în timp ce valorile sub 20 % (15,2 și 17,4 %) au fost remarcate în anul 2006 și respectiv în anul 2008.

În anul 2011, din 808 probe testate, anticorpii specifici VWN au fost detectați în 58,5% din eșantioane (Ludu Oslobanu ș.a., 2014) iar în anul 2013 seroprevalența constatată a fost de 53,33% pentru probe recoltate din județele Buzău, Brăila și Tulcea (Ludu Oslobanu ș.a., 2015). O valoare a seroprevalenței apropiată de cea din anul 2011 a fost observată în cadrul unui studiu desfășurat pe cai din județul Iași în anul 2018, respectiv 59,7 % (Crivei ș.a., 2019). Tot în anul 2018, într-o acțiune de xenomonitorizare, ce utilizează insectele hematofage în vederea studierii preferințelor trofice și a infecțiilor la nivel de comunitate, s-a obținut o seroprevalență de 3,1% la cai din Delta Dunării (Tomazatos ș.a., 2019).

Rezultatele obținute de către noi ca urmare a testării pentru detecția anticorpilor anti-TBEV prin tehnica *gold standard* - seroneutralizare, au infirmat circulația acestui flavivirus în populația de cabaline din zonele incluse în studiu.

În România, virusul encefalitei de căpușă a fost detectat în căpușele ixodide, prin tehnici de biologie moleculară, prin amplificarea regiunii 3' non-codante a virusului (Răileanu, 2016). În ceea ce privește detecția semnalelor serologice la animale, anticorpii specifici anti-TBEV au fost detectați la oi, cu valori ale seroprevalenței de 10% în Sibiu (Chitimia-Dobler ș.a., 2019) și de 15,02% în zona de nord a țării (Salat ș.a., 2017) și la capre, în cadrul unui studiu desfășurat în 2011 și 2012 (Chitimia-Dobler ș.a., 2019).

6.1.3 Concluzii parțiale

6.1.3 Partial conclusion

1. Cercetările noastre au demonstrat existența anticorpilor anti-VWN la cai din toate cele trei județe luate în studiu, cu o seroprevalență cumulată de 38,4% (136/354), **profilul serologic al cailor** putând reprezenta un **indicator util** în vederea evaluării riscului de infecție pentru oameni din zonele rurale.
2. Seroprevalența înregistrată în studiul nostru (38,4%) este **comparabilă** cu rezultatele altor studii desfășurate în România și în **alte țări** din regiune și din lume.
3. Seroprevalența constatată de noi la cai în fiecare județ luat în studiu este **corelată în mod direct** cu prevalența cazurilor de infecție cu VWN înregistrate la oameni în aceleași județe.
4. În urma testării prin tehnica de virus micro-neutralizare (MNT) a celor 168 probe pozitive inițial la ELISA, s-a dovedit prezența anticorpilor specifici anti-VWN în 136 de probe (grad discriminare = 80,95 %), cu o seroprevalență cumulată de 38,4 % (136/354) față de 46,6 % la ELISA. Aceste rezultate susțin puterea discriminatorie și gradul mai mare de **specificitate al MNT** față de ELISA.
5. Referitor la **variabilele asociate infecției cu VWN** analizate prin MNT în studiul nostru, au fost observate o seroprevalență ușor mai mare, dar nesemnificativă, la sexul femel (55,88% față de 44,11%) și o seroprevalență semnificativă din punct de vedere statistic la categoria de vârstă adult comparativ cu categoria tineret (59,55 față de 5,88 %), rezultate comparabile cu cele relatate în alte studii.
6. Circulația virusului în populațiile de cai din zone rurale și peri-urbane din partea de est a țării, demonstrată prin existența anticorpilor specifici în serul animalelor, denotă faptul că în aceste areale **ecosistemele antropizate** întrețin populațiile de vectori competenți și propagarea virală.
7. Investigațiile întreprinse în cadrul studiului nostru **nu au putut confirma** serologic infecția cu **VUSU**, deși au existat semnale de co-infecție cu VWN în patru probe de ser testate prin MNT dar care au prezentat un titru insuficient (între 10 și 20).
8. Testarea serologică pentru detecția anticorpilor specifici virusului **encefalitei de căpușă nu a confirmat** prezența acestuia în populația de cai din zona de est a României, nefiind remarcate nici semnale de co-infecție.
9. Considerăm că lipsa unui sistem organizat și integrat (uman și veterinar) de **supraveghere sistematică** conduce la subestimarea capacității infecțioase și a expansivității virusului WN în diverse zone din țară.

6.2 Anchetă sero-epidemiologică privind infecția cu flavivirusuri la păsări din zona de est a României

6.2 Seroepidemiological investigations regarding flavivirus infections in birds in the Eastern Romania

Integrate în ciclul de transmitere al celui mai important arbovirus, păsările au un rol de pivot în transmiterea și vehicularea virusului West Nile, prin rolul lor de gazde amplificatoare sau rezervoare, atât prin efectul direct asupra populațiilor de păsări, cât și prin rolul lor în vehicularea virală pe distanțe mari. Astfel, infecția cu virusul WN poate duce la decimarea populațiilor de păsări (Kain și Bolker., 2019), în timp ce comportamentul migrator al acestora contribuie în mod direct atât la translocarea VWN din Africa către alte zone, cât și la menținerea fenomenului de urgență și re-urgență virală (Brugman ș.a., 2018).

Rolul de gazde amplificatoare al păsărilor este dependent de interacțiunea unor factori cum ar fi: (i) susceptibilitatea la infecție; (ii) persistența viremiei la niveluri suficient de ridicate pentru a infecta țăntării; (iii) densitatea indivizilor naivi din punct de vedere imunologic; (iv) „atractivitatea” speciei față de vectori (ornitofili și oportuniști); (v) rata mortalității, inclusiv a mortalității specifice pentru VWN (Taieb ș.a., 2020).

Deși peste 50% dintre păsările din diferite ordine sunt susceptibile la infecția letală cu VWN, în Europa, păsările din familia *Corvidae* pot avea rol de sentinela pentru detecția virală precoce (Koraka ș.a., 2016). Dintre acestea, coțofana (*Pica pica*), datorită comportamentului sedentar, poate fi folosită cu eficiență pentru detecția circulației virale în zonele endemice (Napp ș.a., 2019).

6.2.1 Material și metode

6.2.1 Materials and methods

6.2.1.1 Descrierea zonei de recoltare a probelor de la păsări

Rezervația Delta Dunării este o zonă relativ mică (580.000 de hectare/5800 km²), finalizând cei 2860 km pe care Dunărea îi parcurge pe teritoriul Europei, din Germania până la Marea Neagră. Habitatul și biodiversitatea Deltei Dunării sunt protejate de România și UNESCO din 1990. Faimoasă pentru diversitatea și abundența speciilor de păsări, cu 331 de specii sălbatice (Vasić ș.a., 2019), Delta Dunării reprezintă principala escală a acestora în rutele migratorii spre Africa și înapoi spre Europa (ddbra.ro, 2020).

Zona Sălcioara este situată în partea sudică a Deltei Dunării, în mijlocul și partea vestică a Lagunei Razim-Sinoe. Punctul de colectare a probelor din studiul nostru este situat la intersecția dintre satul Sălcioara și Iazul 6 Martie, fiind reprezentat de așezarea agricolă antropică și așezarea umană, iazuri, stufărișuri și ecosisteme lacustre întinse, intens populate de țăntări precum și de specii de păsări indigene și migratoare.

Zonele Furtuna și Stipoc sunt situate în partea de mijloc a Rezervației Deltei Dunării, în centrul deltei fluviale. Aria este alcătuită din canale naturale, păduri inundate, lacuri, stufărișuri și cu o faună bogată.

Zona Caraorman este de asemenea situată în centrul Rezervației Biosferei Delta Dunării, dar în partea vestică a deltei marine. Habitatul este format în mare parte din canale naturale, păduri inundate, lacuri, stufărișuri și dune de nisip acoperite sau nu de vegetație și populate de numeroase păsări migratoare.

Zona Murighiol se regăsește în partea vestică a Deltei Dunării, la sud de satul Murighiol, fiind cel mai antropic punct de colectare a probelor. În perimetrul punctului de colectare există mai multe zone antropice și naturale, câmpii, zone agricole, păduri, lacuri cu apă dulce, lacuri cu apă sărată și fluviul Dunărea. Asemenea celorlalte puncte de recoltare și această zonă este populată de numeroase specii de păsări indigene și migratoare (fig. 6.2.).

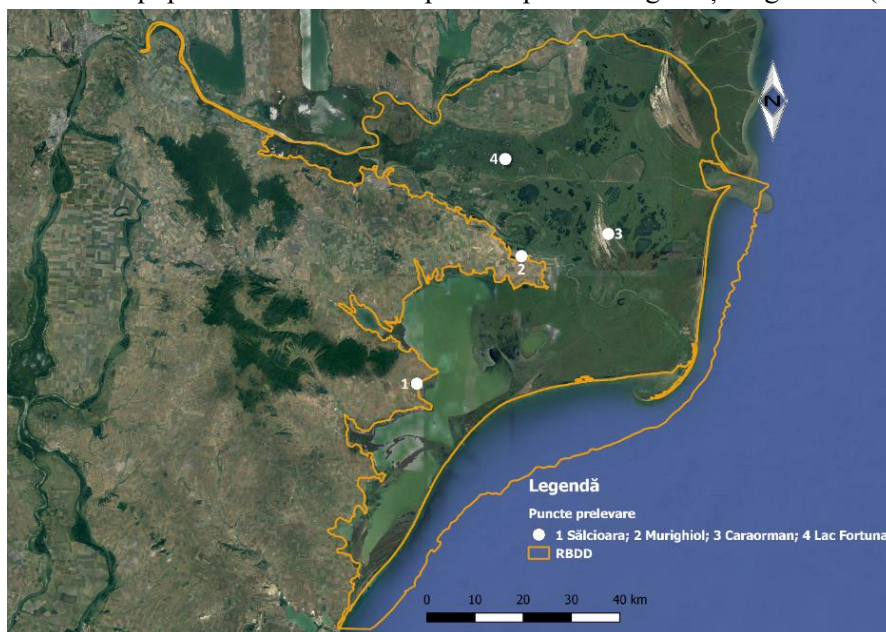


Figura 6.2 Punctele de prelevare a probelor din Rezervația Biosferei Delta Dunării (original)

Figure 6.2 Danube Delta Reservation collection points (original)

6.2.1.2 Recoltarea și condiționarea probelor

Prelevarea probelor de sânge de la păsări sălbatice s-a realizat etapizat, în al doilea semestru al anului 2016, eșantioanele fiind recoltate cu acordul Comisiei de Etică a Consiliului Științific al Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare Delta Dunării. Prima etapă a fost reprezentată de trei zile din sezonul de vară (19, 21, 23 iulie 2016) iar cea de-a doua în luna noiembrie (17 noiembrie 2016).

Scopul studiului a fost reprezentat de stabilirea seroprevalenței specifice VWN în patru locații diferite din Rezervația Biosferei Delta Dunării (DDBR), respectiv din Caraorman, Furtuna, Murighiol și Sălcioara.

Păsările sălbatice au fost capturate prin amplasarea plaselor (dimensiuni: 12 m lungime, 2,5 m înălțime, 5 buzunare de captură, 16×16 mm), după tehnica descrisă de Keyes și Grue, 1982.

Prelevarea probelor de sânge s-a realizat prin puncția venei jugulare, utilizând seringi pentru insulină de 1ml, sângele fiind ulterior transferat în tuburi Eppendorf de 2 ml și centrifugat pentru 10 min la 10.000 rpm pentru exprimarea serului. Eșantionajul probelor s-a realizat în funcție de cantitatea de ser disponibilă și mărimea păsării, urmată de stocarea serurilor la -20°C până la utilizarea ulterioară.

Categoria de vârstă (adult sau tineret) și genul au fost identificate pentru aproape toate păsările de la care a fost recoltat sânge. Toate păsările sălbatice capturate au fost în stare clinică bună. După recoltarea probei de sânge, păsările au fost măsurate, cântărite, li s-a aplicat un inel ornitologic și în cele din urmă au fost eliberate.

6.2.1.3 Testarea serologică

Tehnica imunoenzimatică (ELISA). Pentru realizarea obiectivului propus, 68 de probe de ser recoltate din cele patru locuri menționate anterior 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, protocolul respectând succesiunea etapelor de la punctul 6.1.1.2, cu excepția faptului că pentru acest studiu nu s-au folosit martori pozitivi interni.

Tehnica de virus neutralizare (VNT). Pentru confirmarea rezultatelor pozitive obținute prin tehnica ELISA de competiție s-a folosit un protocol de virus neutralizare în microformat, conform Manualului de Diagnostic al Animalelor Terestre, OIE, 2018. Prelucrarea propriu-zisă a probelor de ser a fost precedată de inactivarea acestora la 56°C , timp de 30 de minute, în baie de apă (Mettler, Germania). Astfel, în fiecare godeu s-au adăugat volume egale (câte 25 μL) de diluție dublă din serul de testat al păsărilor și din mediul de întreținere (MEM) (de la 1/5 la 1/640) și suspensie de virus 100 TCID₅₀ tulpina de VWN linia genetică 1 (Italia, tulpina 204913/09).

Plăcile cu amestecul ser/virus au fost incubate ulterior, pentru o oră, la 37°C în atmosferă cu 5% CO₂, în incubator MCO-19AIC (Sanyo, Japonia). După incubare, în godeuri s-a adăugat suspensie de celule în concentrație de 1×10^5 celule Vero (Cell Bank, FLI), într-un volum de 50 μL mediu MEM (Minimal Essential Medium, Zellbank, FLI), cu adaos de Penicilină/Streptomicină (Sigma Aldrich, Germania).

După cea de-a doua incubare, timp de cinci zile, s-a evaluat prezența efectului citopatic pentru fiecare probă, utilizând un microscop inversat (TMS-F, Nikon, Japonia), la o magnificație de 40x.

6.2.2 Rezultate și discuții

6.2.2 Results and discussion

6.2.2.1 Rezultatele obținute în urma testării prin tehnica imunoenzimatică (ELISA)

În cadrul acestui studiu, în patru locații diferite din Rezervația Biosferei Delta Dunării (DDBR), au fost capturate în total 68 de păsări sălbatice (10 în iulie și 58 în noiembrie 2016) de la care s-au recoltat probe (tabelul 6.9) care au fost supuse testărilor serologice (Caraorman n = 3, Furtuna n = 7, Murighiol n = 20 și Sălcioara n = 38). Din cele 68 de păsări sălbatice, 22 au fost încadrate în categoria „tineret” (eclozate în sezonul 2016) și 46 au fost în categoria „adulți”. În ceea ce privește păsările adulte, 12 au fost femele și 14 masculi iar pentru alte 20 de păsări sexul nu a fost determinat, ca urmare a imposibilității distincției genului pe baza penajului la momentul capturării.

În ceea ce privește compoziția speciilor, acestea au inclus păsări migratoare (*Acrocephalus scirpaceus* / lăcar de stuf, n = 3, *Coracias garrulus* / dumbrăveanca, n = 1), păsări rezidente (*Cyanistes caeruleus* / pițigoiul albastru, n = 1, *Parus major* / pițigoiul mare, n = 1, *Passer domesticus* / vrabia de casă, n = 23, *Passer montanus* / vrabia de câmp, n = 15, *Picus canus* / ciocănitoarea verzuie, n = 2, *Streptopelia decaocto* / guguștiucul, n = 1) și specii parțial migratoare (*Sturnus vulgaris* / praurul, n = 21).

Tabel 6.9/Table 6.9

Speciile, genul și statusul păsărilor sălbatice luate în studiu
The bird species and their migratory status

Locație	Familie	Specie	Denumire comuna	Status migrator (Mg / rezident (Rz)	Nr. probe testate
Caraorman	<i>Passeridae</i>	<i>Passer montanus</i>	Vrabia de câmp	R	2
	<i>Coraciidae</i>	<i>Coracias garrulus</i>	Dumbrăveanca	M	1
Furtuna	<i>Paridae</i>	<i>Parus major</i>	Pițigoiul mare	R	1
	<i>Acrocephalidae</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Lacar de stuf	M	3
	<i>Paridae</i>	<i>Cyanistes caeruleus</i>	Pițigoiul albastru	R	1
	<i>Picidae</i>	<i>Picus canus</i>	Ciocănitoarea verzuie	R	2
Murighiol	<i>Passeridae</i>	<i>Passer domesticus</i> M	Vrabia de casă	R	11
	<i>Passeridae</i>	<i>Passer domesticus</i> F	Vrabia de casă	R	7
	<i>Passeridae</i>	<i>Passer montanus</i>	Vrabia de câmp	R	2
Sălcioara	<i>Passeridae</i>	<i>Passer montanus</i>	Vrabia de câmp	R	11
	<i>Sturnidae</i>	<i>Sturnus vulgaris</i>	Graurul	Partial migrator	21
	<i>Columbidae</i>	<i>Streptopelia decaocto</i>	Guguștiucul	R	1
	<i>Passeridae</i>	<i>Passer domesticus</i>	Vrabia de casă	R	5
Total probe					68

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%, CI_{95%} 11,5%–12,1%). Patru probe pozitive au fost recolectate de la tineret (trei din locația

Sălcioara și una din locația Furtuna) și trei au fost prelevate de la păsări adulte (una la fiecare locație: Murighiol, Furtuna și Sălcioara), în timp ce pentru vrabia de câmp (de la Sălcioara) nu a fost posibilă identificarea sexului și a vârstei.

Cele mai multe probe pozitive au fost depistate în Sălcioara, 5/38 (13,2%, $CI_{95\%}$ 12,7%–13,7%), în Furtuna au fost depistate două probe pozitive din șapte (28,5%, $CI_{95\%}$ 22,8%–33,9%), în Murighiol, una singură din 20 (5%, $CI_{95\%}$ 4,6%–5,4%) iar în Caraorman, din cele trei probe recoltate, nici una nu a fost pozitivă.

În ceea ce privește raportul dintre seroprevalența depistată la păsările sălbatice și cele migratoare, din cele 43 de probe de ser provenite de la păsările sedentare, șase au fost pozitive iar din 25 de probe provenite de la păsările migratoare, două au fost pozitive (tabelul 6.10).

Tabel 6.10/Table 6.10

Seroprevalența obținută în funcție de statusul păsărilor
Seroprevalence obtained according to bird status

Statusul păsărilor	Testate	Pozitive	Seroprevalență
Păsări sedentare	43	6	13,95%
Păsări migratoare	25	2	8%

6.2.2.2 Rezultate obținute prin testul de virus neutralizare (VNT)

Seroneutralizarea, efectuată în vederea confirmării probelor pozitive, a fost realizată pe 51 de probe provenite din două locuri (Murighiol și Sălcioara), în timp ce pentru 17 probe cantitatea redusă de ser nu a permis alte testări ulterioare. Din aceleași considerente, cele 51 de probe nu au fost testate pentru alte flavirusuri circulante în Europa. Astfel, din totalul probelor testate pentru detecția anticorpilor neutralizanți anti-VWN, șase probe au fost confirmate pozitive [11,8%, $CI_{95\%}$ 2,92%–20,61%)], cu un titru al anticorpilor cuprins între 1:10 și 1:80 (tabelul 6.11).

În ceea ce privește riscul de infecție pentru oameni, păsările sălbatice pot fi considerate selectiv folositoare în anticiparea fenomenelor de sănătate ulterioare (Cooke, Grala, și Wallis, 2006). Pe plan local, amplificarea virusului este susținută de păsările rezidente, în timp ce păsările migratoare sunt implicate în vehicularea și dispersia virusului pe distanțe considerabile (Semenza ș.a., 2016). Un rol important în ciclul de transmitere epizootic îl au păsările care au eclozionat în cursul anului (Hamer ș.a., 2008).

În urma acestui studiu, la păsările sălbatice provenite din două din cele patru locații studiate (Murighiol și Sălcioara) din RBDD s-a înregistrat o seropozitivitate de 8,8% (6/68). Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele obținute în Serbia (8%) (Petrović ș.a., 2013), Polonia (13,3%) (Niczyporuk ș.a., 2015), Spania (14,41%) (Figuerola ș.a., 2008) sau Tunisia (17%) (Ayadi ș.a., 2017).

Tabel 6.11/Table 6.11

Exemplarele sălbatice din RBDD depistate pozitive pentru West Nile prin ELISA de competiție și rezultatul corespunzător prin virus-neutralizare (VNT)

Wild birds tested positive for WNV by ELISA and VNT

Specia	Vârsta	Sex	Data capturării	Loc	ELISA de Competiție	Titrul pentru VNT
<i>Passer montanus</i>	Indisponibil	Indisponibil	21.11.2016	Sălcioara	Pozitiv	1:10
<i>Passer domesticus</i>	Adult	M		Sălcioara	Pozitiv	1:40
<i>Passer domesticus</i>	Adult	M	17.11.2016	Murighiol	Pozitiv	1:10
<i>Picus canus</i>	Tineret	F	19.07.2016	Furtuna	Pozitiv	Indisponibil
<i>Picus canus</i>	Adult	F		Furtuna	Pozitiv	Indisponibil
<i>Streptopelia decaocto</i>	Tineret	Indisponibil	21.11.2016	Sălcioara	Pozitiv	1:20
<i>Sturnus vulgaris</i>	Tineret	Indisponibil		Sălcioara	Pozitiv	1:20
<i>Sturnus vulgaris</i>	Tineret	Indisponibil		Sălcioara	Pozitiv	1:80

În România, studiile efectuate pe păsările sălbatice și rezidente au demonstrat o seroprevalență de 5,2% în intervalul 2006 - 2008 (Ludu Oșlobanu ș.a., 2014). În cadrul studiului menționat, valorile individuale ale prevalenței anticorpilor anti-VWN la păsările sălbatice și cele domestice au fost 3,5% și respectiv 7,9% iar în funcție de specii, cele mai multe probe de la păsările sălbatice au provenit de la *Corvidae* și *Passeriformes* (Ludu Oslobanu ș.a., 2014), rezultatele confirmând faptul că, în cadrul acțiunilor de supraveghere, prevalența cea mai crescută a anticorpilor neutralizanți anti-VWN se regăsește la păsările din familia *Corvidae* (Sejvar, 2003). O valoare mai mare a prevalenței anticorpilor specifici la păsările sălbatice a fost raportată în România în intervalul 2011 - 2012, în cadrul studiului respectiv obținându-se o seroprevalență de 32,14 % (Paștiu ș.a., 2016).

Majoritatea speciilor de păsări sălbatice la care s-au depistat anticorpi specifici aparțin grupului de păsări rezidente implicate în ciclul de transmitere a VWN în RBDD. În contrast, în Germania, unde VWN nu a fost detectat până în anul 2018, anticorpii au fost detectați exclusiv la păsările migratoare, cu excepția unei păsări ce migrează pe distanțe scurte, respectiv cioara grivă (*Corvus corone cornix*) (Michel ș.a., 2018; Ziegler ș.a., 2012).

Circulația VWN sau a altor flavivirusuri strâns înrudite antigenic în sezonul de transmisie 2016 în RBDD, poate fi indicată cu ajutorul provenienței geografice a păsărilor

migratoare seropozitive. Rutele migratorii ale păsărilor sălbatice, evidențiază vehicularea arbovirusurilor.

Deși probele provenite de la două ciocănitori verzui (*Picus canus*) pozitive prin ELISA au fost prelevate în iulie, restul păsărilor sălbatice seropozitive au fost capturate și eșantionate în luna noiembrie, când probabilitatea detecției anticorpilor anti-VWN la păsările sălbatice este crescută ca urmare a timpului de expunere mai lung în timpul sezonului de transmitere.

6.2.3 Concluzii parțiale

6.2.3 Partial conclusion

1. Cele 68 de păsări capturate din patru zone din Delta Dunării în timpul sezonului de vară-toamnă din anul 2016 fac parte atât din categoria celor **sedentare** (n = 43), cât și **migratoare** (n = 25), compoziție ce asigură un cadru propice pentru întreținerea și difuzarea infecțiilor cu VWN și cu alte flavivirusuri.
2. Majoritatea speciilor de păsări sălbatice la care s-au depistat anticorpi specifici aparțin grupului de păsări **rezidente** implicate în ciclul de transmitere a VWN în Rezervația Biosferei Delta Dunării.
2. Detecția anticorpilor specifici pentru infecția cu VWN prin tehnica ELISA a relevat o prevalență a anticorpilor de 11,8% în probele testate (8/68), rezultate care sunt **în concordanță** cu cele obținute în alte studii publicate.
3. Testarea prin **tehnica de seroneutralizare**, menită a exclude rezultatele fals-pozitive ca urmare a reacțiilor serologice încrucișate, a relevat o seroprevalență de 11,8% raportat la probele analizate (6/51). Acest rezultat denotă faptul că **VWN este circulant**, atât în populațiile de păsări rezidente cât și în cele migratoare.
4. Detecția anticorpilor specifici la **păsările sălbatice tinere** rezidente indică existența și persistența infecției cu VWN (și, posibil, cu alte flavivirusuri din același serocomplex) în sezonul de transmitere 2016.
5. Referitor la **riscul de infecție pentru oameni**, investigarea păsărilor sălbatice poate fi considerată utilă pentru anticiparea fenomenelor de sănătate ulterioare ce pot fi induse de aceste virusuri.
6. Pe plan local, amplificarea virusului este susținută de păsările rezidente, în timp ce păsările migratoare sunt implicate în **vehicularea și dispersia virusului** pe distanțe considerabile.

6.3 Anchetă sero-epidemiologică privind infecția cu flavivirusuri la câini din zona de est a României

6.3 Seroepidemiological investigations regarding flavivirus infections in dogs in the Eastern Romania

Infecția cu VWN la câini a fost menționată prima dată ca urmare a izolării virusului de la un câine cu encefalită din Africa, în anul 1977 (Buckweitz ș.a., 2003), acest lucru putând reprezenta un real pericol pentru oameni. Ulterior, ca urmare a densității populaționale crescute și a creșterii în proximitatea oamenilor (Austgen ș.a., 2004), infecția cu VWN a prezentat interes prin prisma rolului pe care câinii îl pot avea în ciclul de transmitere a virusului. Astfel, studiile experimentale conduse pe această populație țintă, prin inoculări directe ale virusului, subcutanat și intravenos (Blackburn, 1989) sau prin expunerea la țânțari infectați (*Aedes albopictus*), au demonstrat că rolul acestora în epidemiologia virusului este insignifiant sau puțin probabil. Totodată, deși aceștia nu participă activ la transmitere ca și gazde amplificatoare, sunt depistați ca urmare a testărilor serologice: 24% India, 5% New York (Lichtensteiger ș.a., 2003). La această specie, exprimările clinice sunt paupere, viremia se instalează la patru zile post-infecție, nivelul viremic este redus și fluctuant (Austgen ș.a., 2004) iar durata persistenței anticorpilor este necunoscută (Buckweitz ș.a., 2003).

În infecția naturală, fenomenul de sănătate este mediat-imunologic, ceea ce crește susceptibilitatea la infecția cu VWN (Lichtensteiger ș.a., 2003). Manifestările clinice au fost raportate la câinii de exterior crescuți în condiții asemănătoare celor din padocuri (Buckweitz ș.a., 2003) iar semnele frecvent descrise sunt reprezentate de miocardită, encefalită și poliartrită (Cannon ș.a., 2006).

Scopul studiului nostru l-a reprezentat stabilirea prevalenței anticorpilor anti-VWN și a altor virusuri înrudite antigenic în populația de câini din zona de est a țării. De asemenea, s-a urmărit estimarea gradului de expansiune silențioasă a virusului cât și aprecierea rolului de sentinelă a acestei specii, pe fondul disponibilității generoase a populației țintă și a coabitării sau locuirii în arealul locuințelor oamenilor, câinii atrăgând țânțarii, mai expuși riscului fiind cei care locuiesc în zonele de oprire pentru păsările migratoare (Davoust ș.a., 2008). Obiectivele studiului au fost focalizate asupra populației de câini din zonele urbane și periurbane, pentru simularea riscului de transmitere din aceste areale, dată fiind plasticitatea circulației virale în diferite ecosisteme, respectiv în zone uscate, urbane sau în ecosisteme forestiere cu zone inundabile (Chevalier ș.a., 2020).

6.3.1 Material și metode

6.3.1 Materials and methods

Pentru realizarea obiectivului, s-au recoltat 363 de probe de la câini din padocuri, gospodării private și de la câini consultați în clinici (tabelul 6.12), cu diferite afecțiuni sau

clinic sănătoși (fig. 6.3). Alegerea indivizilor nu a ținut cont de vârstă, sex sau existența altor comorbidități. Recoltarea probelor s-a realizat de către personalul medical autorizat, cu acordul aparținătorilor. Toate probele au fost obținute prin puncția venei jugulare, utilizând materiale sterile iar exprimarea serului s-a realizat prin centrifugare timp de 10 minute la 2000 rpm, ulterior fiind depozitate la -20°C .

Tabelul 6.12/ Table 6.12

Zonele de recoltare și proveniența probelor de sânge de la câini
Collection points for dogs blood samples

Județ	Nr.probe testate	Proveniența probelor
Suceava	12	Padoc
Iași	170	Clinici FMV
	39	Padoc 1
	21	Padoc 2
	7	Gospodăriile populației
Total probe Iași	237	
Bacau	24	Gospodării private
Braila	16	Gospodării private
Galati	53	Clinică veterinară
Tulcea	21	Padoc
Total probe testate	363	

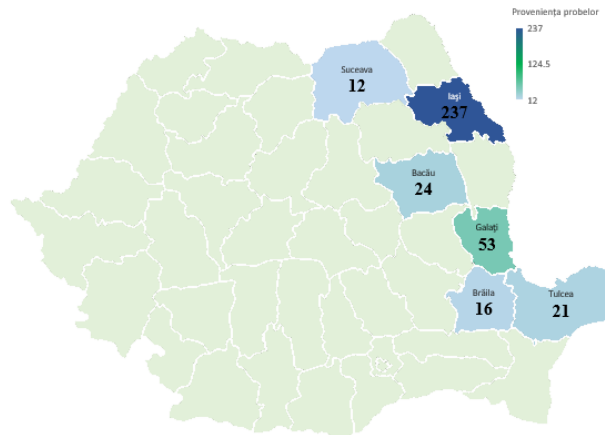


Figura 6.3 Zonele de recoltare a probelor de sânge de la câini (original)

Figure 6.3 Collection points for dogs blood samples (original)

Detecția anticorpilor anti-VWN din probele de ser recoltate 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). *Kit-urile* pot fi utilizate pentru detecția anticorpilor anti-proteina E, induși ca urmare a infecției naturale sau prin vaccinare la mai multe specii. Ambele *kit-uri* ELISA utilizează plăci pre-căptușite cu un antigen recombinant VWN, bazându-se pe competiția dintre anticorpii prezenți în probele de testat și un anticorp monoclonal anti-E conjugat cu peroxidaza din hrean (HRP). Aceste

kit-uri ELISA de competiție pot detecta virtual orice izotip de imunoglobulină dar uzual sunt folosite pentru detecția IgG, fiind încadrate, în consecință, ca instrumente pentru detecția acestora (Beck ș.a., 2017).

În funcție de conjugatul VWN utilizat în *kit* (anti-domeniu III al proteinei E în *kit*-ul Ingezim WNV Compaq sau anticorpi anti-E direcționați împotriva domeniilor mai puțin specifice, din ID Screen WNV Competition), au fost observate reacții încrucișate cu alte flavivirusuri.

Astfel, într-o primă etapă, 179 probe au fost testate serologic prin tehnica imunoenzimatică ELISA, utilizând *kit*-ul comercial ID-Screen West Nile Competition (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franța) și urmărind protocolul de lucru derivat din instrucțiunile furnizorului. Etapele de lucru s-au desfășurat conform tehnicii descrise la punctul 6.1.1.2.

Probele au provenit de la câini din padocuri, gospodării și clinici veterinare, detaliile legate de proveniența probelor fiind redată în tabelul 6.13.

Tabel 6.13/ Table 6.13

Numărul și proveniența probelor incluse în prima etapă a studiului
The number and origin of the tested samples

Județ	Nr. probe	Proveniența	Total probe/Județ
Suceava	12	Padoc	12
Iași	4	Padoc	-
	65	Clinica FMV	69
Bacău	24	Gospodării private	24
Galați	53	Gospodării private	53
Tulcea	21	Padoc	21
Total probe	179		

În cea de-a doua etapă (tabelul 6.14), au fost testate 184 probe recoltate în timpul consultațiilor oferite în clinicile FMV Iași, din două padocuri din Iași și de la câini din gospodării private din Iași și Făurei (Brăila).

Probele incluse în cea de-a doua etapă au fost testate utilizând *kit*-ul comercial INGEZIM West Nile COMPAC (Ingenasa, Madrid, Spania), ce folosește un anticorp monoclonal (MAb) specific domeniului III al proteinei E a VWN.

La acest *kit*, plăcile sunt captușite cu un antigen viral inactivat iar pentru reacție sunt necesari 10 μ l de probă. Adăugarea MAb specific proteinei E din conjugat determină apariția unei reacții colorimetrice, în cazul în care acesta este atașat de proteină (animal indemn). În cazul în care animalul este infectat, epitopul este blocat de anticorpii specifici existenți în eșantion iar adăugarea substratului nu va determina virarea culorii produsului de reacție.

Tabel 6.14 /Table 6.14

Numărul și proveniența probelor incluse în a doua etapă a studiului
Number and the source of the samples tested in the second part of the study

Județ	Nr. probe	Proveniența probe	Total probe/Județ
Iași	105	Clinica FMV	105
	39	Padoc 1	56
	17	Padoc 2	
	7	Gospodării private	7
Brăila	16	Gospodării private	16
Total probe	184		

Tehnica de lucru s-a desfășurat conform instrucțiunilor furnizate de producător. Astfel, încărcarea probelor în placă a fost precedată de diluția acestora 1/5 (40μl tampon de diluție și 10 μl probă), cu un volum final de 50μl, după care au fost adăugați martorii pozitivi și negativi, în duplicat și în aceeași cantitate. După o agitare ușoară a plăcii, aceasta a fost sigilată și incubată peste noapte (16-24 ore), la temperatura camerei (20-25°C). După perioada necesară legării anticorpilor de antigen, placa a fost descărcată și apoi s-a realizat o etapă de spălare triplă, cu câte 300μl/godeu, folosindu-se o soluție de spălare 1/24 (40 ml soluție de spălare concentrată cu 960 ml apă distilată) preparată în prealabil iar ulterior s-au adăugat 50μl conjugat (MAb conjugat cu peroxidază) *ready-to-use*, în fiecare godeu. După a doua perioadă de incubare de 60 minute la 20-25 °C și a doua etapă de spălare, pentru eliminarea excesului de conjugat și a materialului nefixat s-au adăugat 50μl substrat, pentru a releva complexul antigen-conjugat. Adăugarea substratului TMB (tetrametilbenzidină) este urmată de o perioadă de incubare de 15 minute, la întuneric, ce va determina virarea produsului de reacție în albastru, în cazul în care proba este negativă. Reacția enzimatică este oprită prin adăugarea aceluiași volum de soluție stop (acid sulfuric), ce va produce schimbarea culorii produsului de reacție, din albastru în galben. În decurs de cinci minute după adăugarea soluției stop, s-a realizat măsurarea valorilor absorbantei, la o lungime de undă de 450 nm.

Pentru validarea rezultatelor, densitatea optică (DO) pentru martorii negativi trebuie să fie mai mare decât 0.8, iar pentru martorii pozitivi DO trebuie să fie mai mică decât 0.35.

Interpretarea rezultatelor s-a realizat prin calcularea procentului de inhibiție (IP) pentru fiecare probă, conform formulei:

$$IP_{\text{probă}} = 100 - \left[\left(\frac{DO_{\text{probă}}}{DO_{\text{martor negativ}}} \right) * 100 \right]$$

Probele au fost considerate pozitive dacă $IP \geq 40\%$. Dacă $IP \leq 30\%$, proba a fost considerată negativă iar probele cu IP cuprins între 30 și 40 % au fost considerate dubioase.

Eșantioanele rezultate pozitive în urma testării cu *kit*-ul Ingezim au fost retestate utilizând *kit*-ul ID VET, pentru verificarea sensibilității și specificității celor două teste, în

etape, timpi și condiții diferite. Tehnica de lucru s-a desfășurat respectând succesiunea etapelor de la punctul 6.1.1.2.

În ceea ce privește originea probelor analizate, acestea au provenit majoritar de la câini prezentați pentru diverse consultații sau clinic sănătoși (223/363) din gospodării și din padocuri (93/363).

În funcție de disponibilitatea datelor individuale, pentru 271 de câini s-au luat în considerare următoarele variabile: sexul animalului, vârsta, talia și gradul de expunere. Datele referitoare la distribuția pe sexe sunt redată în tabelul 6.15.

Tabel 6.15/Table 6.15

Repartiția pe sexe a câinilor incluși în studiu
Distribution per sexes of tested samples

Sex	Mascul	Femel	Total
Nr. probe	142	129	271
Pondere (%)	52,39	47,6	100

În ceea ce privește vârsta animalelor, acestea au fost împărțite în șase categorii de vârstă, conform clasificării lui Studzinski CM ș.a., 2006: junior (< un an), tineret (între un an și 2,99 ani), adult (între trei și 5,99 ani), câini de vârstă mijlocie (șase și 7,99 ani), bătrâni (opt și 9,99) și categoria de seniori (>10 ani) (Studzinski ș.a., 2006), distribuția pe categorii de vârstă fiind redată în tabelul 6.16.

Tabel 6.16/Table 6.16

Repartiția pe categorii de vârstă a câinilor incluși în studiu
Distribution per age of tested samples

Categorie de vârstă	Junior	Tineret	Adult	Vârstă mijlocie	Bătrân	Senior	Total
Nr. probe	23	54	86	40	27	41	271
Pondere (%)	8,48	19,92	31,73	14,76	9,96	15,12	100

În funcție de talie, animalele au fost repartizate în trei categorii, respectiv: talie mică, medie și mare (tabelul 6.17), cele mai multe probe provenind de câini de talie medie 151/271 (55,71%). Ponderea mai crescută pentru această talie este pusă pe seama numărului mare de câini de rasă mixtă, din padocuri și din gospodăriile private, a căror greutate la maturitate depășește 10 kg.

Tabel 6.17/Table 6.17

Distribuția pe categorii de talie a probelor testate
Distribution per breeding size of tested samples

Talia animalelor	Mică	Medie	Mare	Total
Nr. probe	100	151	20	271
Pondere (%)	36,9	55,71	7,38	100

Ultima variabilă luată în considerare este reprezentată de gradul de expunere, respectiv, animale de exterior sau de interior (tabelul 6.18). Cele mai multe animale incluse

în studiu au fost animale cu un grad ridicat de expunere, respectiv animale de exterior sau provenite din gospodării private și padocuri (196/271).

Tabel 6.18/Table 6.18

Distribuția probelor testate în funcție de gradul de expunere

Distribution of tested samples by exposure

Expunere	Exterior	Interior	Total
Nr. probe	196	75	271
Pondere (%)	72,32	27,67	100

Din totalul animalelor de exterior analizate ($n = 196$), 71 de câini au provenit de la două padocuri din Iași (padoc 1 = 39, padoc 2 = 21) și unul din Tulcea ($n = 11$).

Pentru o analiză retrospectivă a probelor incluse într-un alt studiu, 92 de seruri, obținute în cadrul unei monitorizări separate de la animale din padocuri ori deținute de persoane private, au fost testate pentru detecția anticorpilor anti-flavivirusuri. Pentru aceste probe nu există date privind sexul și vârsta (tabelul 6.19), fiind considerate ca provenind de la animale de talie medie, cu un grad ridicat de expunere și cu vârsta cuprinsă între șase luni și 14 ani (Răileanu, 2016).

Tabel 6.19/Table 6.19

Probe suplimentare analizate în cadrul studiului

Additional samples tested during the study

Județ	Proveniență	Nr.probe
Brăila (Făurei)	Gospodării private	16
Bacău	Gospodării private	24
Iași	Padoc Tomești	30
Tulcea	Padoc	10
Suceava	Padoc	12
Total probe	92	

Datorită gradului ridicat de înrudire antigenică între virusurile incluse în familia *Flaviviridae* și pentru a exclude rezultate fals pozitive, probele rezultate pozitive prin tehnica de detecție a IgG au fost retestate printr-o tehnică de discriminare, mai specifică, respectiv tehnica de seroneutralizare, conform punctului 6.1.1.2.

Titrul anticorpilor neutralizanți împotriva virusurilor WN și Usutu a fost determinat prin tehnica de virus micro-neutralizare (MNT) pe celule Vero, utilizând pentru VWN tulpina IS-98-ST1 iar pentru VUSU tulpina France 2018. Pe scurt, probele de ser diluate și inactivate (30 de min la 56 °C) au fost încărcate în plăci de 96 de godeuri și supuse diluțiilor seriate de la 1/5 la 1/160. Ulterior, 50 μ l suspensie virală 100 TCID₅₀ (100 „tissue culture infective dose”) au fost adăugați peste fiecare probă diluată, urmată de faza de absorbție, de 90 min, la 37°C. După incubare, în toate godeurile s-a adăugat suspensie celulară cu o concentrație de 2×10^5 celule/ml pentru VWN și VUSU, în timp ce pentru

TBEV s-a folosit o concentrație de 4×10^4 celule/ml, urmând o nouă incubare de 5 zile iar începând cu ziua 3 plăcile au fost verificate zilnic pentru apariția ECP.

6.3.2 Rezultate și discuții

6.3.2 Results and discussion

6.3.2.1 Rezultatele obținute în urma testării prin tehnica imunoenzimatică ELISA

Compararea kit-urilor de detecție a anticorpilor specifici. Ca urmare a testării din cursul primei etape a celor 179 de probe provenite de la câini din padocuri, clinici veterinare și gospodăriile populației (tabelul 6.13) utilizând *kit-ul* comercial ID VET, anticorpii anti-VWN au fost detectați în 79 de probe [(44,1%) 95% CI 36,86-51,41].

În cea de-a doua etapă, în urma testării a 184 de probe din padocuri, gospodării și clinica FMV (tabelul 6.14), utilizând *kit-ul* Ingezim WNV Compaq, 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 celor 184 de probe 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 inițial, în funcție de cantitatea de ser disponibilă, au fost reanalizate doar 86 de probe (tabelul 6.20). Prin comparație, deși unii autori au descris sensibilitatea mai crescută a *kit-ului* Ingezim WNV Compaq și capacitatea de a detecta niveluri reduse ale IgG (Beck ș.a., 2017), în cadrul studiului nostru s-a obținut un grad de fidelitate și o pozitivitate de 100% a probelor, între cele două *kit-uri* utilizate pentru detecția IgG anti-VWN.

Rezultate ELISA, distribuția pe zone, variabile și circumstanțele de expunere. În urma testării probelor incluse în prima etapă ($n = 179$) și utilizând *kit-ul* ID Screen WNV Competition, anticorpi anti-VWN și contra altor flavivirusuri înrudite antigenic au fost detectați în 79 de probe, cu o seroprevalență de 44,1 % (C.I 95% 36,86 – 51,41). Referitor la repartitia pe județe, prevalența cea mai crescută a fost remarcată în județele Galați (47,2%) și Iași (36,2%).

În cea de-a doua etapă, prin utilizarea *kit-ului* Ingezim WNV Compaq pentru probele cu o proveniență majoritară din județul Iași, s-a constatat o seroprevalență de 51 % [43,86 – 58,31] (94/184).

Pentru a reduce erorile date de valorile intrinseci ale celor două teste de depistare folosite și pentru a avea importanță statistică, în vederea stabilirii seroprevalenței cumulate, s-au luat în considerare doar rezultatele obținute ca urmare a testării probelor 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).

Tabel 6.20/Table 6.20

Testarea fidelității rezultatelor obținute în urma testării prin metoda imunoenzimatică ELISA, utilizând două *kit-uri* de detecție

Fidelity of the results obtained after testing by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, using two different detection kits

Județ/Proveniență Kit comercial	Iași				Brăila	Total
	Clinici FMV	Padoc 1	Padoc 2	Gospodării private	Gospodării private	
Testate Ingezim WNV Compaq	105	39	17	7	16	184
Pozitive Ingezim WNV Compaq	46	20	10	4	14	94
Testate ID Screen WNV Competition	43	15	10	4	14	86
Pozitive ID Screen WNV Competition	43	15	10	4	14	86

Referitor la distribuția geografică a probelor pozitive prin ELISA, anticorpilor specifici au fost detectați în toate județele incluse în studiu, vârful prevalenței fiind observat în Brăila (87,5%), unde, din 16 probe testate, 14 au fost pozitive prin tehnica ELISA (fig. 6.4.).

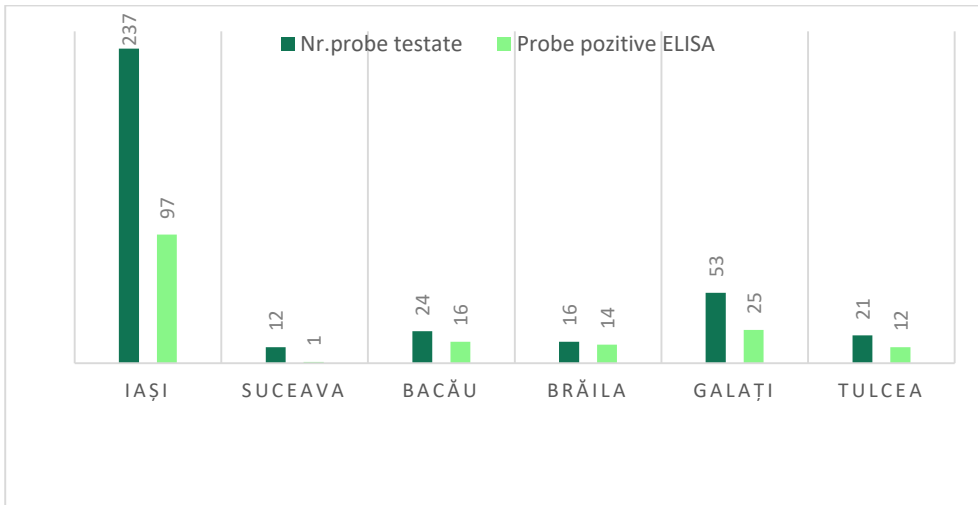


Figura 6.4 Distribuția probelor pozitive în funcție de originea geografică
Figure 6.4 Seroprevalence distribution of samples based on their collection site

Deși cele mai multe probe au provenit din județul Iași ($n = 237$), valoarea procentuală a seroprevalenței (40,9%) a fost inferioară celor din Brăila (87,5%), Galați (47,2%), Tulcea (57,1%) sau Bacău (66,6%).

În funcție de disponibilitatea datelor individuale, rezultatele pozitive au fost distribuite pe categorii cu potențial de risc. Astfel, raportat la distribuția probelor în funcție

de variabilele considerate în cadrul studiului, exceptând probele despre care nu există date individuale ($n = 46$), cele mai multe probe seropozitive au provenit de la masculi, de la adulții de talie medie și cu un grad ridicat de expunere, respectiv de la animale din gospodării și padocuri (tabelul 6.21).

Tabel 6.21/Table 6.21

Seropozitivitatea animalelor pe baza caracteristicilor individuale
Animals seropositivity based on their individual characteristics

Gen	Nr.probe pozitive	Categorie de vârstă	Nr.probe pozitive	Talie	Nr.probe pozitive	Expunere	Nr.probe pozitive
Masculin	64	Junior	3	Mică	31	Exterior	94
Feminin	55	Tineret	20	Medie	76	Interior	25
		Adult	39	Mare	12		
		Vârstă mijlocie	19				
		Bătrâni	12				
		Senior	26				
Total			119				

Pentru una din cele mai importante variabile, respectiv gradul de expunere, animalele seropozitive ($n = 94$) au provenit din două padocuri din Iași, un padoc din Tulcea și din gospodăriile populației.

În ceea ce privește probele adăugate în vederea realizării studiului retrospectiv ($n = 92$) considerate ca provenind de la animale de talie medie și cu grad ridicat de expunere, anticorpii specifici pentru flavivirusuri au fost detectați în 46 de probe [50%; (95%CI: 39,78 – 60,22)]. În cazul acestora, seroprevalența cea mai crescută a fost obținută la câinii din gospodăriile populației din Bacău (16/92, 17,39%) și Brăila (14/92, 15,21%), în timp ce la câinii din padocurile din Iași, Tulcea și Suceava s-au descris valori ale seroprevalenței de 9,78% (9/92), 6,52% (6/92) și 1 % (1/92).

6.3.2.2 Rezultate obținute în urma testării prin tehnica de micro-virus neutralizare (MNT)

Probele seropozitive rezultate în urma testării prin tehnica imunoenzimatică (ELISA) au fost testate din nou prin tehnica de micro-virusneutralizare (MNT), pentru detecția anticorpilor neutralizanți specifici pentru virusurile West Nile, Usutu și virusul encefalitei de căpușă.

Astfel, în scopul confirmării seropozitivității și dependent de cantitatea de probă disponibilă, au fost testate prin tehnica de seroneutralizare 161 probe din cele 165 pozitive în urma testării cu *kit*-ul ID Screen WNV Competition.

Anticorpii specifici neutralizanți împotriva VWN au fost detectați în 131 probe din 363 recoltate pentru studiul nostru [36,1%; 95%CI: 31,15 – 41,03 ($P = 0,08$), *Pearson's*

correlation = 0,99], distribuția seroprevalenței în funcție de variabile pentru probele cu date individuale disponibile ($n = 98$) fiind redată în tabelul 6.22.

Pentru probele pozitive dar fără detalii legate de sex și categorie de vârstă, valorile seroprevalenței au fost cuprinse între 3,9% (14/363 95% CI: 1,88 – 5,84) la câini din gospodăria din Brăila și 0,3% (1/363; 95% CI: -0,26 – 0,81) la cei din Suceava.

Referitor la seropozitivitatea în funcție de variabilele analizate în cadrul studiului nostru, nu au existat diferențe semnificative în ceea ce privește sexul animalelor, păstrându-se o proporție similară între rezultatele obținute la tehnicile aplicate pentru categoriile de sex. Astfel, din totalul de 142 de probe provenite de la masculi, au fost pozitive prin ELISA 64 de probe, confirmându-se prin MNT 51 de probe, cu o seroprevalență de 35,9%. La femele, din 129 de probe testate, 55 au fost pozitive prin tehnica inițială și 47 (36,4%) confirmate prin MNT.

Seroprevalența pentru variabila clasa de vârstă, considerată ca un potențial factor de risc, a prezentat alternanțe considerabile pentru categoriile de vârstă. Seropozitivitatea nu a fost confirmată la categoria de vârstă „junior” (0/23) iar cele mai multe probe pozitive au provenit de la seniori (24/41; 58,5%), animale de vârstă mijlocie (16/40; 40%) și de la adulte (34/86; 39,5%).

Tabel 6.22/Table 6.22

Distribuția probelor în funcție de variabilele individuale
Samples distribution based on individual variables

Variabile		Pozitive MNT WNV	Pozitive MNT WNV + USUV	Pozitive MNT USUV	Pozitive MNT TBEV
Sex	Masculin	51	8		
	Feminin	47	5	1	
	Total	98	13	1	0
Categorie de vârstă	Junior	0			
	Tineret	15	2		
	Adult	34	6	1	
	Vârstă mijlocie	16	1		
	Bătrâni	9	1		
	Senior	24	3		
	Total	98	13	1	0
Talie	Mică	19	4		
	Medie	67	7	1	
	Mare	12	2		
	Total	98	26	1	0
Expunere	Exterior	79	10	1	
	Interior	19	3		
	Total	98	13	1	0
	33 NE*		4 NE*		
NE*	Nu sunt detalii disponibile, referitoare la gen și talie				

Raportat la numărul de probe recoltate pentru fiecare categorie de talie, cea mai crescută valoare a prevalenței anticorpilor neutralizanți specifici flavivirusurilor a fost observată la câinii de talie mare, 60 % (12/20), în timp ce la câinii de talie medie seroprevalența a fost de 44,34% (67/151) iar la câinii de talie mică de 19% (19/100).

Pentru animalele cu un grad ridicat de expunere din gospodării și padocuri, valoarea seroprevalenței [60,3% = 79/131 (95% CI: 51,93 - 68,68)] este semnificativ mai mare comparativ cu cea a câinilor de interior - 14,3% (95% CI: 8,47 - 20,53).

Seroprevalenței obținute în probele recoltate pentru studiul nostru de la câinii de exterior (60,3%), se adaugă valoarea anticorpilor neutralizanți specifici detectați la câini din gospodării și padocuri, incluși dintr-o altă monitorizare și pentru care s-a făcut testarea retrospectiv - 25% (95%CI: 17,76 - 32,62).

Testarea serologică prin metoda discriminatorie de detecție a anticorpilor neutralizanți a relevat prezența anticorpilor specifici pentru VWN la 79,4% din probele ELISA-pozitive (131/165), cu valori ale titrului între 10 și 320 și la o singură probă au fost detectați anticorpi neutralizanți anti-VUSU (titrul anticorpilor = 160).

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 (tabelul 6.23). La o probă, provenită de la un câine în vârstă de nouă ani la momentul recoltării probei de sânge, titrul anticorpilor neutralizanți a avut aceeași valoare (160) pentru ambele virusuri, sugerându-se atât co-circulația celor două flavivirusuri strâns înrudite cât și co-infecția cu acestea.

Tabel 6.23/Table 6.23

Valorile titrurilor anticorpilor neutralizanți împotriva virusurilor West Nile și Usutu la câini din județe din estul României

Neutralizing antibodies titre against WNV and VUSU in dogs from Eastern side of Romania

Flavivirus +	MNT +	Titul anticorpilor neutralizanți specifici anti-flavivirusuri						
		10	20	40	80	160	320	Total
VWN+	131	15	37	33	19	18	9	131
VWN + VUSU	17	5	6	4	1	1		17
VUSU+	1					1		1

În ceea ce privește distribuția seropozitivității, au existat diferențe semnificative între județele incluse în studiu (fig. 6.5.), cele mai multe probe pozitive fiind confirmate în Iași - 22,9% (83/363; 95% CI: 18,54 - 27,19) și în Galați - 4,4 % (16/363; 95%CI: 2,3 - 6,52).

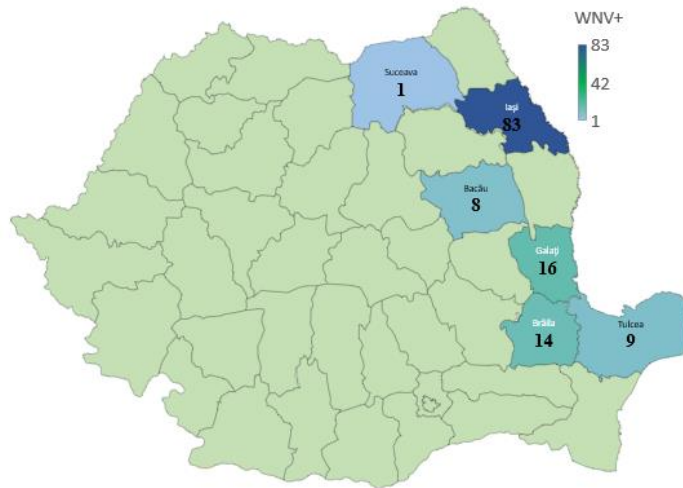


Figura 6.5 Distribuția probelor pozitive obținute prin MNT la câinii incluși în studiu (original)

Figure 6.5 Distribution of positive samples MNT in dogs (original)

Studiul de față a urmărit continuarea investigațiilor întreprinse în anul 2018, privitor la stabilirea prevalenței anticorpilor anti-VWN și demonstrarea rolului de santinelă al câinilor. Totodată, cercetările au vizat explorarea principalilor factori de risc implicați în infecția cu flavivirusuri transmise de țânțari la această specie (Crivei ș.a., 2018).

Tabel 6.24/Tabel 6.24

Seroprevalența (%) și intervalul de încredință (95%) pe județe, obținute prin tehnica MNT la probele de câini

MNT seroprevalence (%) distribution in counties and confidence interval (95%) in dogs serum samples

Județ	Nr. probe testate	WNV+	Seroprevalența/Județ	95%CI
Suceava	12	1	8,3	[-7,3 -23,97]
Iași	237	83	35	[28,95-41,09]
Bacău	24	8	33,3	[14,47-52,19]
Brăila	16	14	87,5	[71,29-103,71]
Galați	53	16	30,2	[17,83-42,55]
Tulcea	21	9	42,9	[21,69-64,02]
Total probe testate	363	131	36,1	[31,15-41,03]

Acțiunile de supraveghere realizate pe această specie la nivel mondial au detectat virusurile West Nile și Usutu (tabelul 6.25), în SUA seroconversia fiind detectată la câinii mai mici de un an, cu șase săptămâni înainte de apariția primului caz la oameni (Kile ș.a., 2005).

Seroprevalența constatată de noi, în urma testării a 363 de câini din șase județe din partea de est a României (36,1%), este în concordanță cu cea raportată în Turcia, în anul 2006 (37,7%) dar inferioară valorilor obținute în Italia (55,5 %, 2011; 40,43%, 2018),

Maroc (62%) sau Statele Unite ale Americii (55,9%, 2011; 56,5%, 2004). În România, anticorpi specifici împotriva VWN au fost detectați în anul 2018, cu o prevalență de 42,1% în probele testate (Crivei ș.a., 2018) și în 2019, cu o seroprevalență de 6,3%, în cadrul unei acțiuni de xenomonitorizare care a avut ca scop utilizarea țânțarilor ca și „seringi biologice” pentru a obține sânge de la mamifere (Tomazatos ș.a., 2019).

Deși există diferențe ale seroprevalenței între zonele luate în studiu, acestea pot fi puse pe seama limitărilor determinate de prelevarea probelor, seroprevalența redusă din Suceava (8,3%; 1/12) putând fi din cauza numărul redus de probe analizate (n = 12). Totuși, valoarea seroprevalenței poate fi justificată și prin caracteristicile geo-climatice ale Sucevei, unde clima este răcoroasă iar ecosistemul nu este favorabil circulației virale. De asemenea, rezultatul monitorizării este pozitiv corelat cu evoluția infecției cu VWN la oameni, în județul Suceava primele cazuri fiind raportate în 2018 (n = 5) (ECDC, 2018).

Tabel 6.25/Table 6.25

Seroprevalența constatată la câini, în studii efectuate la nivel mondial
Dogs seroprevalence obtained in worldwide studies

Țară	Nr. probe testate	% VWN	% VUSU	Referință
Canada	143	28		Gaunt ș.a., 2015
Ciad	55	30,9		Davoust ș.a., 2014
China	367	4,6		Lan ș.a., 2011
Republica Democrată Congo	24	12,5		Davoust ș.a., 2014
Djibouti	47	12,8		Davoust ș.a., 2014
Franța	71	8,4		Maquart ș.a., 2017
Franța	104	6,7		Davoust ș.a., 2014
Italia	36	55,5		Busani ș.a., 2011
Coasta de Fildeș	137	2,2		Davoust ș.a., 2014
Maroc	231	62	80	Durand ș.a., 2016
Puerto Rico	269	8,5		Phoutrides ș.a., 2011
Senegal	141	4,9		Davoust ș.a., 2014
Spania	810	1,3-1,6	0,3	Garcia-Bocanegra ș.a., 2018
Statele Unite ale Americii	442	26		Kile ș.a., 2005
Statele Unite ale Americii	189	5,3		Komar, Panella, and Boyce ș.a., 2001
Statele Unite ale Americii	414	55,9		Levy ș.a., 2011
Statele Unite ale Americii	154	56,5		Lillibridge ș.a., 2004
Turcia	114	37,7		Ozkul ș.a., 2006
MISSOURI	169	2,36		Buckweitz S. ș.a., 2003
Quebec, Canada	1442	3,1		Rocheleau J. P. ș.a., 2017
Italia	183	40,43	13,11	Montagnaro S ș.a., 2018

Valori semnificativ superioare ale prevalenței anticorpilor specifici au fost obținute la categoriile de câini cu un grad ridicat de expunere, respectiv la cei din padocuri și gospodării (60,3%, 79/196; 25%, 33/92), comparativ cu câinii de companie (14,3%, 19/75).

Diferența notabilă dintre cele două categorii de animale poate fi atribuită mediului în care câinii sunt crescuți, studii desfășurate anterior demonstrând faptul că animalele care petrec un timp considerabil în exterior și sunt adăpostite în condiții asemănătoare celor din padocuri sunt predispuse infecțiilor cu flavivirusuri (Buckweitz ș.a., 2003; Gaunt ș.a., 2015; Lan ș.a., 2011).

Factorii favorizanți care se regăsesc în mediile de creștere ale animalelor de exterior sunt reprezentați de standardele reduse de igienă, densitatea crescută a animalelor cât și de activitatea intensă a țăntarilor din adăposturile pentru câinii fără stăpân (Ozkul ș.a., 2006).

Seropozitivitatea din cadrul studiului nostru este susținută și de rezultatele obținute ca urmare a analizei femelelor din genul *Cx.pipiens*, care au arătat că acești vectori s-au hrănit preponderent de la câini (Muñoz ș.a., 2011).

Deoarece în toate studiile desfășurate pe câini rata seropozitivității la animalele de exterior este superioară celei de la animalele crescute în interior, gradul de expunere poate fi considerat un factor de risc în infecția cu flavivirusuri.

Prin tehnica de MNT, au fost remarcate co-infecții la 17 câini, detectați seropozitivi atât pentru virusul West Nile cât și pentru Usutu. Cu un titru al anticorpilor specifici neutralizanți pentru primul virus superior celui de-al doilea, la 16 animale probele au fost considerate pozitive doar pentru VWN.

Totuși, circulația simultană a celor două virusuri a fost demonstrată în cadrul studiului printr-o probă pentru care titrul anticorpilor neutralizanți a fost egal (160/160). Lipsa diferenței dintre nivelurile anticorpilor face dificilă excluderea infecției duble, datorită prezenței sero-receptorilor pentru ambele virusuri, proba fiind clasificată ca VWN/VUSU. Proba a fost recoltată în luna Septembrie 2017, în Galați și a provenit de la un mascul Samoyed clinic sănătos, în vârstă de nouă ani.

Pentru singura probă pozitivă doar pentru virusul Usutu, conform protocolului, anticorpii specifici au fost atribuiți acestui flavivirus, cu un titru al anticorpilor neutralizanți de patru ori mai mare decât cel pentru VWN (10/160). Proba a fost recoltată pe 25.03.2019, într-un padoc din județul Iași și a provenit de la o femelă în vârstă de patru ani, de culoare negru, rasă mixtă și talie medie.

Aceasta este prima raportare a infecției cu virusul Usutu la animale în estul României, până în prezent infecția cu virusul Usutu nefiind semnalată la păsări sau la alte mamifere.

Referitor la infecția cu virusul encefalitei transmise de căpușă, în probele testate în cadrul studiului nostru, nu s-au putut detecta anticorpii specifici infecției, neputându-se confirma circulația virusului în populațiile de câini luate în studiu.

6.3.3 Concluzii parțiale

6.3.3 Partial conclusion

1. În cadrul cercetărilor noastre s-au analizat 363 de probe de ser recoltate de la câini din șase județe din zona de est a României: Iași, Suceava, Galați, Bacău, Brăila și Tulcea. Probele au fost analizate etapizat, utilizând două *kit-uri* comerciale ELISA pentru detecția anticorpilor specifici VWN, obținându-se o **seroprevalență cumulată de 44,1%** (165/363), valoare comparabilă cu rezultatele altor studii publicate.

2. Analizând rezultatele obținute de noi în urma utilizării comparative a două *kit-uri* comerciale de competiție, *kit-ul ID Screen WNV Competition* și *kit-ul Ingezim WNV Compaq*, s-a constatat o **corelare de 100%** pentru probele testate în condiții și timpi diferiți, ceea ce denotă acuratețea rezultatelor obținute și **valori intrinseci de diagnostic identice** ale celor două *kit-uri*.

3. Pentru stabilirea potențialilor **factori de risc**, datele individuale ale câinilor au fost sistematizate în cinci categorii de variabile: originea probelor, sex, categorie de vârstă, talie și gradul de expunere. Rezultatele noastre au arătat că cele mai multe probe seropozitive au provenit de la **masculi**, de la adulții de **talie medie** și cu un **grad ridicat de expunere**, respectiv de la animale din **gospodării și padocuri**.

4. Rezultatele studiului nostru, în special valoarea crescută a seropozitivității la **câinii crescuți în exterior** (variabila gradul de expunere), denotă faptul că aceste animale pot fi utilizate ca **santinele** pentru monitorizarea activității flavivirusurilor în zonele urbane și periurbane.

5. Pentru evitarea rezultatelor fals pozitive obținute ca urmare a reacțiilor de încrucișare serologică cu alte flavivirusuri ce ar putea circula în zona de interes, probele pozitive la ELISA au fost testate și prin tehnica de **seroneutralizare** pentru VWN, TBEV și VUSU. Din cele 161 probe testate, anticorpi specifici neutralizanți anti-VWN au fost detectați la 131 de probe, ceea ce semnifică o **circulație virală crescută** în populația de câini din zona de est a României.

6. Studiul de față evidențiază amploarea distribuției infecției cu VWN la câini în estul României. **Profilul serologic la câini** poate reprezenta un parametru demn de luat în considerare în vederea stabilirii riscului de infecție cu VWN pentru oameni din zonele urbane și periurbane.

7. Identificarea unei probe pentru care titrul anticorpilor neutralizanți anti-VWN și anti-VUSU a fost egal (160/160), demonstrează **circulația simultană** a celor două virusuri, chiar dacă lipsa diferenței dintre nivelurile anticorpilor face dificilă excluderea infecției duble, proba fiind clasificată ca **VWN/VUSU**.

8. Singura probă pozitivă doar pentru VUSU, cu un titru al anticorpilor neutralizanți de patru ori mai mare decât cel pentru VWN (10/160), ne îndreptățește să **raportăm prima semnalare** a circulației **virusului Usutu** în populația de câini în zona de est a României.

9. **Câinii** pot fi o alegere relevantă pentru monitorizările serologice în vederea **detecției precoce** a circulației virusurilor West Nile și Usutu.

6.4 Anchetă sero-epidemiologică privind infecția cu arbovirusuri la oameni în zona de est a României

6.4 Seroepidemiological investigations regarding flavivirus infections in humans in the Eastern Romania

6.4.1. Infecția cu virusurile West Nile și Usutu la oameni

6.4.1 Human infection with West Nile and Usutu viruses

Re-emergența virusului West Nile în Europa a fost marcată de epidemia din România din anul 1996. Recurența circulației virale în România ar putea fi explicată prin două fenomene posibile, care nu se pot exclude reciproc, respectiv: reintroducerea periodică a virusului prin intermediul păsărilor migratoare din zonele endemice ale Africii, și propagarea virusului în timpul perioadelor nefavorabile în locații specifice, grație unor mecanisme de persistență. Acestea din urmă pot fi reprezentate de fenomenul de iernare/*overwintering*-ul, transmiterea în descendență la țăntari precum și transmiterea între păsări sau persistența infecției la păsări (Chevalier ș.a., 2011).

După evoluția celor mai notabile episoade de infecție cu VWN din Franța, 1962 și România, 1996 (Sejvar 2003), începând cu anul 2010, infecțiile cu VWN au fost raportate în mod constant în țările din bazinul Mediteranean și în alte țări precum: Bulgaria, Croația, România, Grecia, Italia, Macedonia, Maroc, Portugalia și Spania (Angenvoort ș.a., 2013).

În infecțiile simptomatice cu VWN, producția și persistența pe termen lung a anticorpilor specifici (IgG și uneori IgM) ar putea fi explicată printr-o stimulare inițială puternică a sistemului imun, ce duce la un răspuns umoral semnificativ și stabil de-a lungul timpului. Această persistență a fost explicată și prin alte mecanisme dependente sau independente de antigen (Papa ș.a., 2015). De asemenea, studiile experimentale efectuate pe șoareci au evidențiat faptul că în timpul proceselor inflamatorii de la nivel renal sunt prezente, în principal, celule plasmatică secretoare de IgG, spre deosebire de măduva osoasă hematogenă și splină, la care există o predominanță a celulelor plasmatică secretoare de IgM (Mumtaz ș.a., 2012).

Apariția cazurilor de infecție cu arbovirusuri este dependentă de o serie de factori conectați în mod direct și indirect la cele trei niveluri de difuzare și amplificare virală: vectori, gazde amplificatoare și gazde incidentale (Montgomery & Murray, 2015). Condițiile climatice influențează populațiile de vectori prin corelația pozitivă dintre precipitații, temperatura ambientală și abundența speciilor de țăntari (Kilpatrick ș.a., 2008). Amplificarea virală și infectivitatea țăntarilor se bazează pe prezența gazdelor amplificatoare, responsabile de menținerea virusului în natură (Murray ș.a., 2013), mai ales în sezoanele calde, când interacțiunile dintre păsări și țăntari sunt sporite (Esser ș.a., 2019). În cele din urmă, apariția cazurilor umane este influențată și de factori de risc obiectivi precum și de factori individuali. Privitor la factorii obiectivi, studiile au demonstrat că oamenii care locuiesc în proximitatea locurilor cu apă stagnantă și, implicit, habitate ale

țânțarilor, au fost mai expuși infecției virale. Alți factori de risc, care ar putea crește probabilitatea infectării cu arbovirusuri, sunt reprezentați de timpul de expunere (Han ș.a., 1999) și de adoptarea prevenției nespecifice împotriva țânțarilor, prin utilizarea substanțelor repelente (Montgomery & Murray, 2015).

Tiparul de distribuție al arbovirusurilor în rândul populației este influențat și de variabile socio-economice (Hernandez, Torres, & Joyce, 2019), cum ar fi nivelul de educație, existența comunităților defavorizate cu vulnerabilitate familială (persoane neintegrate social, fără acces la servicii de sănătate sau la educație și cu venituri reduse). Un studiu condus de N.C. Pinheiro Rodrigues și autorii, în 2017, în Brazilia, a relevat faptul că, în zonele defavorizate din centrele urbane, existența condițiilor sanitare precare și lipsa rețelei de apă curentă, asociate colectării deșeurilor, favorizează crearea habitatelor pentru speciile de țânțari antropofile (Rodrigues ș.a., 2018). Persistența acestor predispoziții, dublate de lipsa programelor eficiente de control ale vectorilor, concură la asigurarea unui ciclu de transmitere pentru arbovirusuri (Marchi, Trombetta, & Montomoli, 2018).

În ceea ce privește factorii de risc la nivel individual cât și la nivel de agregate sociale, aceștia includ atât răspunsul imun înăscut cât și cel adaptativ și contribuie la apariția formelor neuroinvasive (Montgomery & Murray, 2015). Studiile clinice desfășurate pe cohorte au inclus, ca factori individuali de risc pentru dezvoltarea formei neuroinvasive, existența altor comorbidități, vârsta înaintată și în unele cazuri sexul masculin (Jean ș.a., 2007; Lindsey, Staples, Lehman, & Fischer, 2012).

Exceptând factorii de risc obiectivi, populaționali (variațiile în structura populației) și individuali, creșterea temperaturii din timpul sezonului de iarnă este predictivă pentru incidența crescută din timpul sezonului de transmitere (Mallya ș.a., 2018).

Comorbiditățile indentificate în mod frecvent au fost reprezentate de boli cardiovasculare, boli renale cronice, infecția cu virusul hepatitei C, imunosupresia (Montgomery & Murray, 2015), consumul abuziv de alcool și procesele tumorale (Garcia, Hasbun, & Murray, 2015).

În cazul suprapunerii infecției cu VWN la pacienți cu diabet, se constată un deficit al statusului imun, ceea ce conduce la creșterea intensității și a duratei viremiei. La pacienții cu hipertensiune arterială, infecția cu VWN produce perturbarea barierei hemato-encefalice și accelerarea pasajului viral către sistemul nervos central (Jean ș.a., 2007). Îmbătrânirea este asociată unui declin al funcției imunitare și a eficienței mecanismelor anti-virale înăscute. Aceste deficiențe imunitare în răspunsul anti-viral contribuie la permeabilizarea barierei hemato-encefalice și la creșterea sensibilității la infecția cu VWN (Montgomery & Murray, 2015).

În ceea ce privește infecția cu VUSU la oameni în Europa, au fost descrise cazuri clinice însoțite și de unele fenomene neurologice (pareză facială, encefalite, meningite) la pacienții imunocompromiși (Cle M ș.a., 2020). În contrapartidă cu exprimările clinice, studii moleculare și serologice, desfășurate pe donatori de sânge în țări precum Olanda (Zaaijer HL ș.a., 2019), Italia (Carletti F ș.a., 2019), Germania (Cadar D ș.a., 2017) și

Austria (Bakonyi T ș.a., 2017), au demonstrat că virusul circulă în mod silențios în rândul pacienților asimptomatici. Rezultatele acestor studii confirmă faptul că prevalența portajului viral nu este pe deplin cunoscută în rândul acestei categorii, aspectul reprezentând o reală preocupare medicală (Cle M ș.a., 2020).

6.4.2 Material și metode

6.4.2 Materials and methods

6.4.2.1 Eșantionajul și condiționarea probelor

În vederea detecției infecției cu VWN și VUSU la oameni, în intervalul aprilie - septembrie 2019, au fost prelevate probe de ser de la pacienți ai Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" din Iași.

Probele incluse în studiu au fost prelevate cu consimțământul pacienților, pe baza Hotărârii numărul 2101/07.02.2019, eliberată ca urmare a cererii formulate de către Centrul Universitar de Cercetări Medicale Veterinare al USAMV Iași, în scopul realizării cercetărilor din cadrul tezei de doctorat.

Ca urmare a colaborării cu unitatea sanitară, în sezonul de transmitere mai - octombrie au fost prelevate 104 probe de ser de la pacienți spitalizați care nu au prezentat simptome corespunzătoare definiției de caz, respectiv orice persoană cu vârsta peste 15 ani care manifestă febră și meningoencefalită sau encefalită (Sribu ș.a., 2011).

Pacienții care și-au dat acordul pentru prelevarea probelor, au completat un chestionar menit să colecteze informații demografice (sex și grupe de vârstă), clinice (existența unor condiții medicale preexistente), precum și locul de proveniență. Datele individuale de interes, integrate în chestionar, au fost extrase din categoriile de risc menționate anterior. În ceea ce privește istoricul medical, chestionarul aplicat persoanelor a cuprins întrebări referitoare la existența unor comorbidități precum: diabet, hipertensiune, afecțiuni cardiovasculare, neurologice sau renale (tabelul 6.26).

Probele recoltate au provenit de la persoane cu vârsta cuprinsă între 16 și 98 ani (media de vârstă = 59 de ani), cele mai multe probe provenind de la pacienți în vârstă de 61, 63, 64, 65, 69 și 70 de ani. Din totalul de 104 probe, dependent de capacitatea *kit*-ului, 88 au fost incluse în studiul pentru detecția anticorpilor specifici anti-VWN și anti-VUSU, fiind excluse astfel serurile provenite de la persoane care nu se încadrau în categoriile de risc: afecțiuni preexistente sau vârsta înaintată (tabelul 6.26).

Tabel 6.26/ Table 6.26

Comorbiditățile pacienților incluși în studiul pentru detecția arbovirusurilor (După Lindsey ș.a., 2012)

Comorbidities of tested patients (After Lindsey et al. 2012)

Condiții medicale pre-existente	Nr. probe recoltate de la pacienți cu una sau mai multe comorbidități asociate	Pacienți testați cu una sau mai multe comorbidități asociate
Hipertensiune	24	23
Diabet	5	5
Boli cardiovasculare	6	5
Imunosupresie	1	1
Boli renale cronice	12	12
Boli hepatice cronice	23	21
Transplant de organe/Transfuzii de sânge	0	0
<i>Alte afecțiuni</i>		
Fenomene digestive	11	10
Respiratorii	7	6
Neurologice	13	13
Clinic sănătos	3	3
Sepsis	7	7
Infecții diverse	12	10

Tabel 6.27/ Table 6.27

Caracterele demografice ale pacienților incluși în studiu

Demographic characters of tested patients

Variabila	Nr. probe recoltate (n = 104)	Nr. probe testate IgG (n = 88)
Grupa de vârstă		
16-58	39	33
60-69	35	31
>70	30	24
Vârsta medie	57,27	60,70
Vârsta mediană	63	63
Repartiție pe sexe		
Bărbați	48	38
Femei	56	50
Sex ratio (Femei : Bărbați)	56 : 48 (1 : 1,16)	50 : 38 (1,31)
Mediul de proveniență		
Urban	30	26
Peri-urban	18	14
Rural	56	48
Total	104	88

Adițional, au fost introduse în studiu și alte 88 de probe (tabelul 6.27), analizate inițial în cadrul unui alt studiu, al cărui obiectiv l-a reprezentat detecția infecției cu virusul hepatitei E. Probele au fost recoltate cu acordul pacienților, în baza Hotărârii eliberate de Comisia de Etică a Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași (Hotărârea numărul 8/18.02.2015). Eșantioanele au fost recoltate de la pacienți cu diferite forme de hepatită, având vârsta cuprinsă între un an și 73 de ani (Porea, 2018).

Tabel 6.28/ Table 6.28

Distribuția numărului de pacienți incluși în studiul retrospectiv, în funcție de vârstă și sex
Number and distribution of retrospectively tested patients, according to age and gender

Grupa de vârstă	Probe testate IgG (n = 88)
<16	4
16-58	51
60-69	4
>70	1
Vârsta medie	36,1
Vârsta mediană	35,5
Sex ratio (Femei : Bărbați) 41 : 19	2,15 : 1

6.4.2.2 Testarea serologică

În scopul identificării anticorpilor specifici anti-VWN în probele de ser provenite de la pacienți umani, au fost utilizate *kit*-urile Anti-West Nile Virus ELISA (IgG) și Anti-West Nile Virus ELISA (IgM) de la Euroimmun (Germania). Testarea serologică s-a realizat respectând instrucțiunile furnizate de producător și particularitățile fiecărui *kit*. Probele au fost testate inițial pentru detecția IgG și ulterior pentru IgM.

Ambele *kit-uri* furnizează o metodă de detecție semicantitativă, *in vitro*, a anticorpilor specifici (Ig G sau IgM) direcționați împotriva virusului West Nile în probele de ser de la oameni. În funcție de anticorpii țargetați, au fost introduși în analiză trei calibratori cu valori ale unităților relative diferite (200 RU/ml, 20 RU/ml și 2 RU/ml), în cazul detecției anticorpilor IgG sau un singur calibrator, pentru detecția anticorpilor IgM.

Protocolul de lucru, pentru ambele determinări, a constat în diluția probelor 1:101, în *buffer* de diluție (10μl ser și 1 ml *buffer* de diluție), încărcarea în placa căptușită cu antigen West Nile a câte 100 μl probă de analizat, martorii pozitivi, negativi și calibratorii corespunzători în duplicat. Consecutiv încărcării în placă, s-au respectat trei incubări: prima de 60 de minute, a doua, de 30 de minute după adăugarea enzimei conjugat (anticorpi secundari anti-specie, conjugați cu peroxidază din hrean) și a treia de 15 minute, după adăugarea soluției substrat (TMB - tetrametilbenzidină). Reacția a fost oprită prin adăugarea soluției stop (acid sulfuric) iar densitatea optică a fost măsurată la lungimea de undă de 450nm.

Evaluarea rezultatelor s-a realizat semicantitativ, prin calcularea raportului dintre valorile densității optice a probelor de testat și densitatea optică a celui de-al doilea calibrator, în cazul detecției IgG și a singurului calibrator, pentru detecția IgM.

Densitatea optică a probei

$$\frac{\text{Densitatea optică a probei}}{\text{Densitatea optică a calibratorului numărul 2 sau a unicului calibrator}} = \text{Raport}$$

Astfel, o valoare a acestui raport mai mare sau egală cu 1,1 a corespuns unei probe pozitive, o valoare mai mică decât 0,8 - unei probe negative iar probele ale căror valori au fost cuprinse între 0,8 și 1,1 au fost considerate dubioase.

După testarea pentru detecția IgG, probele au fost retestate pentru detecția anticorpilor IgM anti-VWN și pentru detecția IgG anti-VUSU. Pentru detecția celui din urmă, s-a folosit *kit-ul* Anti-Usutu virus ELISA pentru IgG (Euroimmun, Germania). Testarea s-a realizat respectând instrucțiunile furnizorului, cantitățile reactivilor, succesiunea etapelor, evaluarea și interpretarea rezultatelor fiind aceleași ca pentru detecția IgG anti -VWN.

6.4.3 Rezultate și discuții

6.4.3 Results and discussion

6.4.3.1 Rezultatele obținute în urma testării serologice pentru detecția anticorpilor anti-VWN (IgG)

În urma analizei serologice a celor 176 de probe provenite de la pacienți umani, valoarea seroprevalenței totale este de 3,4 % [95% CI (0,73 – 6,09)]. Astfel, din totalul celor 88 de probe recoltate strict pentru studiul de față, două probe au fost pozitive și una dubioasă [2,3%, 95%CI (-0,84 – 5,39)]. Din cele 88 probe recoltate în anul 2015, testate în scopul realizării unui studiu retrospectiv, în patru probe au fost detectați anticorpi anti-VWN [4,5%, 95% CI (0,19 - 8,9)].

Cele două probe pozitive pentru IgG au provenit de la pacienți din zona rurală și din categoria de vârstă de risc de peste 55 de ani (81 și 56 de ani). În ceea ce privește prezența afecțiunilor preexistente, una dintre probe (ID probă: 44) a fost recoltată de la o femeie cu afecțiuni cardio-vasculare iar cealaltă a provenit de la un bărbat ce prezenta febră și tuse (ID probă: 55).

În cazul probelor recoltate în anul 2015, cele patru pozitive la VWN au provenit de la pacienți pozitivi și pentru infecția cu virusului hepatiei E.

6.4.3.2 Rezultatele obținute în urma testării serologice pentru detecția anticorpilor anti-VWN (IgM)

În urma retestării probelor pentru detecția IgM (tabelul 6.28), s-a obținut o seroprevalență de 9,1 % [95% CI (3,08 - 15,1)], cu opt probe pozitive și opt cu rezultat dubios (ID probe: 22, 106, 52, 105, 65, 70, 90, 109). Dintre cele opt probe confirmate, una a fost pozitivă atât pentru IgG, cât și pentru IgM (ID probă: 44).

Tabel 6.29/ Table 6.29

Informații privind probele pozitive pentru detecția anticorpilor IgM anti-VWN

Data regarding positive samples for anti-WNV IgM

ID probă IgM pozitiv	Sex	Vârstă	Reședință
10	F	69	Urban
12	M	34	Peri-urban
20	F	61	Rural
38	F	65	Peri-urban
40	F	70	Rural
91	M	45	Rural
44	F	81	Rural
92	M	64	Peri-urban
Raport F : B	5:3		
	Vârsta medie	61,1	1
	Vârsta mediană	64,5	
	Vârsta minimă	34	
	Vârsta maximă	81	
	Proveniență	Urban	
		Peri-urban	3
		Rural	4
IgG + IgM pozitive		ID probă	44

În ceea ce privește comorbiditățile asociate, declarate în chestionar, trei pacienți au menționat pneumonie și câte un pacient a menționat una sau mai multe afecțiuni asociate: diabet, hipertensiune, afecțiuni cardio-vasculare, febră și reacție alergică la înțepătură de insectă.

6.4.3.3 Rezultatele testării serologice pentru detecția IgG anti-VUSU

În urma testării serologice a celor 88 de probe provenite de la pacienții de la Spitalului de Boli Infecțioase "Sfanta Parascheva" Iași, nu a fost confirmată serologic infecția cu VUSU la oameni, o singură probă având rezultat dubios (ID probă: 68). Proba a fost recoltată de la o femeie în vârstă de 56 de ani, din zona periurbană.

În România, conform rapoartelor Centrului European de Prevenire și Control al Bolilor, infecția cu VWN a fost raportată anual, începând cu 2010. După acest an, tendința cazurilor a fost în descreștere, pentru ca începând cu anul 2012 să se înregistreze un trend ascendent (Crivei ș.a., 2018b), cu un vârf al incidenței în anul 2018 ($n = 277$), în anul 2019 înregistrându-se 62 de cazuri. În ceea ce privește evoluția cazurilor umane în Iași în intervalul de timp menționat, vârful incidenței a fost înregistrat tot în anul 2018 ($n = 26$) iar în anii în care au fost prelevate probe de la pacienți pentru studiul nostru, respectiv 2015 și 2019, s-au înregistrat trei și respectiv patru cazuri (ECDC, 2018; 2019).

Prin acest studiu s-a urmărit detecția anticorpilor specifici la pacienți asimptomatici și totodată stabilirea factorilor de risc incriminați în epidemiologia bolii la oameni.

Seroprevalența de 3,4 %, observată ca urmare a testării pentru detecția IgG anti-VWN pe probe umane, arată că șase din cei 176 pacienți incluși în studiu au intrat în contact cu VWN dar nu au exprimat clinic boala.

Imunitatea umorală este un aspect critic al protecției împotriva flavivirusurilor, având o importanță deosebită atât în *clearance*-ul infecției cât și în protecția în cazul unei reinfecții ulterioare (Carson ș.a., 2014), producția de IgG debutând la patru - cinci zile post infecție (Murray, Garcia, Yan, & Gorchakov, 2013). Studii efectuate pe cohorte de donatori de sânge au demonstrat că infecția cu VWN determină apariția unui răspuns umoral de durată și stabil de-a lungul timpului, cu o persistență a anticorpilor specifici IgG, de la un an pentru 100% dintre donatori (Prince ș.a., 2007), până la cinci ani post-infecție (Carson ș.a., 2014).

Raportând datele privitoare la durata persistenței IgG, conform Prince ș.a., 2007 și Carson ș.a., 2014, pentru cele două probe recoltate în lunile mai și iunie, se poate aprecia o interacțiune virus-organism de minim un an până la maxim cinci ani.

În cazul *markerilor* umorali pentru infecția recentă, apariția IgM debutează a doua zi de la expunere (Murray, Garcia ș.a., 2013) și atinge un vârf al titrului seric la 18 zile post-infecție (Diamond ș.a., 2009). Pe baza analizei de regresie, studii efectuate pe cohorte au demonstrat că persistența anticorpilor IgM în serul pacienților poate varia de la două luni (Murray, Garcia ș.a., 2013) până la 180 zile post infecție (Papa ș.a., 2011), la șapte-opt luni (Diamond ș.a., 2009), la un an (Prince ș.a., 2007) sau până la 1 an și 4 luni (Roehrig ș.a., 2003).

În acest context, rezultatele obținute în prezentul studiu demonstrează că opt din 88 de pacienți testați au intrat în contact cu virusul West Nile (seroprevalența IgM=8,9%). Extrapolând rezultatele studiilor menționate anterior privind persistența anticorpilor specifici IgM și raportându-ne la momentul recoltării probelor pozitive [aprilie (n = 2), mai (n = 4) și iulie (n = 2)], putem aprecia că infecția s-a produs la începutul sezonului de transmitere al anului 2019 pentru probele recoltate în luna iulie, la debutul aceluiași sezon (infecție timpurie) pentru probele recoltate în luna mai din anul 2019, sau în sezonul de transmitere 2018, pentru probele pozitive, recoltate în luna aprilie, în cazul celor din urmă fiind remarcată persistența îndelungată a IgM (un an).

Pentru proba pozitivă (ID probă = 44) atât pentru IgM (DO = 0,414) cât și pentru IgG (DO = 0,665), recoltată la finele lunii mai 2019, coexistența celor două imunoglobuline poate fi pusă pe seama unei reinfecții, sau pe suprapunerea celor două clase de imunoglobuline începând cu a doua săptămână post-infecție, când IgG încep să fie detectabile în probele de ser (Musso ș.a., 2020).

Privitor la semnificația factorilor de risc, prin prezentul studiu nu s-a putut demonstra că o anumită afecțiune pre-existentă poate influența seroconversia. Totuși, considerând cele patru rezultate pozitive pentru IgG din studiul retrospectiv pe pacienți pozitivi pentru HEV, se poate afirma că infecția cu virusul hepatitei E poate reprezenta un potențial factor de risc pentru infecția cu VWN, alături de infecția cu virusurile hepatice B

și C (Murray ș.a., 2006; Philpott ș.a., 2019). În ceea ce privește ceilalți factori de risc menționați în literatura de specialitate, rezultatele noastre nu au putut demonstra o influență a unei afecțiuni existente sau vreo diferență semnificativă din punct de vedere statistic în privința sexului în rândul pacienților.

Abordarea recoltării selective a probelor, pe baza criteriilor de risc (vârstă, afecțiuni preexistente și proveniență), în vederea realizării testării pe subiecți asimptomatici pentru infecția cu VWN, ar putea constitui o limitare a studiului nostru, deși aceste criterii de selecție sunt frecvent întâlnite în cazul pacienților care exprimă clinic infecția. În perspectivă, se urmărește realizarea unor studii epidemiologice longitudinale de durată, cu un număr mai mare de pacienți selectați stocastic, fără criterii discriminatorii, pentru a se putea detecta o valoare fidelă a seroprevalenței.

Seroprevalența IgG obținută în urma analizei celor 176 de probe este apropiată de cea obținută în Italia (3,7%), desfășurată pe 2.507 subiecți (Pezzotti ș.a., 2011) și în Tunisia (4,3%), desfășurată pe 742 pacienți, în 2003 (Riabi ș.a., 2010) și mai mică comparativ cu cele obținute în Algeria (9,8%) (Hachid ș.a., 2019), Zambia (10,3%) (Mweene-Ndumba ș.a., 2015) sau Gabon (27,2%) (Pourrut, Nkoghé, Paweska, & Leroy, 2010).

Lipsa rezultatelor pozitive la testarea probelor pentru detecția anticorpilor specifici anti-VUSU denotă faptul că acest virus nu este circulant la oameni, în zona luată în studiu, cu atât mai mult cu cât probele pozitive pentru VWN au fost negative pentru VUSU, excluzându-se astfel coinfectia sau reacțiile serologice încrucișate pentru virusurile din același serocomplex.

6.4.3 Concluzii parțiale

6.4.3 Partial conclusions

1. Investigațiile serologice (ELISA) efectuate pe un număr de 176 de probe provenite de la pacienți umani, internați la Spitalul de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" din Iași au relevat o prevalență a anticorpilor specifici VWN (**IgG**) de **3,4 %**, valoare care este apropiată de cea obținută de către alți autori în Italia (3,7%) și în Tunisia (4,3%) și mai mică comparativ cu cele obținute în Algeria (9,8%), Zambia (10,3%) sau Gabon (27,2%).
2. Testarea a 88 de probe pentru detecția markerilor infecției recente (**IgM**) a evidențiat o **seroprevalență de 9,1%** în populația testată, ceea ce denotă faptul că opt pacienți din 88 testați au intrat în contact cu VWN la începutul sezonului de transmitere.
3. Seroprevalența constatată de noi atât pentru IgG cât și pentru IgM, alături de prevalența anuală a cazurilor clinice la om, confirmă **caracterul endemic** al infecției cu VWN în zona de est a României.
4. În ceea ce privește detecția markerilor umorali (IgG) ai infecției cu VUSU, cu excepția unui rezultat dubios, nici o probă din cele 88 testate nu a fost pozitivă, ceea ce sugerează faptul că **VUSU încă nu este circulant** la oameni în zona studiată.
5. În vederea stabilirii factorilor de risc incriminați în infecția cu VWN, datele individuale ale pacienților, obținute cu acordul acestora, au fost sistematizate în următoarele variabile:

grupa de vârstă, sex, mediu de proveniență și existența unor condiții medicale preexistente. Din analiza datelor noastre, nu s-a putut confirma implicația acestor factori și influența anumitor comorbidități pre-existente în seroconversia specifică.

6. Rezultatele obținute în urma studiului nostru evidențiază necesitatea implementării unui **sistem de supraveghere și control al infecției cu VWN** la donatorii de sânge asimptomatici.

7. În perspectivă, este necesară realizarea unor **studii epidemiologice longitudinale** de durată, cu un număr mai mare de pacienți selectați stocastic, fără criterii discriminatorii, pentru a se putea determina o **valoare reală a seroprevalenței** flavivirusurilor.

CAPITOLUL VII

IDENTIFICAREA AGENȚILOR PATOGENI DE NATURĂ VIRALĂ ÎN ȚÂNȚARI PRIN INTERMEDIUL SISTEMULUI HIGH-THROUGHPUT REAL-TIME PCR

CHAPTER VII

HIGH-THROUGHPUT DETECTION OF MOBOVIRUSES

Țânțarii sunt responsabili de transmiterea biologică a unei mari diversități de arbovirusuri ce pot produce tulburări de sănătate la oameni și animale de companie sau de rentă. Dintre cele circa 3500 de specii de țânțari descrise până în prezent, numai un număr redus de specii au un rol principal în transmiterea arbovirusurilor la oameni. Speciile care pot îndeplini acest rol tind să dezvolte un comportament alimentar antropofilic, fiind abundente în proximitatea gazdelor susceptibile, în principal ca urmare a exploatării situsurilor propice dezvoltării larvare, create de oameni.

În Europa, emergența și re-emergența unor mobovirusuri a determinat focalizarea atenției asupra identificării speciilor de țânțari implicate activ în transmiterea virusurilor. Acest trend s-a desfășurat simultan cu invazia și stabilirea unor specii exotice de țânțari, asociate comerțului de la nivel global (Brugman ș.a., 2018a).

7.1 Material și metode

7.1 Materials and methods

7.1.1 Zona luată în studiu

Prin prezentul studiu s-au analizat țânțari capturați în anii 2018 și 2019, în timpul sezonelor de transmitere, din luna mai până în luna septembrie. Specimenele au fost capturate pe parcursul sezonului de vară, în două județe din estul României (Iași și Tulcea). În anul 2018, țânțarii au fost capturați în lunile iunie, august și septembrie, în 2 locații, în timp ce în 2019 capcanele au fost amplasate din luna mai până în luna septembrie, în 5 locații.

Capturarea țânțarilor s-a realizat utilizând patru tipuri de dispozitive, automate și manuale. Astfel, femelele aflate în căutarea unei surse de sânge sau de nectar au fost capturate folosind capcanele de tip Miniature CDC Light Trap (BioQuip, USA), adaptate

cu gheață carbonică ca atractant. Pentru capturarea specimenelor aflate în căutare de gazde sau cele retrase în locurile de odihnă, s-au folosit capcanele de tip BG-Sentinel (Biogents, Regensburg, Germania), ce utilizează ca atractant octenolul și/sau gheață carbonică. Suplimentar, pentru capturarea femelelor hrănite aflate în adăpost sau pe oameni din punctele de colectare ocazionale, s-au folosit aspiratorul manual "Pooter" Style (BioQuip, SUA) și aspiratorul manual Heavy Duty Hand-Held DC Vac (BioQuip, SUA). Utilizarea celor două tipuri de substanțe atrăgătoare are la bază comportamentul de căutare a hranei de către țânțari, ce constă în semnalele olfactive emise de gazde. Compușii volatili, precum 1-octen 3-ol (octenol) – kairomon (Pinto ș.a., 2011) și CO₂, rezultați în urma sublimării gheții carbonice, direcționează zborul și comportamentul de orientare al insectelor hematofage (Won Jung ș.a., 2015).

Capturarea țânțarilor s-a realizat în șapte puncte de colectare, distribuite pe raza a două județe din partea de est a României. Înglobarea tuturor habitatelor propice transmiterii virusurilor, preferința alimentară a femelelor și abundența gazdelor amplificatoare sau incidentale au stat la baza raționamentului alegerii zonelor de colectare a țânțarilor. Astfel, raportat la două tipuri de circuite de transmitere ale unor arbovirusuri, respectiv unul silvatic sau rural, ce implică păsările sălbatice și speciile de țânțari ornitofili și altul urban, cu speciile de păsări sinantropice și țânțarii cu un comportament alimentar oportunist sau mamalofil (Zannoli și Sambri, 2019), punctele au fost sistematizate în trei zone peri-urbane și patru urbane. Dintre acestea, trei puncte de capturare au fost considerate ocazionale, nefiind constante de-a lungul intervalului luat în studiu.

Capcanele au fost amplasate în punctele de colectare în amurg și recuperate dimineața, la maxim două ore de la răsărit, o dată pe săptămână, dependent de condițiile de temperatură și precipitații, în cinci locații din județul Iași și două din Tulcea. Capcanele de tip CDC au fost amplasate la 1,5 - 2 m deasupra solului, în coronament, în timp ce capcanele de tip BG-Sentinel au fost plasate la nivelul solului, protejate de vânt sau de interferența oamenilor și a animalelor.

Cele cinci zone de colectare de pe raza județului Iași sunt reprezentate de două zone periurbane și trei zone urbane, din care o zonă este reprezentată ca un punct ocazional, aleasă în scopul colectării specimenelor hrănite din interiorul locuințelor.

În județul Iași, cele mai importante culoare de migrație ale păsărilor includ râurile Prut și Siret. Primul dintre acestea, împreună cu afluenții, este folosit de păsările migratoare în drumul lor către Delta Dunării și Marea Neagră, în timp ce râul Siret reprezintă unul dintre principalele puncte de odihnă și de hrană pentru speciile de păsări acvatice (ANPM - Agenția Națională pentru Protecția Mediului).

Județul Tulcea, ca parte integrantă a Dobrogei, prezintă o înaltă biodiversitate (Fülöp ș.a., 2012), fiind o zonă de tranzit pentru păsările migratoare de-a lungul culoarului Eurasiatic - African estic (Fülöp ș.a., 2018).

Din cele cinci puncte de colectare din județul Iași, două dintre acestea sunt reprezentate de zone periurbane. Dintre acestea, o singură locație, respectiv fondul de

vânătoare Cotu Morii ($47^{\circ}30'9684$ N; $27^{\circ}56'3414$ E), împădurit și cu afluenți ai râului Jijia, a fost ales din considerente ecologice: densitatea faunei, disponibilitatea speciilor de păsări sălbatice și abundența insectelor hematofage. Cea de-a doua locație, dintr-o gospodărie privată [Miroslava ($47^{\circ}14'4705$ N; $27^{\circ}54'456$ E)], a fost ales arbitrar, pe baza amprentei antropice și a existenței mamiferelor domestice și a păsărilor sinantropice.

Pentru colectarea speciilor mamalofile-antropofile din zona urbană, au fost amplasate capcane în trei puncte de colectare, în unul dintre acestea fiind folosit aspiratorul manual. Primul punct urban inclus în studiu, amplasat într-o zonă recreațională și de agrement, cu zonă împădurită și lac de baraj [Circ ($47^{\circ}16'7086$ N, $27^{\circ}61'6814$ E)], a fost cercetat în cei doi ani consecutivi. Considerentele pentru care acest loc a fost ales țin cont de amplasarea strategică, cu zone umede și floră densă și abundența gazdelor incidentale (oameni) și amplificatoare în sezonul de transmitere. Al doilea punct de colectare, amplasat în zona urbană, a fost reprezentat de un campus universitar cu zonă împădurită [Agronomie ($47^{\circ}19'5297$ N; $27^{\circ}56'073$ E)]. Alegerea acestui punct a fost făcută pe baza criteriilor specifice unei zone împădurite, proximității unei biobaze și a caracterului urban. Cel de-al treilea punct [cartier Alexandru ($47^{\circ}14'4705$ N, $27^{\circ}54'456$ E)], puternic antropizat, a fost investigat ocazional, ținând cont de proximitatea zonelor umede, a existenței atelierelor de mecanică auto cu depozite de anvelope și a clădirilor vechi cu subsoluri (fig. 7.1).

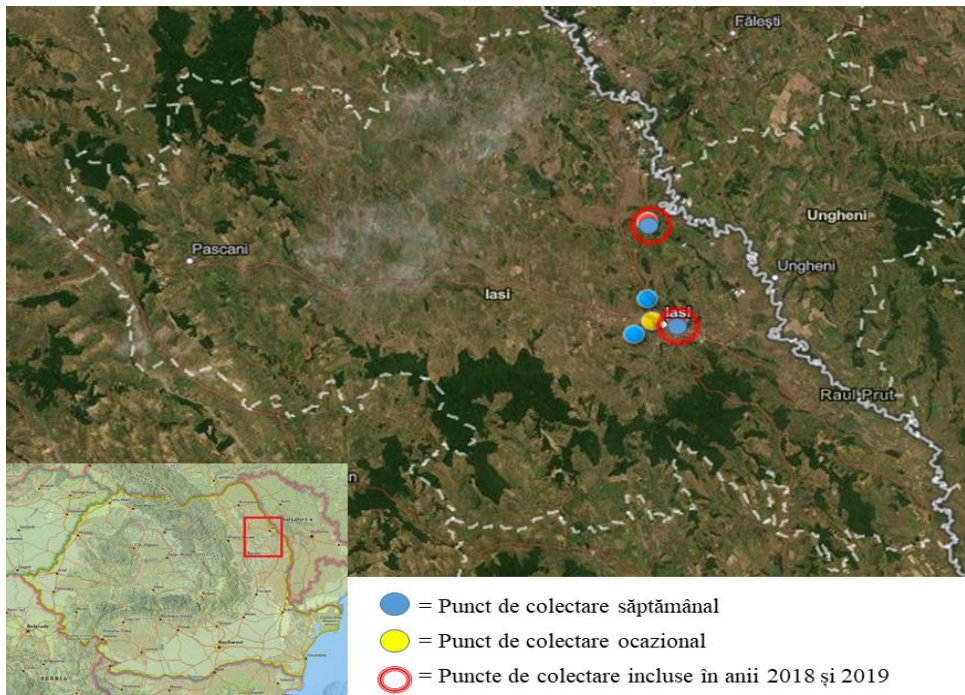


Figura 7.1 Punctele de colectare din județul Iași, incluse în studiu în anii 2018 și 2019 (original)

Figure 7.1 Collection points from Iași county, in 2018 and 2019 (original)

În sud-estul țării, în județul Tulcea, au fost incluse pentru cercetare două puncte de colectare: unul, într-o zonă urbană ($45^{\circ}17047$ N; $28^{\circ}792729$ E) și cel de-al doilea, la o locație naturală cu un grad relativ mic de antropizare, cu zone umede adiacente ($45^{\circ}166376$ N, $28^{\circ}856166$ E) și cu un adăpost pentru cai (Satul Pescăresc) (fig. 7.2). Ambele puncte de colectare, considerate ocazionale, au fost utilizate în două etape de colectare a speciimenelor, în lunile iulie și septembrie 2019.

Pentru prima zonă de colectare, urbană, s-au utilizat capcanele de tip CDC și BG sentinel, cu gheață carbonică și octenol folosite ca atractanți.

În cel de-al doilea punct, cel din zona periurbană, pe lângă cele două tipuri de capcane menționate, au mai fost utilizate aspiratorul manual Heavy Duty Hand-Held DC Vac/Aspirator – BioQuip și aspiratorul "Pooter" Style , ambele pentru colectarea femelelor hrănite cu sânge de la animalele din adăpost.

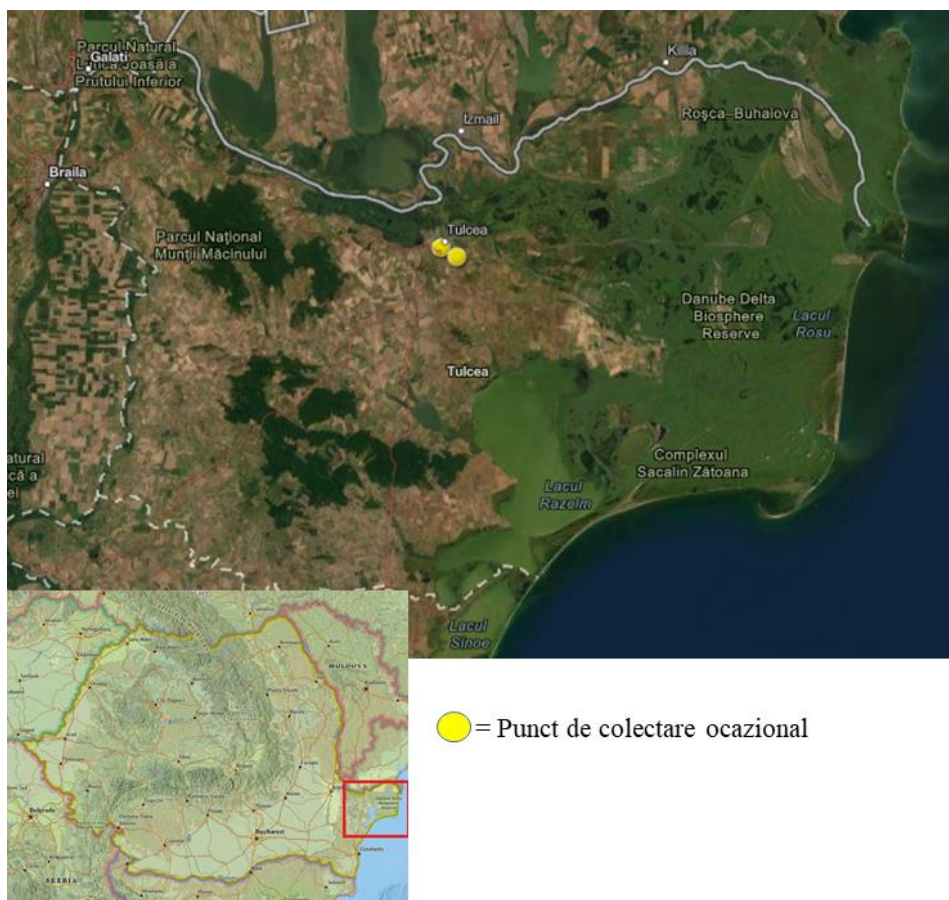


Figura 7.2 Punctele de colectare din județul Tulcea, incluse în studiu în anul 2019 (original)

Fig.7.2 Collection points from Tulcea county, in 2019 (original)

7.1.2 Identificarea și stocarea specimenelor

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 de ovipoziție) pe plăci de gheață, cu ajutorul unui stereomicroscop (StereoBlue, Euromex). Țânțarii au fost identificați pe baza caracterelor morfologice, utilizând cheile dihotomice de identificare (Becker ș.a., 2010) și cheile interactive din programul MosKeyTool (Institutul Pasteur, Franța) și ulterior 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 (tabelul 7.1), dependent de datele menționate anterior, în timp ce femelele nehrănite au fost analizate în *pool*-uri monospecifice conținând 20 - 50 de specimene/eșantion.

Tabel 7.1/ Table 7.1

Repartiția în *pool*-uri a specimenelor hrănite
The distribution in pools of bloodfed specimens

Specimene individuale	<i>Pool</i> -uri monospecifice (<19)	Total <i>pool</i> -uri femele hrănite
15	13	28

7.1.3 Extracția ARN-ului din *pool*-urile de țânțari

ARN-ul total din *pool*-urile monospecifice de țânțari a fost extras utilizându-se kit-ul MagVet™ Universal Isolation (Lifetechnology) și robotul pentru extracții MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor (Thermo Fisher, SUA).

Etapa de liză a fost precedată de transferul țânțarilor în tuburi cu bile de silicon cu un diametru de 0,1 mm (BioSpec) și cu 500 μl mediu clasic pentru culturi celulare (D-MEM) și 10% ser fetal bovin (Gibeco). Omogenizarea țânțarilor s-a realizat utilizând trituratorul de organe Precellys®24 Dual/homogenizer (Bertin, Franța) timp de 40 de secunde la 5500 rpm. După triturare, amestecul fluid/țânțari a fost centrifugat la 1500 rpm timp de 2 minute pentru clarificare. Etapa ulterioară triturării și centrifugării probelor s-a realizat în hota de securitate biologică, pe gheață iar pentru alicotarea supernatantului, 120 μl din cantitatea totală au fost depuși în plăci de diluție de 96 de godeuri. Restul supernatantului a fost depozitat în tuburi Eppendorf de 1,5 ml, la -80°C , pentru izolare virală.

Etapa de extracție automată, ce folosește robotul Kingfisher, utilizează tehnica bilelor magnetice, de care se atașează acizii nucleici. O dată atașați, aceștia sunt capturați și transferați, cu ajutorul barelor metalice, în plăci cu godeuri adânci (de tip *Deepwell*) ce conțin reactivii de spălare și de eluție. Acidul nucleic astfel extras reprezintă matricea ce va fi analizată prin tehnici de biologie moleculară.

În hota de securitate biologică, cantitatea de 120 μ l supernatant a fost transferată în plăci cu godeuri adânci, peste care s-au adăugat 250 μ l tampon de liză, soluție NM1 și 620 μ l soluție tampon de încărcare cu bile. Pentru fiecare placă de 96 de godeuri au fost adăugați patru martori, reprezentați de mediu clasic pentru culturi celulare (D-MEM) și un martor pozitiv (10 μ l WNV). Soluția de încărcare a fost preparată în prealabil, din 600 μ l tampon de încărcare cu 20 μ l bile pentru fiecare godeu. Etapa de liză și de legare, cu o durată de 10 minute, a presupus liza matricei prin agitații lente și eliberarea acizilor nucleici, fixarea lor de bilele magnetice și capturarea bilelor prin barele magnetice și transferul acestora în plăcile cu soluțiile de spălare.

Următoarea etapă, reprezentată de spălări succesive, a presupus eliberarea bilelor pe care sunt atașați acizii nucleici în diferite soluții de spălare, agitarea medie în timpul purificării (spălări cu o durată de 1 - 2 minute), capturarea și transferul bilelor dintr-o placă ce conține o soluție de spălare în următoarea. Astfel, pentru primele două etape de spălare s-au folosit câte 600 μ l tampon de spălare, NM3 și NM4 iar pentru ultima spălare s-a folosit etanol 80%, în aceeași cantitate. După ultima etapă de spălare, bilele magnetice sunt uscate timp de 5 minute și transferate în tamponul de eluție NM6, într-o cantitate de 60 μ l. În etapa de eluție, bilele magnetice sunt agitate lent timp de 10 minute, pentru eliberarea acizilor nucleici.

7.1.4 Revers-transcripția ARN-ului din *pool*-urile de țânțari

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), respectând instrucțiunile producătorului. Cantității de ARN folosite pentru această reacție (1 μ l) i s-au adăugat 1 μ l Reverse Transcription Master Mix și 3 μ l de apă lipsită de ribonuclease, respectându-se următorul profil termic:

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

7.1.5 Pre-amplificarea ADN-ului și testarea probelor pentru agenții virali selectați

Pre-amplificarea reacțiilor s-a realizat utilizând *kit*-ul PreAmp Master Mix Kit (Fluidigm corporation, USA), într-un volum final de 5 μ l conform instrucțiunilor producătorului. Astfel, s-au folosit 1 μ L master mix, 1. 25 μ L ADN extras din țânțari, 1.25 μ L mix de primeri (0.2X) și 1.5 μ L apă distilată. Etapa de pre-amplificare se bazează pe următorul protocol termic: 95 °C pentru 2 minute, 14 cicluri la 95°C pentru 15 sec și apoi 4 minute la 60°C.

După pre-amplificare, produșii de reacție au fost centrifugați la 1500 rpm timp de 1 minut și diluați 1:5 până la utilizarea ulterioară.

7.2 Detecția agenților de natură virală din țânțari utilizând sistemul High-Throughput Real-Time PCR

7.2 High-Throughput Real-Time PCR detection of viruses from mosquitoes

Probele de ADNc pre-amplificate au fost testate pentru prezența a 37 agenți virali vectorizați de țânțari, prin tehnica PCR în timp real microfluid, utilizând sistemul BioMark real-time PCR (Fluidigm, USA) dezvoltată de Moutailler ș.a., 2019.

Sistemul *BioMark™ dynamic array Fluidigm* are capacitatea de a executa reacții paralele PCR în timp real, utilizând cipuri specifice de 96.96 sau 48.48 reacții, efectuându-se astfel un număr de 9.216, respectiv 2.304 de reacții individuale (Michelet ș.a., 2014). Pentru studiul prezent s-au utilizat cipuri de 96.96, rezultând astfel 9.216 reacții.

Pentru studiul nostru, cele 365 de *pool*-uri de țânțari au fost testate pentru virusuri precum: Batai, Chickungunya, Dengue, Zika, West Nile, Usutu, Tahyna, Semliki Forest, virusul febrei Văii Rift, virusul Ross River, virusul febrei galbene și altele (Anexa nr.1).

După etapa de pre-amplificare, eșantioanele au fost incluse într-o reacție qPCR folosind sonde Taqman, marcate FAM și BHQ1 (*black hole quencher*) și mix-ul TaqMan Gene Expression Master Mix, utilizate conform instrucțiunilor furnizate de producător (Applied Biosystems, Franța).

Prepararea plăcii cu amorse corespunzătoare coloanei pentru primeri, a presupus ca în fiecare godeu, reprezentativ pentru un design, să fie introdus amestecul format din: 3,6 μl primer sens 100 μM, 3,6 μl primer antisens, 4 μl sondă 20 μM și 8,8 μl apă. Peste acest mix s-au adăugat 3 μl soluție de încărcare 2X, și 3 μl primer stock 20x.

Seturile de primeri și sondele utilizate sunt cele folosite de Moutailler și autorii în 2019 (Moutailler ș.a., 2019).

Prepararea plăcii cu eșantioane, corespunzătoare coloanei pentru probe, a presupus pregătirea pre-mix-ului, cu un volum final de 374 μl pentru 96 de godeuri iar apoi s-au adăugat 340 μl 2x taqMan Gene expression master mix și 34 μl soluție de încărcare 20x.

Astfel, în coloana pentru primeri, în fiecare godeu, s-au depozitat 45 μl pre-mix iar în coloana pentru eșantioane s-au depus 3,3 μl pre-mix și 2,7 μl ADN. Placa a fost vortexată și centrifugată timp de 1 minut și 30 sec la 1500 g. Profilul termic pentru realizarea reacției a constat în: 5 min la 95°C, 45 cicluri la 95°C pentru 10 s, 15 s la 60°C, și 10 s la 40°C. Rezultatele obținute au fost analizate utilizând softul *Fluidigm Real Time PCR Analysis*.

Pentru validarea reacției, pentru fiecare placă analizată, au fost introduși patru martori negativi (apă). De asemenea, pentru a verifica prezența factorilor de inhibiție PCR în probele testate, s-a adăugat o tulpină de *Escherichia coli*, ca un control intern de inhibiție, folosind primeri și sondă specifică pentru gena *E. coli*. Un al doilea control intern, β-actina

(“housekeeping” gene), a fost adăugat cu scopul de a normaliza expresia genică și pentru a eficientiza etapele de amplificare (Bjarnadottir ș.a., 2005).

7.3 Confirmarea rezultatelor pozitive obținute în urma detecției utilizând sistemul High-Throughput Real-Time PCR

7.3 Confirmation of positive results obtained by High-Throughput Real-Time PCR system

Probele corespunzătoare semnalelor pozitive obținute în urma tehnicii PCR în timp real microfluid au fost retestate, pentru confirmare, prin Real Time PCR, inocularea omogenatului de țânțari pe culturi celulare și secvențiere.

7.3.1 Reacția în lanț a polimerazei (PCR) pentru confirmarea genomului viral

Probele cu rezultate pozitive pentru virusul West Nile, constatate prin tehnica PCR în timp real microfluid, au fost retestate prin duplex RT-PCR în timp real.

Tehnica a avut drept scop amplificarea ARN-ului virusului West Nile, fiind bazată pe metoda descrisă de (Linke ș.a., 2007), pentru regiunea ProC și pe o metodă internă (ANSES), pentru regiunea 3'NC. Prin tehnica duplex PCR în timp real, pentru amplificarea ARN-ului celular al β -actinei, s-a folosit metoda descrisă de Moutailler și autorii în 2019 (tabelul 7.2).

Tabel 7.2/ Tabel 7.2.

Primeri folosiți pentru amplificarea genelor specifice virusului West Nile

Primer sets used for specific WNV amplification

Gena ținta	Primeri	Secvențe de nucleotide (5' - 3')	Amplicon (bp)
ProC	WNproC-F (10 -33) WNproC-R (132-153) WNproC-probe	CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT GCGTTTTAGCATATTGACAGCC CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT	144
3'NC	WN3'NC-F (10538) WN3'NC-R (10627) WN3'NC (10564)	GAGTAGACGGTGCTGCCTGC CGAGACGGTTCTGAGGGCTTAC ACCCAGTCCTCCTGGGGT	89
BETA A	Beta-actine_F Beta-actine_R Beta-actine_P	GCT ACG TCG CCC TGG ACT T AGG AAC GAC GGC TGG AAG A AGG AAA TGG CCA CCG CTG CCT CGT	151

(Linke ș.a.,2007; Moutailler ș.a., 2019.)

Prin această tehnică au fost folosite două seturi de primeri și sonde: un set de primeri și sonda specifice regiunii 3'NC și un set de primeri și sonda specifice regiunii ProC a virusului West Nile.

Protocolul de lucru pentru PCR în timp real a presupus utilizarea termociclorului Applied Biosystems StepOnePlus TM Instrument iar amplificarea s-a realizat folosindu-se *kit-ul* AgPath-ID TM One Step RT-PCR *kit* (ThermoFisher), cu o concentrație finală a

primerilor de 0,4 μM și 0,2 μM a sondei și controlului intern, β -actină. Reacțiile s-au desfășurat într-un volum final de 25 μl , însumând: 4.1 μl apă ultrapură (fără DNaze sau RNaze), 12.5 μl 2x tampon PCR, 1 μl enzimă RT-PCR mix 25x, 1 μl enhancer 1x, câte 1 μl pentru fiecare amorsă și sondă și 5 μl ARN. Pentru validarea reacției s-au adăugat un martor pozitiv (apă bidistilată) și unul negativ.

Pentru această tehnică, s-au utilizat sonde marcate FAM - TAMRA și FAM - MGB/NFQ pentru virusul de interes și VIC - TAMRA, pentru β -actină. Condițiile termice necesare amplificării au fost: 45°C pentru 10 min, 95 °C pentru 10 min și 45 cicluri la 95°C pentru 15 s, și 60°C pentru 1 min.

7.3.2 Izolarea flavivirusurilor și alphavirusurilor pe culturi celulare

7.3.2.1 Principiul metodei

Pentru izolarea virală, două tipuri de culturi celulare au fost inoculate cu omogenatul din probele de țânțari și verificate zilnic pentru apariția efectului citopatic (ECP). Tehnica se bazează pe detecția *in vitro* a capacității infecțioase a virusului, rezultată în urma replicării acestuia pe celule pentru care are tropism (Vero) sau prin replicarea pe celule de insecte (C6/36).

Virusul a fost izolat doar din omogenatele de țânțari pozitive prin RT-PCR în timp real. Primul pasaj pe culturi celulare s-a realizat prin inocularea broiajului de țânțari, clarificat în prealabil, pe monostrat de celule Vero (celule epiteliale de maimuță) de 24 de ore. După inoculare, celulele au fost incubate la 37°C timp de șapte zile, în atmosferă cu CO₂. Pentru urmărirea efectului citopatic, celulele au fost verificate zilnic la microscopul cu inversie. La finalul perioadei de incubație, sau după apariția efectului citopatic, s-a realizat colectarea supernatantului celulelor și testarea prin tehnica de extracție ale ARN-ului și PCR în timp real, specific virusului de interes.

Supernatantul obținut în urma primului pasaj s-a inoculat pe celule de insecte C6/36 derivate din *Aedes albopictus* și s-a incubat la 28°C timp de șapte zile, în atmosferă fără CO₂. După inoculare, celulele au fost verificate zilnic, în vederea observării apariției efectului citopatic. După șapte zile post-infecție (p.i), din supernatantul celular au fost efectuate tehnicile de extracție ARN și RT-PCR în timp real.

7.3.2.2 Inocularea culturilor celulare de tip Vero

Inocularea omogenatului de țânțari a fost precedată de pregătirea celulelor de tip Vero, cu 24 de ore înainte, utilizându-se flacoane pentru culturi celulare sterile cu suprafețe de cultivare de 25cm² (T25), în număr egal cu numărul probelor pozitive, la care s-a adăugat un flacon pentru validare (martor negativ).

Astfel, cu o zi înainte de inocularea virală, celulele în monostrat din flacoanele de tip T75 au fost detașate prin tripsinare, cu 2ml tripsină, după ce mediul de întreținere a fost aspirat iar stratul de celule a fost spălat de două ori cu câte 8 ml soluție PBS. După o incubare de câteva minute la 37° C, celulele detașate de pe suprafața flaconului au fost distribuite în

cantitate de câte 0,5 ml în flacoane de tip T25, peste care s-au adăugat 9,5 ml mediu clasic de întreținere.

În ziua inoculării, celulele din flacoanele de tip T25, cu un grad de confluență a stratului celular de minim 80%, au fost infectate cu inoculul filtrat prin centrifugare, utilizând tuburi cu filtre cu dimensiunea porilor de 0,45 μm, timp de 5 min x 10.000g.

Înainte de izolare, mediul complet a fost aspirat, urmat de lavajul dublu al stratului de celule cu mediu de întreținere fără ser fetal bovin. Ulterior, în funcție de cantitatea filtratului (50-100 μl), s-au adăugat 900 - 950 μl mediu pentru culturi celulare (D-MEM) fără ser fetal bovin, urmat de o perioadă de incubație de 90 min, timp necesar fazei de absorbție și atașării virusului de celule. După perioada de incubație, peste celulele infectate s-au adăugat 5 ml mediu complet cu 10% ser fetal bovin și au fost introduse la 37° C timp de șapte zile. Pentru martorul negativ, stratul confluent de celule a fost acoperit cu 1ml mediu de întreținere, respectându-se aceeași procedură ca și în cazul celulelor infectate.

Începând cu a treia zi post-infecție, celulele au fost observate zilnic la microscopul inversat pentru verificarea apariției efectului citopatic. În cazul în care s-au constatat modificări morfologice, specifice sau nespecifice, la nivel celular, în mai puțin de șapte zile, supernatantul a fost aspirat și alicotat pentru realizarea etapelor ulterioare, respectiv pentru extracția de ARN și pentru PCR în timp real. La șapte zile post-infecție, supernatantul din toate flacoanele, inclusiv martorul negativ, a fost colectat și divizat în cantități de 1ml, pentru cel de-al doilea pasaj și de 200 μl pentru extracțiile de ARN și apoi depozitat la -70°C până la utilizare.

7.3.2.3 Extracția ARN din supernatantul colectat de la culturile celulare Vero

Extracția ARN din supernatantul culturilor celulare au fost efectuate utilizând robotul QIACube (Qiagen, Germania) și kit-ul de extracție QIAamp Viral RNA Mini QIACube kit (Qiagen, Germania).

Protocolul de lucru a urmărit extracția ARN-ului total din supernatantul colectat după primul pasaj pe culturi celulare al omogenatului de țânțari. Astfel, luând în considerare caracterul zoonotic al virusurilor de interes, liza eșantioanelor s-a realizat manual, în platforma de biosecuritate de nivel 3. Pentru aceasta, în microtuburi de 2 ml s-au adăugat 140 μl probă de testat și 560 μl tampon soluție AVL-carrier pe probă, preparată în prealabil, din 0,56 ml *Buffer* AVL și 5,6 ARN-AVL carrier. La numărul total de eșantioane de testat, s-a adăugat un martor negativ, reprezentat de 140 μl mediu pentru culturi celulare (MEM), cu scopul de a confirma lipsa contaminării între probe. Restul etapelor, de transfer al lizatului în coloanele QIAmp, fixarea ARN de membrana de siliciu, etapele de spălare cu soluțiile AW1 și AW2, transferul coloanelor în tuburile de eluție și eluția au fost realizate automat. După recuperarea produșilor de eluție, în cantitate de 60 μl, aceștia au fost stocați la -70 °C până la utilizarea ulterioară.

Deteția ARN-ului genomic prin duplex PCR în timp real s-a realizat conform punctului 7.3.1.

7.3.2.4 Realizarea primului pasaj pe culturi celulare C6/36

Pentru izolarea virusului pe culturi celulare de insecte C6/36, tehnica de inoculare s-a realizat conform punctului 7.3.2.2, cu diferențe în ceea ce constau modalitatea de pasare și incubare a celulelor.

Pasajul celulelor dintr-un flacon de tip T75 în flacoane cu o suprafață de 25 cm² s-a realizat fără tripsinare și fără lavaj, mediul de întreținere folosit fiind Leibovitz's L-15 iar incubarea s-a realizat la 28°C în atmosferă fără CO₂. La șapte zile post infecție, supernatantul a fost colectat și divizat pentru pasajul secundar și pentru extracția ARN-ului.

Tehnica de amplificare prin duplex PCR, pentru verificarea prezenței virusului de interes, s-a realizat conform punctului 7.3.1.

7.3.2.5 Realizarea celui de-al doilea pasaj pe culturi celulare C6/36

Pentru cel de-al doilea pasaj pe culturi celulare derivate din *Aedes albopictus* s-a utilizat 1ml supernatant de la primul pasaj pe culturile renale de maimuță sau de la celulele C6/36. Astfel, supernatantul corespunzător probelor pozitive prin RT-PCR (Ct <45) și care au indus un efect citopatic, a fost supus celui de-al doilea pasaj, respectând tehnica de la punctul 7.3.2.4.

7.3.3 Amplificarea ARN-ului viral prin reacția de polimerizare în lanț (PCR) clasică

7.3.3.1 Amplificarea zonei de interes prin tehnica RT-PCR panflavivirus.

În vederea obținerii secvențelor specifice de virus și pentru caracterizarea agenților virali, ARN-ul extras din omogenatele din țânțari și supernatantul culturilor celulare a fost testat prin tehnica PCR Pan-flavivirus.

Revers-transcripția și amplificarea s-au realizat utilizând kit-ul „QIAGEN one-step RT-PCR”, într-un volum final de 25 μl [13 μl apă ultrapură, 5 μl tampon 5x PCR, 1 μl dNTP (10mM), 1 μl ADN polimerază și câte 2 μl pentru fiecare primer și 1 μl ARN], cu următorul profil termic:

Temperatura	Durata	Nr. cicluri
50°C	30 min	1
95°C	15 min	45
94° C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	1

Amplificarea s-a realizat utilizând primeri specifici regiunii NS5 genomului virusului WN (tabelul 7.3).

Tabel 7.3/ Tabel 7.3

Setul de primeri utilizați pentru amplificarea și secvențierea genei specifice VWN

Primer sets used for specific amplification and sequencing of WNV

Primeri	Secvențe de nucleotide
WNV9040 (Forward)	5' TACAACATGATGGGVAARAGAGAGA-3'
WNV10124 (Reverse)	5'-AGCATGTCTTCYGTBGTTCATCCAYT-3'

Analiza ampliconilor s-a realizat prin electroforeză. Astfel, migrarea produșilor de amplificare, cu o dimensiune preconizată la 1085 nt s-a realizat în gel de agaroză de concentrație 1%, timp de 30 min la un voltaj de 90V. Alături de probele testate, au fost incluși, pentru validarea reacției, un martor pozitiv (tulpina virală israeliană IS98) și unul negativ (apă).

7.3.3.2 Reacția de polimerizare în lanț clasică pentru amplificarea segmentului de genom pentru VSIN

Pentru a obține secvențele de interes și ulterior pentru a le caracteriza, au fost testate extractele de ARN obținute din omogentale de țânțari și din supernatantul culturilor celulare (Vero și C6/36) corespunzătoare probelor pozitive obținute prin tehnica de PCR în timp real microfluid. Astfel, reacțiile au fost desfășurate folosind *kit*-ul QIAGEN one-step RT-PCR, într-un volum final de 25μl, păstrând proporția reactivilor, asemeni punctului 7.3.3.1: 13 μl apă ultrapură, 5 μl tampon 5x PCR, 1 μl dNTP (10mM), 1 μl ADN polimerază și câte 2 μl pentru fiecare primer și 1 μl ARN. Amorsele folosite, după Lundström și Pfeffer, 2010 (tabelul 7.4), au fost specifice regiunii proteinei de înveliș („E”), respectând următoarele condiții termice:

Temperatura	Durata	Nr. cicluri
50°C	30 min	1
95°C	15 min	40
55° C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	

Tabel 7.4/ Tabel 7.4

Setul de primeri utilizați pentru amplificarea genei specifice ale virusului Sindbis

Primer sets used to amplify specific region of Sindbis virus

Primeri	Secvențe de nucleotide
A1-F (Forward)	5'-AAAGGATACTTTCTCCTCGC-3'
A2-R (Reverse)	5'-TGGGCAACAGGGACCATGCA-3'

(Lundström & Pfeffer, 2010)

7.4 Secvențierea nucleotidelor

Secvențierea ampliconilor pozitivi a fost realizată prin utilizarea metodei enzimatice Sanger, care are la bază tehnica de electroforeză capilară de înaltă rezoluție. Secvențierea s-a realizat în ambele sensuri, cu primeri WNV9040 și WNV10124 (tabel 7.3).

7.4.1 Analiza bioinformatică a secvențelor de nucleotide

Secvențele nucleotidice obținute au fost editate utilizând programul BIOEDIT. Ulterior, secvențele au fost analizate bioinformatic în serverul BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

7.4.2 Analiza filogenetică

Secvențele editate au fost alinate cu secvențele omoloage disponibile în baza de date GenBank. Izolatul uman GP78 (număr de acces în GenBank: AF075723), aparținând virusului encefalitei japoneze, a fost utilizat ca taxon extern grupului de secvențe virale West Nile („outgroup”).

Arborele filogenetic a fost generat cu ajutorul programului MEGA 7 (Kumar ș.a., 2016) prin utilizarea metodei Neighbor-Joining (Saitou și Nei, 1987) și a modelului matematic de estimare a substituțiilor nucleotidice - distanța p (proporția de aminoacizi prin care două secvențe proteice diferă). Topologia arborelui filogenetic a fost evaluată prin 1000 de replicări.

7.5 Rezultate și discuții

7.5 Results and discussion

7.5.1 Evaluarea abundenței și diversității speciilor de țânțari din zonele luate în studiu

În intervalul iunie 2018 - septembrie 2019 au fost capturați 17694 țânțari (tabelul 7.5). Specimenele au fost colectate în șapte locații din zone urbane și peri-urbane din două județe din zona de est a României. Siturile de colectare au cuprins zone relevante din punct de vedere epidemiologic, cum ar fi un adăpost de animale, un fond de vânătoare sau o zonă de agrement. În total, au fost colectate și identificate 11 specii de țânțari (figurile 7.3 și 7.4) și un taxon neîncadrat (specimene din genul *Aedes* neidentificate până la nivelul de specie).

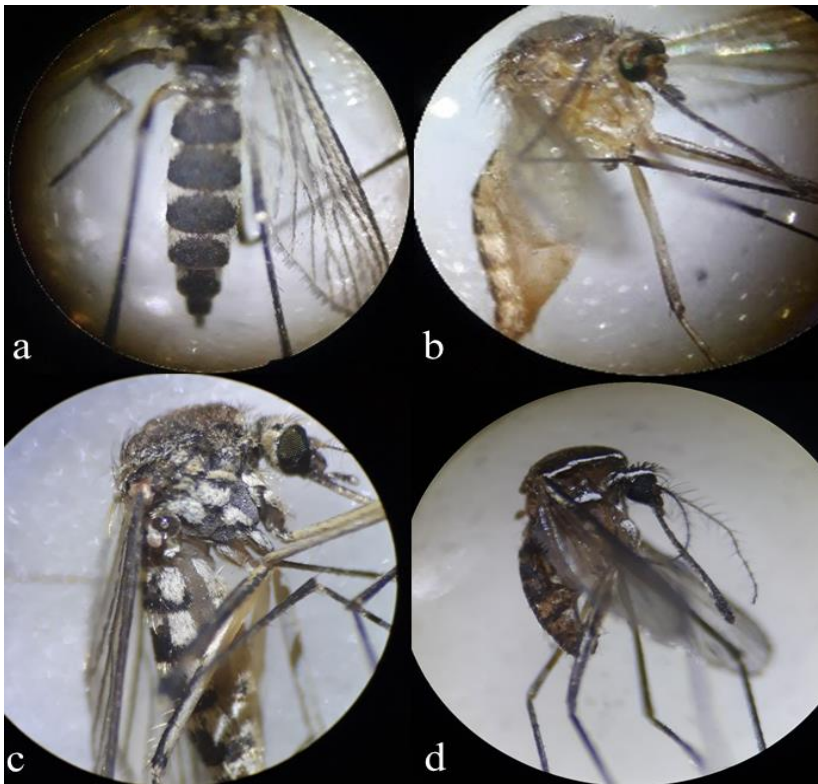


Figura 7.3 Specimene colectate (femele), magnificație WF 10X/20: a) *Aedes sticticus*; b) *Culex modestus*; c) *Aedes vexans*; d) *Uranotaenia unguiculata* (Original)

Figure 7.3 Collected specimens, (females) magnification WF 10X/20: a) *Aedes sticticus*; b) *Culex modestus*; c) *Aedes vexans*; d) *Uranotaenia unguiculata* (Original)



Figura 7.4 Specimene colectate (femele) din specia *Aedes caspius*, magnificație WF 10X/20 (Original)

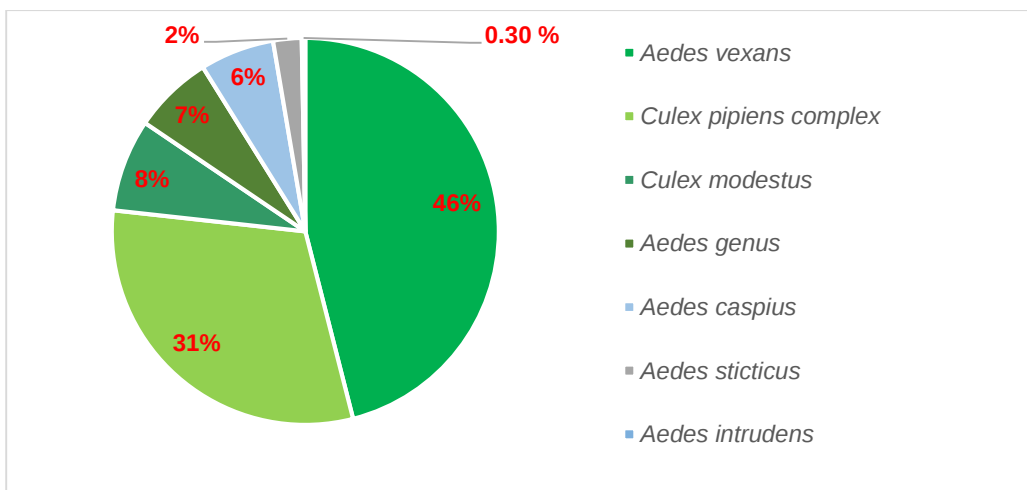
Figure 7.4 *Aedes caspius* collected specimens, (females) magnification WF 10X/20 (Original)

Numărul total de țânțari colectați și ponderea lor pe specii
Total number of collected specimens by species and their proportion

Specie	Numărul de specimene colectate	Ponderea specimenelor colectate pe specie (%)
<i>Aedes vexans</i>	7745	43.77
<i>Culex pipiens</i>	5169	29.21
<i>Culex modestus</i>	1300	7.35
<i>Aedes caspius</i>	1044	5.90
<i>Aedes sticticus</i>	400	2.26
<i>Aedes spp.</i>	1119	6.32
<i>Aedes intrudens</i>	50	0.28
<i>Anopheles hyrcanus</i>	278	1.57
<i>Anopheles maculipennis</i>	470	2.66
<i>Coquillettidia richiardii</i>	101	0.57
<i>Uranotenia unguiculata</i>	11	0.06
<i>Culiseta annulata</i>	7	0.04
Total	17694	100

Dintre acestea, șase specii și taxonul neidentificat au fost analizate pentru prezența posibilelor arbovirusuri. În total, 16827 țânțari grupați în 365 *pool*-uri au făcut obiectul detecției virale.

Raportat la abundența speciilor de țânțari incluși în studiu, constante și dominante de-a lungul perioadei au fost speciile aparținând speciei *Ae.vexans* (46%) și *Culex pipiens* s.l - 31% (figura 7.5). Restul speciilor pentru care s-a efectuat detecția agenților patogeni virali au reprezentat între 0,3% și 6% specimene pe taxon (fig.7.6).



Figură 7.5 Ponderea speciilor de țânțari incluse în studiu
Figure 7.5 Percentage of analyzed mosquitoes by species



Figura 7.6 Specimene colectate din specia *Culex pipiens* s.l., magnificație WF 10X/20; a și b femele nehrănite, c) femelă preătită pentru ovipoziție; d) femelă hrănită (Original)

Figure 7.6 *Culex pipiens* s.l.collected specimens, magnification WF 10X/20; a + b) unfed females; c) gravid female; d) blood-fed female (Original)

Privitor la abundența speciilor pe luni (tabelul 7.6), limita superioară a fost atinsă în luna iunie a anului 2019 ($n = 7179$), urmată de luna iulie a aceluiași an ($n = 6127$). În cadrul acestor luni, abundența cea mai crescută a fost remarcată pe 26 iunie la fondul de vânătoare, cu 4433 specimene, dintre acestea 2879 aparținând speciei *Ae. vexans*. În luna iulie, vârful abundenței a fost în ziua de 9 iulie, la herghelie ($n = 4171$), cu 1828 țânțari încadrați în specia *Ae. vexans*. Pentru anul precedent (2018), cel mai mare număr de specimene testate au fost colectate în luna iunie ($n = 1054$) și în luna august ($n = 825$). În cadrul lunilor menționate, cel mai mare număr de țânțari a fost capturat pe 14 iunie, la fondul de vânătoare, cu speciile *Cx. pipiens* ($n = 354$) și *Cx. modestus* ($n = 350$), aceste două specii fiind cele mai abundente. În luna august cele mai multe specimene au fost colectate în ziua de 23, în aceeași locație, speciile cele mai abundente fiind *Ae. vexans* ($n = 250$) și *Cx. pipiens* ($n = 174$).

Tabel 7.7/ Tabel 7.7

Diversitatea și distribuția speciilor de țânțari colectate și analizate în 2019
 Diversity and distribution of adult mosquitoes of six species collected at seven study sites in 2019

Specii Punct de colectare 2019	Fond de vânătoare	Gospodărie privată	Campus universitar	Zonă recreațională și de agrement	Zona Alexandru	Herghelie	Zonă urbană Tulcea	Total specimene/specie
<i>Aedes vexans</i>	3507	52	901	0	0	2878	0	7338
<i>Culex pipiens complex</i>	2115	150	251	50	10	1463	2	4041
<i>Culex modestus</i>	450			100				550
<i>Aedes caspius</i>	50	51	134	0	0	808	1	1044
<i>Aedes sticticus</i>	150					250		400
<i>Aedes genus</i>	350					769		1119
<i>Aedes intrudens</i>	50	0						50
Total specimene/ punct de colectare	6672	253	1286	150	10	6168	3	14542

Tabel 7.8/ Tabel 7.8

Diversitatea și distribuția speciilor de țânțari colectate și analizate în 2018
 Diversity and distribution of adult mosquitoes of six species collected at seven study sites in 2018

Specii Punct de colectare 2018	Fond de vânătoare	Zonă de recreațională și de agrement	Total specimene/ specie
<i>Aedes vexans</i>	407	0	407
<i>Culex pipiens complex</i>	828	300	1128
<i>Culex modestus</i>	650	100	750
Total specimene/ punct de colectare	1885	400	2285

Tabel 7.11/ Table 7.11

Validarea rezultatelor obținute prin tehnica PCR în timp real microfluid, prin amplificarea regiunilor de interes din genomul VWN prin duplex PCR în timp real

Microfluidic RT rtPCR results confirmation by RT-rtPCR

ID probă	Specie	Punct de colectare	Media Ct pentru ținta ProC	Media Ct pentru ținta 3'NC
28	<i>Culex pipiens</i> s.l	Herghelie	32,6	Nedeterminat
129	<i>Culex pipiens</i> s.l	Fond de vânătoate	23,18	20,71
135	<i>Culex pipiens</i> s.l	Zonă de agrement	24,11	20,87
136	<i>Culex pipiens</i> s.l	Fond de vânătoate	24,7	21,13
216	<i>Culex pipiens</i> s.l	Fond de vânătoate	22,98	32,40
223	<i>Culex modestus</i>	Zonă de agrement	27,32	30,16
224	<i>Aedes vexans</i>	Herghelie	26,39	28,47
257	<i>Culex pipiens</i> s.l	Fond de vânătoate	25,01	25,18
316	<i>Culex pipiens</i> s.l	Herghelie	26,71	25,57
353	<i>Culex pipiens</i> s.l	Fond de vânătoate	23,47	23,37

Conform protocolului de lucru intern, un eșantion este considerat pozitiv dacă valoarea Ct-ului este mai mică sau egală cu 35.



Figură 7.8 Curba de amplificare pentru confirmarea semnalelor pozitive obținute prin tehnica PCR în timp real microfluid, regiunea 3'NC (a) și regiunea ProC (b) (Probele 140, 216, 223, 224, 257, 353)

Figure 7.8 Amplification curve for samples 140, 216, 223, 224, 257, 353, region 3'UTR (a) and region ProC (b) (Samples 140, 216, 223, 224, 257, 353)

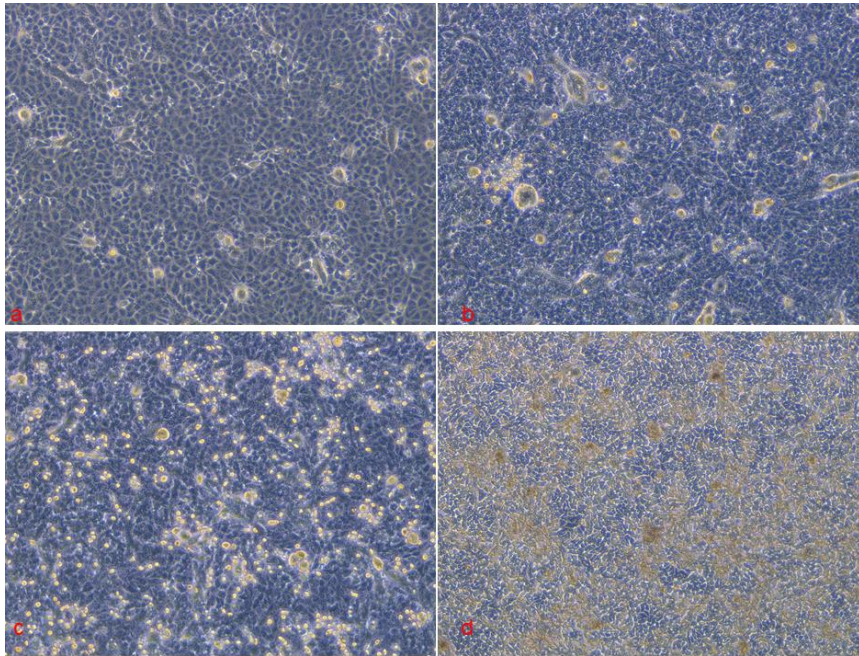


Figura 7.10 Cultură celulară Vero (proba 353), infectată cu omogenat de țânțar la 1 zi (a), 2 zile (b), 3 zile (c) și 6 zile p.i (d), magnificație 10x

Figure 7.10 Vero cell culture, sample 353, infected with mosquito homogenate at 1dpi (a), 2 dpi (b), 3dpi (c) and 6dpi (d), magnification 10x

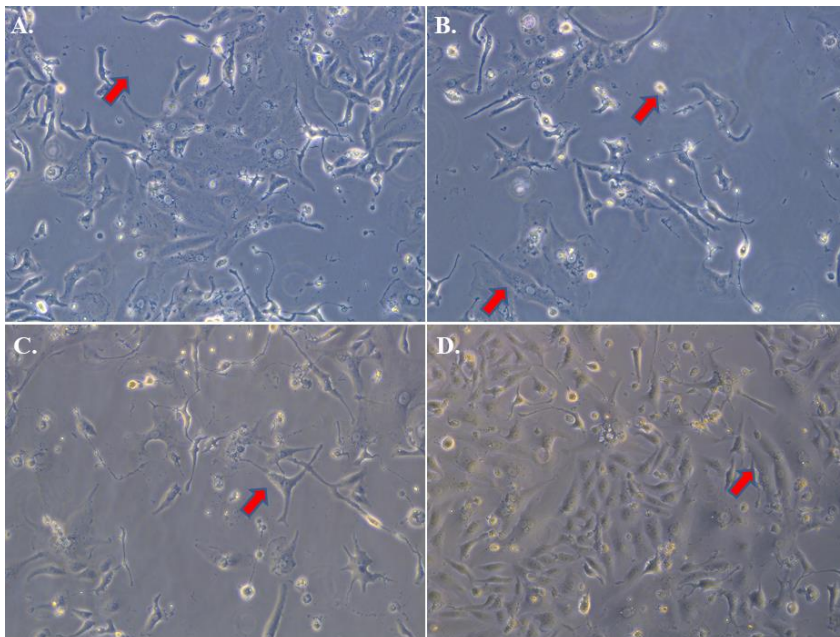


Figura 7.11. Aspecte morfologice ale monostratului de celule Vero, proba 224, la 4 zile p.i, magnificație 5X, proba 224

Figure 7.11. Morphological aspects of Vero cell culture, infected with mosquito homogenate at 4 dpi, magnification 5X, sample 224

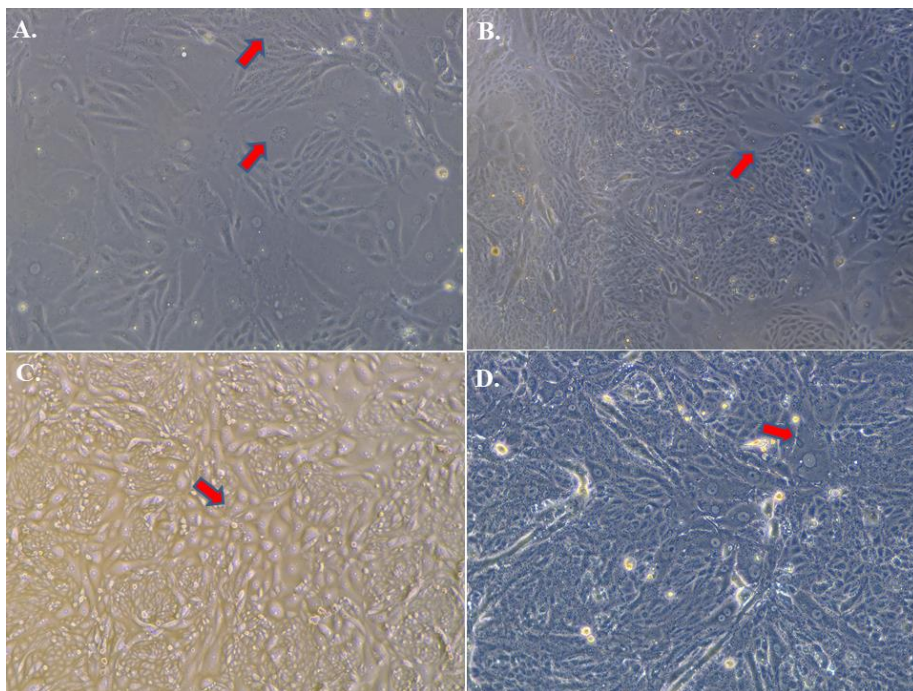


Figura 7.12 Aspecte morfologice ale monostratului de celule Vero, probele 257 (A și B) și 223 (C și D) la 4 zile p.i, magnificație 10X

Figure 7.12 Morphological aspects of Vero cell culture, infected with mosquito homogenate at 4 dpi, magnification 10X, samples 257 (A and B) and 223 (C and D)

Rezultatele PCR-ului în timp real au fost pozitive pentru ambele ținte, la cinci probe, cu media valorilor Ct-ului cuprinsă între 15,36 și 42,33. Doar pentru regiunea ProC a fost identificată o singură probă pozitivă iar pentru regiunea 3'NC au fost evidențiați doi ampliconi pozitivi. Conform protocolului de lucru, pentru probele obținute din supernatant celular, rezultatul se consideră pozitiv dacă valoarea Ct-ului este mai mică decât 45.

Ulterior inoculării virale pe linie celulară de mamifere, s-a realizat primul pasaj pe linia de celule C6/36, cu omogenat de țânțari din teren. La șapte zile post-infecție, supernatantul a fost colectat și testat prin PCR în timp real, ținându-se amplificarea acelorași două regiuni de interes pentru VWN (ProC și 3'NC) în cinci probe iar pentru regiunea (ProC) pentru patru probe.

Din cele nouă probe (omogenat din țânțari) inoculate pe culturi celulare de tip C6/36, una a fost pozitivă ($Ct < 45$) pentru ambele ținte (proba 216) și cinci pentru regiunea ProC, singura regiune pentru care au fost testate (tabelul 7.13).

Tabel 7.12/ Tabel 7.12

Tipul de inocul viral și rezultatele obținute în urma amplificării în timp real

Type of viral inoculum and the real-time PCR results

ID probă	Primul pasaj (P1) pe linia celulară C6/36	Media Ct pentru ținta ProC (P1) (Ct<45)	Media Ct pentru ținta 3'NC (P1) (Ct<45)
28	Omogenat de țânțari	37,93	Nedeterminat
216	Omogenat de țânțari	34,82	32,88
223	Omogenat de țânțari	Nedeterminat	38,74
224	Omogenat de țânțari	Nedeterminat	Nedeterminat
257	Omogenat de țânțari	Nedeterminat	Nedeterminat
129	Omogenat de țânțari	38,4	Netestat
135	Omogenat de țânțari	36,9	Netestat
136	Omogenat de țânțari	33,4	Netestat
316	Omogenat de țânțari	40,9	Netestat

Pe baza rezultatelor obținute în urma testărilor prin PCR în timp real, cel de-al doilea pasaj pe linia de celule C6/36, obținut prin inocularea supernatantului colectat de la de la primul pasaj pe linia Vero, a fost realizat pentru trei probe: 136, 216 și 353.

Prezența replicării virale a fost evidențiată prin apariția modificărilor morfologice celulare într-un flacon din cele trei inoculate. Modificările remarcate la celulele inoculate cu supernatantul de la primul pasaj pe linia C6/36 au fost reprezentate de apariția celulelor individualizate, rotunjite și detașate în supernatantul celular (fig. 7.13).

La o săptămână post infecție, supernatantul a fost colectat pentru evidențierea genomului viral prin PCR în timp real, utilizând ca ținte regiunile 3'NC și ProC ale VWN. Din cele trei probe inoculate, semnale pozitive pentru ambele regiuni de interes au fost detectate în supernatantul celular de la o singură probă, respectiv proba 353 iar la o singură probă semnalul pozitiv a fost detectat în urma amplificării țintei regiunea ProC (tabelul 7.13).

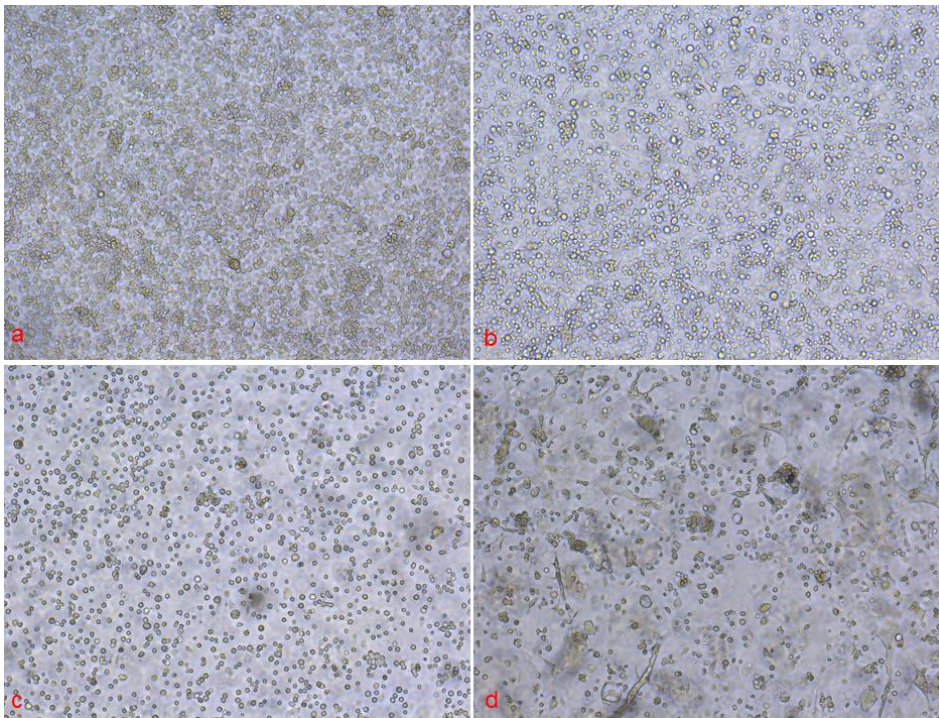


Figura 7.13 Aspectul culturii celulare, linia C6/36, la 5 zile p.i., magnificație 10x (a) celule neinfectate; (b) celule infectate cu omogenatul de țânțari: proba 257 și (c) proba 216 și (d) celule infectate cu supernatant de la celule Vero, proba 353

Figure 7.13. C6/36 cells infected with mosquito homogenate and Vero cells supernatant, at 5 dpi, magnification 10x (a) uninfected cells; (b) sample 257; (c) sample 216; (d) sample 353

Tabel 7.13/ Table 7.13

Tipul de inocul viral pentru al doilea pasaj pe linia C6/36 și rezultatele obținute în urma amplificării în timp real

Type of viral inoculum for the second passage on C6/36 cells and the real-time PCR results

ID probă	Al doilea pasaj (P2) pe linia C6/36	Media Ct pentru ținta 3'NC (P2)	Media Ct pentru ținta ProC (P2)
216	Supernatant celule Vero	Nedeterminat	Nedeterminat
353	Supernatant celule Vero	13,73	15,39
136	Supernatant celule Vero	35,55	Nedeterminat

7.5.2.4 Confirmarea prezenței virusului Sindbis

Încercarea de confirmare a pozitivității pentru singura probă de la care s-au detectat semnale pozitive prin tehnica PCR în timp real microfluid pentru virusul Sindbis (genul *Alphavirus*, familia *Togaviridae*), s-a realizat, ca și în cazul celorlalte probe, prin inocularea omogenatului de țânțari pe culturi celulare renale de maimuță (Vero) și pe culturi celulare derivate din insecte (C6/36).

Interacțiunea dintre inocul: proba 140 (omogenat de țânțari), supernatantul de la culturile celulare Vero infectate cu omogenatul de țânțari din proba 140 și monostratul celular (celule Vero și C6/36), nu a relevat apariția modificărilor morfologice ale celulelor (ECP). Astfel, la 7 zile de la infecție, celulele în monostrat nu au prezentat modificări specifice, cum ar fi aspectul rotunjit, detașarea, citoliza sau individualizarea acestora (fig. 7.14).

Absența efectului citopatic din culturile celulare ne arată o viabilitate virală scăzută, datorită lipsei de propagare și de replicare a virusului în celulele selecționate. Această capacitate replicativă scăzută poate fi pusă pe seama unei denaturări virale sau prezenței unor inhibitori de transcripție sau translație virală.

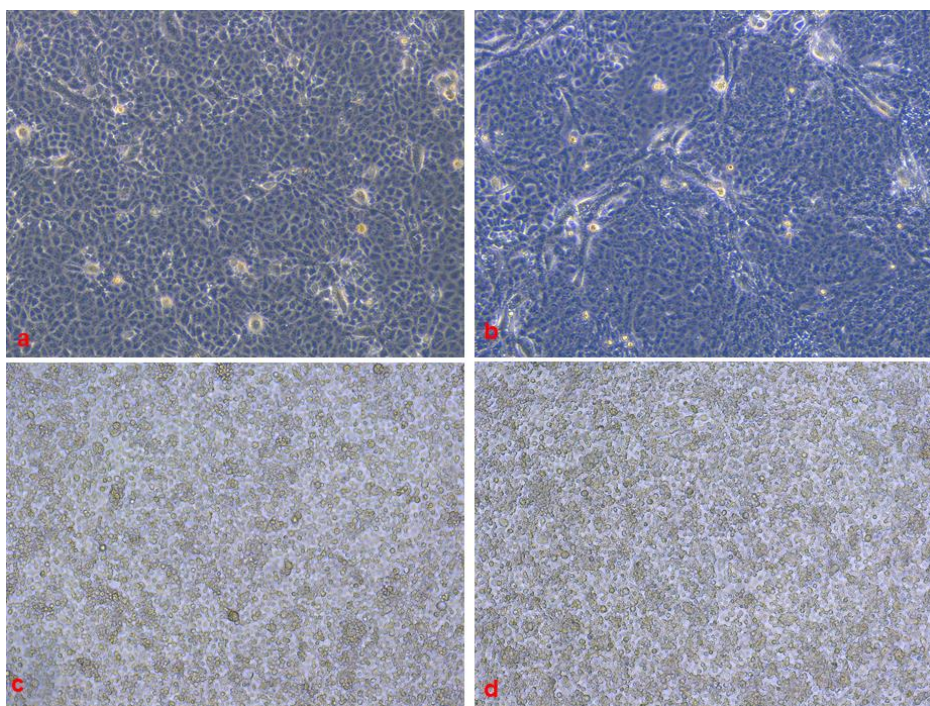


Figura 7.14 Aspectul culturilor celulare infectate cu omogenat de țânțari, magnificație 10x, proba 140. (a) celule linia Vero neinfectate, la 7 zile p.i.; (b) celule Vero infectate, la 7 zile p.i.; (c) celule linia C6/36 neinfectate la 5 zile p.i.; (d) celule linia C6/36 infectate la 5 zile p.i.

Figure 7.14 Vero and C6/36 cells at 5 and 7 days post-infection, sample 140

Amplificarea virală prin PCR convențional, având ca regiune de interes, proteina de înveliș „E” a virusului Sindbis, realizată pentru ARN-ul extras din țânțari, pentru cel din supernatantul celulelor Vero și cel al liniei C6/36, nu a confirmat semnalul pozitiv obținut în urma tehnicii de amplificare inițială prin tehnica PCR în timp real microfluid.

Analiza profilului electroforetic relevă lipsa migrării produșilor de amplificare (proba 140 – omogenat de țânțari, supernatantul de la culturile celulare Vero și

supernatantul de la culturile celulare C6/36) în gel de agaroză de concentrație 1%, la un voltaj de 100V, timp de 20 și 30 minute la (fig. 7.15).

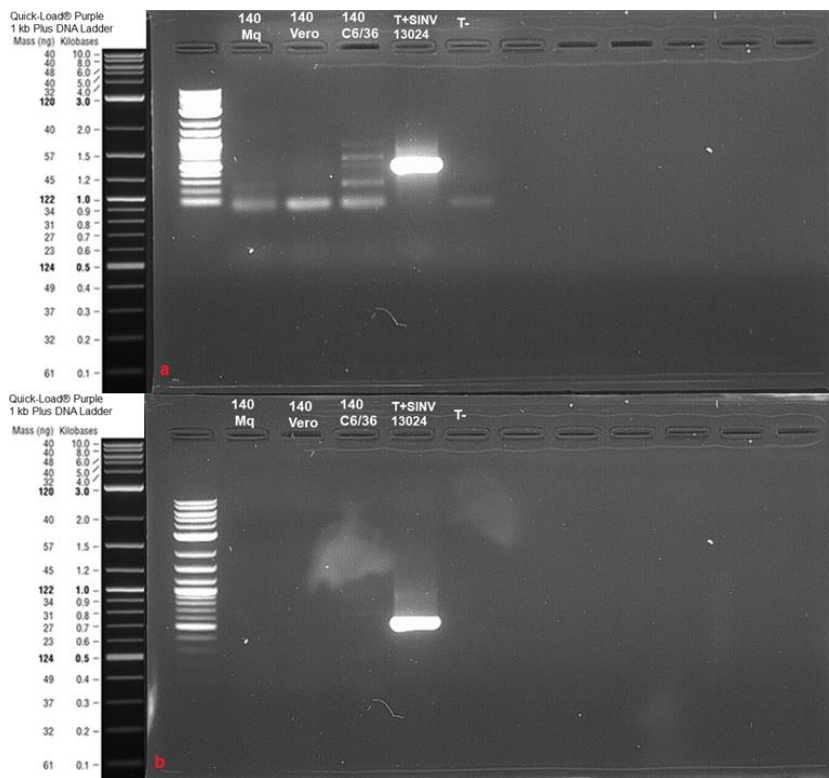


Figura 7.15 Profilul electroforetic al ampliconilor RT-PCR pentru detecția VSIN, la 20 și 30 minute la 100V
Figure 7.15 Electrophoretic profile of RT-PCR amplicons for detection of SINV, at 20 and 30 minutes at 100V

7.5.3 Secvențierea nucleotidelor și analiza filogenetică a VWN

7.5.3.1 Revers transcripție-Pan flavivirus PCR

În vederea obținerii secvenței specifice, extractele ARN din țânțari corespunzătoare probelor pozitive pentru VWN și ARN-ul provenit de la primul pasaj pe celule Vero al unei singure probe (ID probă 353cc), au fost testate prin Pan-flavivirus PCR (ID probe: 129, 135, 136, 216, 223, 224, 257, 316, 353mq), având ca regiune de interes proteina nestructurală 5 (NS5) a genomului VWN.

Astfel, migrarea produșilor de amplificare în gel de agaroză denotă o amplificare redusă pentru probele 257 și 129 (667 pb), în timp ce pentru proba 353cc produsul de amplificare a avut o dimensiune de 1003 pb (fig. 7.16).

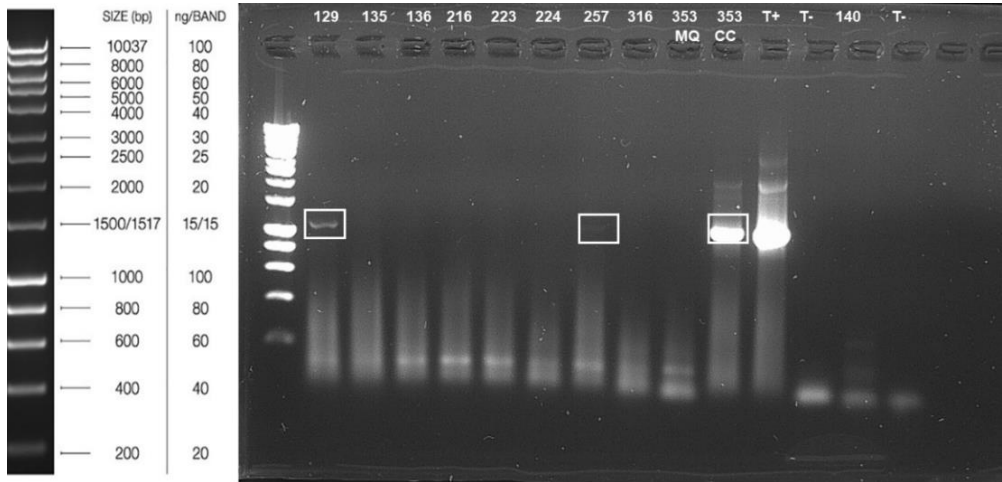


Figura 7.16 Profilul electroforetic al produșilor RT-PCR
Figure 7.16 Electrophoretic profile of RT-PCR products

7.5.3.2 Analiza filogenetică a izolatelor obținute

Din trei produși supuși amplificării prin PCR Pan-flavivirus au putut fi obținute două secvențe pentru izolatele 129 și 353cc. Analiza bioinformatică a fragmentelor de 667 și 1003 pb în serverul BLAST a indicat că izolatele aparțin VWN, linia genetică 2.

Pe baza secvențierii parțiale, a fost construit un arbore filogenetic ce a demonstrat apartenența izolatelor din probele 129 și 353cc, provenite din *pool*-uri de *Cx. pipiens* colectate la fondul de vânătoare pe data pe 14 septembrie 2018 și pe 11 august 2019, la linia genetică 2 a VWN (fig. 7.17).

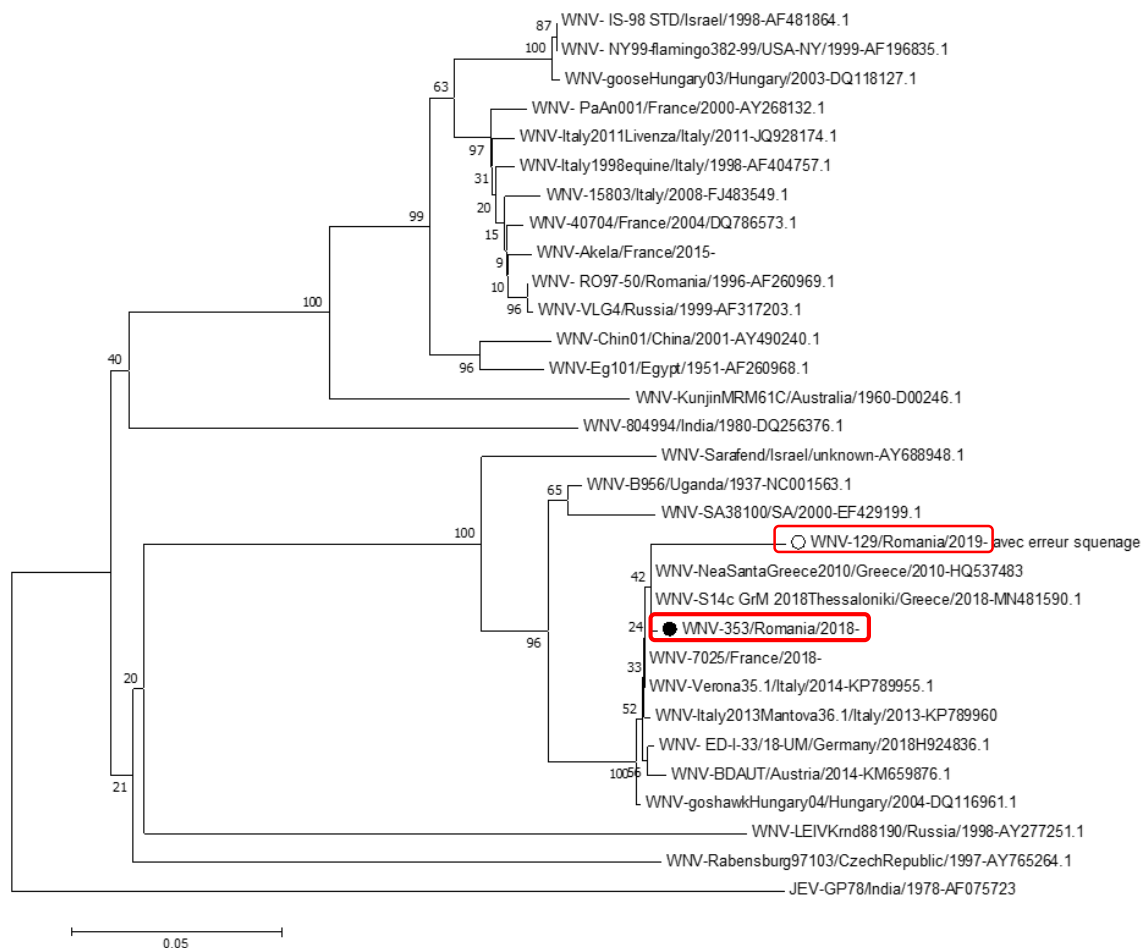


Figura 7.17 Arbore filogenetic generat prin alinierea secvențelor obținute cu cele omoloage din baza de date GenBank (tulpinile VWN obținute în acest studiu sunt evidențiate prin buline: alb și negru)

Figure 7.17 Phylogenetic tree based on the alignment of the generated sequences with the best hits to our sequences in GenBank (the mosquitoes WNV strains obtained in our study are highlighted through dark and white dots)

În ultimul deceniu, în România, dinamica infecției cu VWN a cunoscut atât o creștere a numărului de cazuri umane cât și o expansiune la nivel teritorial. Astfel, conform raportărilor Centrului European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (ECDC, 2019), în România infecția cu virusul West Nile a prezentat o evoluție fluctuantă, cu vârful incidenței în anul 2018, când au fost înregistrate 277 cazuri. Dinamica și persistența endemicității acestui virus evidențiază necesitatea conștientizării populației umane în ceea ce privește riscurile expunerii la infecția cu mobovirusuri.

Prin utilizarea combinată a două metode de identificare a țânțarilor capturați pe baza caracterelor morfologice, studiul nostru confirmă 11 din cele 55 specii de țânțari recunoscute anterior ca fiind native pentru România (Nicolescu, 1995; Nicolescu ș.a., 2002;

Nicolescu ș.a 2003; Nicolescu ș.a 2003a; Nicolescu ș.a 2003b; Păstrav ș.a 2020), neincluzând două subfamiliile descoperite ulterior, *An. algeriensis*, *Ae. hungaricus* (Török ș.a., 2016) și o specie invazivă aedină, *Ae. albopictus* (Prioteasa ș.a., 2015; Bellini ș.a 2020). Din cele 11 specii colectate, două specii sunt clasificate ca vectori principali pentru VWN și VUSU (*Cx. pipiens* și *Cx. modestus*) (Zannoli și Sambri 2019), în timp ce *Ae. vexans* poate avea un rol important în transmiterea VWN (Tiawsirisup ș.a., 2008) și este vector competent pentru virusul febrei Văii Rift (Ndiaye ș.a., 2016).

Raportat la diversitatea speciilor prezente în cadrul studiului nostru, taxonul dominant a fost reprezentat de specia *Aedes vexans* (46 %), urmată de specia culicină, *Culex pipiens* s.l (30,7%).

Luând în considerare faptul că specia *Ae. vexans* a fost foarte abundentă în timpul lunilor de vară, rezultatul nostru este în conformitate cu literatura de specialitate, conform căreia temperatura optimă de dezvoltare este 30° C. Importanța medicală a acestei specii rezidă în portajul multor arbovirusuri și în capacitatea de transmitere a unor virusuri precum Tahyna (Becker ș.a., 2010), Febra Văii Rift (Birnberg ș.a., 2019) și Zika (O'Donnell ș.a., 2017) în timp ce comportamentul alimentar generalist mamalofilic, atât pe oameni cât și pe animale domestice, reprezintă un inconvenient considerabil (Becker ș.a., 2010).

Versatilitatea comportamentului alimentar al celor două bioforme (*pipiens* și *modestus*) aparținând celei de-a doua cea mai abundentă specie (*Cx. pipiens* s.l , n = 5169 specimene), subliniază importanța majoră pe care o are în vehicularea diferitelor arbovirusuri, precum: virusul Batai, Chickungunya, Dengue, Inkoo, Lednice, Sindbis, Snowshoe hare, Tahyna și nu în ultimul rând virusurile West Nile și Usutu (Brugman ș.a., 2018).

În ceea ce privește diversitatea specimenelor în funcție de punctele de colectare, cea mai mare diversitate de țânțari a fost remarcată la fondul de vânătoare - biotop natural, respectiv șase specii plus un gen și la herghelia din județul Tulcea, unde au fost identificate patru specii și un gen. Pentru ambele locuri, cele mai abundente specii au fost țânțarul de apă, *Ae. vexans* (45,74 % la fondul de vânătoare și 46,66 % la herghelie) și *Cx. pipiens* s.l (34,39 % la fondul de vânătoare și 46,66 % la herghelie).

Utilizarea tehnicii de amplificare în timp real microfluid a urmărit detecția pe scară largă a unui număr mare de agenți virali cu potențial patogen pentru om și animale.

Sistemul BioMark™ *dynamic array*, folosit în vederea realizării detecției virale pentru cele șase specii colectate din județele Iași și Tulcea, a permis detecția semnalelor pozitive pentru două arbovirusuri cu importanță medicală pentru oameni, unul dintre ele semnalat pentru prima dată în România (VSIN).

Utilizând tehnici de biologie moleculară pe *pool*-urile monospecifice de țânțari colectați, virusul epornitic cu caracter zoonotic, West Nile, a fost depistat în trei specii de țânțari: *Culex pipiens* s.l, *Culex modestus* și *Aedes vexans*.

Pentru cele trei specii pentru care s-au detectat semnale pozitive, a fost calculată rata minimă a infecției (MIR). Rezultatele studiului au indicat faptul că rata minimă a

infecției a fost cea mai ridicată pentru specia *Cx pipiens* s.l, colectată în județul Iași, în sezonul 2018 (MIR = 3,54).

Predicția valorilor MIR a fost urmărită și într-un studiu din 2001, (Bernard ș.a., 2001), unde s-a obținut o valoare apropiată pentru *Cx. pipiens* s.l (3,53), în timp ce valori superioare celei obținute în cadrul studiului nostru (3,54) au fost obținute în cadrul unui alt studiu, derulat de Kulasekera ș.a., 2001 (8-14).

Valoarea crescută a ratei de infecție țânțari, pentru județul Iași, din anul 2018, este direct corelată cu numărul de cazuri de infecție cu VWN la om din anul 2018 (n = 26). Pentru anul 2019, s-a constatat o valoare MIR mai redusă la *Cx. pipiens* s.l (0,77), în timp ce prevalența infecției la *Cx. modestus* este mai crescută (1,81). Valorile mai mici obținute în urma calculării prevalenței infecției în țânțarii colectați în anul 2019, sunt corelate direct cu prevalența infecției la oameni din același an (n = 4), din județul Iași.

Rata minimă a infecției țânțarilor contribuie la evaluarea activității virale și la anticiparea riscurilor de infecție la oameni și alte specii de animale. O valoare crescută a MIR este adesea asociată unui risc crescut de transmitere a virusului la oameni. De asemenea, conform Centrului pentru controlul și prevenirea bolilor (CDC), MIR este un indicator important în acțiunile de monitorizare pentru VWN și pentru anticiparea paternului activității virale și a cazurilor umane dintr-o anumită zonă. Prin urmare, predicția MIR este o prioritate de sănătate publică în zonele endemice pentru WNV (Chakraborty și Smith, 2019).

Investigațiile *in vitro*, prin inocularea pe culturi celulare foarte permissive infecției cu VWN (Vero și C6/36), au dus la eliberarea unui număr mare de copii de ARN în supernatantul celular, ceea ce a indicat o replicare virală intensă. Prezența virusului a fost exprimată prin apariția efectului citopatic specific în culturile celulare, pentru ca ulterior, prin reacția de polimerizare în lanț clasică și secvențiere, prezența virusului să fie confirmată în două probe (129 și 353cc).

Primul izolat a provenit dintr-un *pool* de țânțari din specia *Culex pipiens* s.l capturați pe 14 septembrie 2018, la fondul de vânătoare. Anul de proveniență al probei este totodată anul în care, în multe țări din Uniunea Europeană, cazurile de infecție cu VWN a crescut exponențial, numărul de cazuri umane depășind numărul total de cazuri din ultimii șapte ani. La finalul sezonului de transmitere au fost detectate 2083 de infecții cu VWN în Europa, cele mai multe cazuri fiind raportate în Italia și în trei țări balcanice: Serbia, Grecia și România (Christova ș.a., 2020)

Secvențierea parțială a genomului, având ca țintă gena NS5, a evidențiat faptul că izolatul aparține liniei genetice 2. Această tulpină este prezentă în zone unde cazurile umane sunt raportate anual iar seroconversia specifică VWN a fost depistată la cai (Ludu Oslobanu ș.a., 2014) și câini (Crivei ș.a., 2018). Rezultatele noastre sunt în concordanță cu cele obținute de către alți autori în anii anteriori, atât în ceea ce privește principalul vector implicat în transmitere cât și linia genetică depistată (Papa ș.a., 2020).

În Europa, linia genetică 2 a VWN a fost detectată prima dată în Ungaria, în anul 2004, prin descrierea ramurei central Europeană/Ungară și ulterior în 2007, în Rusia, a ramurei est-Europeană/Rusă, această linie, și în special ramura Ungară, predominând momentan pe continent (Christova ș.a., 2020). În Ungaria, linia 2 a fost detectată ca urmare a izolării virale dintr-o probă de creier de la un uliu (*Accipiter gentilis*). Monitorizările și testările efectuate pe păsările de pradă consecutiv primei detecții, în intervalul 2004-2009, au condus la izolarea repetată a virusului în această țară. Până în anul 2013, aceeași linie virală a fost izolată și în alte țări din Europa, precum Rusia, Austria, Serbia, România, Grecia și Italia (Hernández-Triana ș.a., 2014).

Analiza filogenetică din cadrul studiului nostru a relevat că tulpinile VWN identificate la țânțarii din România sunt înrudite genetic cu tulpini umane, animale și de la țânțari din Europa. Cele două izolate de la țânțari prezintă o identitate la nivel de nucleotide ridicată în raport cu tulpini VWN umane izolate de la cazuri de import.

Astfel, în funcție de procentul de similitudine al secvențelor nucleotidelor, izolatul 353cc, din cadrul studiului nostru, prezintă un grad de înrudire genetică de 99.8% (număr de acces GenBank: MN966983.1) cu un izolat din Spania, detectat în urina unui pacient în anul 2018. Izolatul respectiv, a fost obținut de la un pacient român în vârstă de 60 de ani, depistat pozitiv prin PCR pentru VWN la întorcerea din țară, din municipiul Adjud (Velasco ș.a., 2020).

De asemenea, tulpinile noastre au prezentat un grad ridicat de înrudire genetică și cu un izolat de la un pacient de 83 de ani, din Belgia (număr de acces GenBank: MH021189.1). Strânsa înrudire cu tulpinile din Ungaria și din alte țări balcanice a concluzionat faptul că pacientul a dobândit infecția în Ungaria, fiind vorba despre un caz de import (Wollants ș.a., 2018).

Izolatele menționate prezintă același grad de înrudire și cu tulpina izolată în Grecia în 2011 (număr de acces GenBank: MN481596.1). În contrast cu fenomenele din Ungaria, epidemia din Grecia din anul 2010, cu 262 de cazuri clinice, a fost mult mai severă, virusul fiind detectat în partea de nord a țării (Thessaloniki). Cazurile umane au debutat la începutul lunii iulie, vârful epidemiei a fost raportat la jumătatea lunii august, în timp ce la finele lunii octombrie a fost confirmat ultimul caz uman (Danis ș.a., 2011). Aceeași tulpină virală a fost identificată în țânțarii din specia *Cx. Pipiens* din Nea Santa (Grecia), locul de proveniență al primului caz de encefalită cu VWN (Patsoula ș.a., 2016), de la păsările sălbatice (G. Valiakos ș.a., 2011) și de la donatorii de sânge (Papa ș.a., 2012) în timpul sezoanelor de transmitere (iunie-octombrie) din anii 2010 și 2011.

În ceea ce privește înrudirea cu izolate de la animale, tulpina din cadrul studiului nostru prezintă un grad de similitudine nucleotidică de 99.8 % cu un izolat de la uliu din Austria. Izolatul obținut în cadrul studiului respectiv prezintă un grad de omologie de 99,77% cu izolatele din Ungaria (Wodak ș.a., 2011).

În Italia, linia 2 a fost izolată, în 2011, inițial din urina unui pacient febril, pentru ca ulterior să fie izolată și din alte probe biologice. Analiza filogenetică a izolatelor virale a

demonstrat o înruditare strânsă cu tulpinile implicate în focarele umane din Grecia și Ungaria (Magurano ș.a., 2012). Sușa virală a mai fost izolată și din *pool*-uri de țânțari din specia *Cx. pipiens* precum și de la guguștiuci (*Streptopelia decaocto*), în zone unde linia 1 era endemică din anul 2008. Caracterizarea, încadrarea filogenetică și compararea secvențelor genelor NS3 și NS5 au prezentat o similitudine de 100% și 99% cu aceleași gene obținute de la păsările de pradă din Ungaria (Savini ș.a., 2012).

Referitor la izolatul 129 din studiul nostru, acesta prezintă un grad de similitudine de 96,27% cu linia genetică 2, izolatul Thessaloniki_MC139m/2018 din Grecia, din 2018 (număr de acces GenBank: MN480794.1) și de 96,12% cu tulpina (linia genetică 2) izolată în Spania (număr de acces GenBank: MN966983.1).

Compararea secvențelor de nucleotide ale celor două izolate din Iași (129 și 353cc) în cadrul studiului nostru evidențiază un procent de similaritate nucleotidică de 64%. Procentul de similaritate dintre secvențele obținute în cadrul studiului, reprezintă o cuantificare a legăturii dintre cele două secvențe și denotă faptul că acestea prezintă origini comune și au evoluat dintr-o sușă comună (Heringa J., 2008). Argumentul este susținut de proveniența comună a celor două izolate (fond de vânătoare) și de specia de la care au fost izolate (*Cx.pipiens* s.l.).

În România, prima raportare a acestei linii genetice a fost făcută în anul 2010, an asociat celei de-a doua epidemii de ampoare și schimbării profilului genetic, respectiv înlocuirea liniei genetice 1 cu linia 2, o linie neuroinvasivă (Sribu ș.a., 2011).

Tot în țara noastră, linia genetică 2 a mai fost detectată în intervalul 2011-2015, în partea de sud-est, prin secvențierea parțială a genomului - regiunea NS5. Analiza filogenetică a relevat faptul că virusul circulant era foarte similar liniei 2 izolate în anul 2007 în Volgograd, Rusia. Astfel, în anul 2011, izolate asemănătoare tulpinii Volgograd 2007 au fost detectate în *pool*-uri de *Cx. pipiens* colectate în Delta Dunării. În următorii doi ani, în aceeași regiune, același izolat a fost găsit în speciile *Cx. pipiens* s.l, *Cx. modestus* și *An. hyrcanus* (2012) precum și în *Cx. pipiens* și *Coquillettidia richiardii* în anul 2013 (Dinu ș.a., 2015). În anul 2015, o tulpină asemănătoare cu Volgograd 2007 a fost depistată co-circulând în populațiile de țânțari cu altă tulpină înrudită cu grupul Nea Santa 2010. În următorul an, în populațiile de țânțari testate din București și Delta Dunării, a fost depistată doar cea din urmă tulpină (linia genetică 2 – Nea Santa), care a fost detectată inclusiv într-o probă de sânge colectată de la un donator (Cotar ș.a., 2018).

Amplificarea regiunii NS5 - proteina nestructurală, funcțională - are importanță prin prisma rolului acesteia în translație și sinteza ARN-ului viral. NS5 este cea mai mare proteină din structura genomului (are o lungime de aproximativ 900 de aminioacizi), fiind conservată (Laurent-Rolle ș.a., 2010). Flavivirusurile codifică o metiltransferază (MT) virală, la capătul N-terminal al NS5, cu scopul de a cataliza metilarea atât a guaninei N-7 și a ribozei 2'-OH, în timpul replicării virale (Zhou ș.a., 2007) și ARN polimerază (RdRp), la capătul terminal al regiunii C a proteinei nestructurale. De asemenea, NS5 are un puternic efect antagonist asupra producției de IFN (Laurent-Rolle ș.a., 2010).

Cel de-al doilea arbovirus detectat în cadrul studiului nostru, virusul Sinbis, este încadrat în familia *Togaviridae*, acesta determinând la oameni apariția unui sindrom febril asociat cu dureri articulare și erupții cutanate (Kurkela ș.a., 2008). Deși, într-un studiu condus de Lundström ș.a., 2019, s-a concluzionat că perioada de timp cuprinsă între jumătatea lunii iulie și sfârșitul lunii septembrie este intervalul cu activitatea virală cea mai intensă în Europa, în cazul nostru semnalul pozitiv provine dintr-o probă colectată pe 14 iunie 2018. Detecția virală la începutul verii poate fi o consecință a iernării virusului prin supraviețuirea femelelor adulte infectate de la un an la altul.

Numărul de probe pozitive provenite din *pool*-uri de țânțari colectați în trei locații cu faună abundentă și zone umede (fondul de vânătoare, zona de agrement, herghelia) poate reflecta potențialele căi de pătrundere a diferitelor arbovirusuri pe traseul zonelor de acces pentru păsările migratoare, migrația fiind considerată unul dintre principalele mecanisme de expansiune a VWN (Hernández-Triana ș.a., 2014). Ipoteza este susținută de faptul că zona Tulcea reprezintă o secțiune a culoarului de migrare Eurasian-est-African, ce are rolul de zonă de tranzit pentru păsările migratoare ce traversează zona de est a României sau Moldova, în drumul lor către Bosfor (Fülöp ș.a., 2018), în timp ce județul Iași, cu lunca Prutului, reprezintă una din cele cinci locații principale din România unde păsările staționează în cursul migrării. Aceste zone sunt totodată asociate cu o densitate crescută a populațiilor de țânțari, în special cei din complexul *Culex pipiens*.

Studiul nostru subliniază importanța speciei de țânțari *Cx. pipiens* s.l., ca specie competentă pentru transmiterea VWN în România. Deși au existat semnale pozitive și de la alte două specii (*Aedes vexans* și *Culex modestus*), cel mai important vector implicat în ambele cicluri de transmitere virală, silvatic și urban, este reprezentat de *Cx. pipiens* s.l. (Tomazatos ș.a., 2019).

Exceptând o singură probă ce a fost colectată în luna iunie, restul probelor pozitive au provenit din *pool*-uri colectate în a doua jumătate a verii, respectiv din luna iulie până în septembrie, perioadă cu intensă activitate virală în Europa (Scheuch ș.a., 2018b). În cadrul studiului nostru, prezența VWN a fost detectată în *pool*-uri din perioada menționată (9 iulie 2019) iar în anul precedent prima probă pozitivă a fost colectată pe 19 august. Detecția virală pentru anul 2019 a precedat raportarea primului caz uman (15 iulie), în timp ce pentru anul 2018 raportarea primului caz uman a fost anterioară detecției virale (13 iulie 2018).

Gradul relativ ridicat al pozitivității pentru VWN în *pool*-uri-le de țânțari, corelat cu prevalența anuală crescută la oameni, subliniază necesitatea și importanța programelor de supraveghere și a strategiilor de control a vectorilor, ce ar putea permite detecția rapidă și timpurie a virusurilor cu potențial patogen, înaintea apariției primelor cazuri clinice la oameni. De asemenea, luând în considerare schimbările climatice majore, ce favorizează abundența și diversitatea speciilor de țânțari, precum și diseminarea rapidă și atipică a vectorilor prin intermediul transporturilor și a implicării umane, un program de supraveghere este necesar pentru determinarea diversității speciilor, a abundenței sezoniere

precum și a expansiunii speciei invazive *Ae. albopictus*, deja stabilită în România (Prioteasa ș.a.,2015).

7.6 Concluzii parțiale

7.6 Partial conclusions

1. Investigațiile entomologice desfășurate în șapte puncte de colectare din două județe din partea de est a României au relevat faptul că, între cele **11 specii autohtone identificate**, taxonul dominant a fost reprezentat de specia ***Aedes vexans*** (46 %), urmată de specia ***Culex pipiens s.l*** (30,7%). Având în vedere faptul că specia *Ae. vexans* a fost prezentă și foarte abundentă în timpul lunilor de vară, afirmăm că rezultatul nostru este în conformitate cu literatura de specialitate.
2. În urma testării prin tehnica PCR în timp real microfluid a 365 de *pool*-uri monospecifice, în 11 dintre ele au fost detectate semnale pozitive pentru două arbovirusuri cu importanță medicală pentru oameni: **West Nile**, în zece probe și virusul **Sindbis (VSIN)**, într-un singur *pool*.
3. Testarea unui număr considerabil de probe prin **PCR în timp real microfluid** în cadrul sistemului BioMark real-time PCR subliniază utilitatea și importanța unei astfel de tehnici pentru realizarea detecției rapide și precoce a agenților patogenilor din vectori, unul dintre aceștia fiind astfel **semnalat pentru prima dată în România (VSIN)**.
4. Utilizând tehnicile de biologie moleculară pe *pool*-urile monospecifice de țânțari colectați, virusul epornitic cu caracter zoonotic, **West Nile**, a fost depistat în **trei specii de țânțari: *Culex pipiens s.l*, *Culex modestus* și *Aedes vexans***.
5. Studiul nostru subliniază importanța speciei de țânțari ***Cx. pipiens s.l.***, ca **specie competentă** pentru difuzarea VWN în România, în ambele cicluri de transmitere virală, silvatic și urban.
6. Ulterior amplificării prin tehnica PCR în timp real microfluid, probele la care s-au observat semnale pozitive au fost testate pentru confirmarea VWN prin **TaqMan PCR în timp real**. Confirmarea pozitivității rezultatelor moleculare a fost urmată de izolarea și propagarea *in vitro* a virusului pe culturi celulare de mamifere și culturi celulare derivate din insecte.
7. Utilizând tehnicile de biologie moleculară și cultivare *in vitro*, prin studiul nostru s-a reușit **detecția, izolarea și caracterizarea virusului West Nile**, un agent patogen de o deosebită importanță medicală prin prisma incidenței crescute dar și a tendiței expansive la nivel geografic.
8. **Secvențierea parțială** a genomului, având ca **țintă gena NS5**, a evidențiat faptul că izolatul aparține liniei genetice 2, din trei produși supuși amplificării prin PCR Pan-flavivirus fiind obținute două secvențe. Analiza bioinformatică a fragmentelor de 667 și 1003 pb în serverul BLAST a indicat că **izolatele aparțin VWN, linia genetică 2**. Pe baza secvențierii parțiale, a fost construit un **arbore filogenetic**.

9. Rezultatele noastre sunt în **concordanță** cu cele obținute de către alți autori în anii anteriori, atât în ceea ce privește principalul vector implicat în transmitere cât și linia genetică depistată.
10. Rezultatele obținute în cadrul studiului nostru **confirmă intensă circulație a VWN** în populația de țânțari din zone peri-urbane din județele Iași și Tulcea. Vârful circulației virale a fost observat în lunile iulie și august.
11. Dinamica și persistența endemicității acestui virus evidențiază **necesitatea conștientizării populației umane** în ceea ce privește riscurile expunerii la infecția cu mobovirusuri.
12. Amplificarea virală prin PCR clasic pentru ARN-ul extras din țânțari, pentru cel din supernatantul celulelor Vero și cel al liniei C6/36, ținând ca regiune de interes proteina de înveliș „E” a **virusului Sindbis, nu a confirmat** semnalul pozitiv obținut în urma testării inițiale prin tehnica PCR în timp real microfluid.
13. Acesta este **primul studiu** întreprins în țara noastră în care s-au detectat semnale moleculare **pentru virusul Sindbis**. Confirmarea prezenței VSIN în România este importantă, ținând cont că acesta este un agent patogen cu implicații în sănătatea publică.
14. **Analiza filogenetică** din cadrul studiului nostru a relevat că tulpinile VWN identificate la țânțarii din România sunt **înrudite genetic** cu tulpini umane, animale și de la țânțari din Europa.
15. Gradul relativ ridicat al pozitivității pentru VWN în *pool*-uri-le de țânțari cercetate de noi, corelat cu prevalența anuală crescută la oameni, subliniază necesitatea și importanța **programelor de supraveghere** a virusurilor și a **strategiilor de control** a vectorilor, ce ar putea permite detecția rapidă și timpurie a cu potențial patogen, înaintea apariției primelor cazuri clinice la oameni.

CAPITOLUL VIII

CONCLUZII FINALE

Ca urmare a cercetărilor întreprinse asupra infecțiilor de natură virală transmise prin intermediul țânțarilor la animale și oameni în zona de est a României, se pot reține următoarele concluzii finale:

1. Investigațiile desfășurate în cadrul tezei de doctorat au estimat **prevalența, gradul de difuzare, transmisibilitatea și circulația unor arbovirusuri** în zona de est a României, ținând cont de cele trei verigi implicate în vehicularea acestora: vectori, gazde incidentale și gazde amplificatoare.
2. **Infecția cu VWN este endemică în România**, evoluția acesteia cunoscând o expansiune în timp și la nivel teritorial, întreținerea focalității fiind susținută prin particularitățile ecologice ale teritoriului, abundența vectorilor competenți și a gazdelor amplificatoare.
3. Rezultatele obținute de noi în cadrul anchetelor sero-epidemiologice prin utilizarea a două tehnici de serologie: **ELISA** și **seroneutralizarea**, o confirmă pe cea din urmă ca fiind metoda de detecție *gold-standard* și o recomandăm a fi utilizată pentru eliminarea răspunsurilor fals-pozitive datorate reacțiilor serologice încrucișate cu alte flavivirusuri.
4. Prin utilizarea celor două tehnici serologice, au fost testate probe de ser provenite de la cai din trei județe din partea de est a României: Iași, Vaslui și Tulcea. Anticorpi specifici pentru VWN au fost detectați la 38,4% (136/354) din caii testați, semnale serologice fiind prezente în toate cele trei județe analizate, cu cea mai ridicată valoare a prevalenței anticorpilor observată în județul Iași (19,5%), unde circulația virală este confirmată anual prin cazuri de infecție la oameni.
5. Ca urmare a testării probelor de la cai prin două tehnici serologice (ELISA și MNT) și pentru trei virusuri cu apartenență la aceeași familie (West Nile, Usutu și virusul encefalitei de căpușă), în cadrul studiului nostru **nu s-a putut demonstra** prezența anticorpilor specifici împotriva virusurilor **Usutu și encefalitei de căpușă**.
6. Profilul serologic al cailor privind infecția cu VWN poate fi considerat un **indicator al circulației virale** și al potențialului de risc pentru oameni din zonele rurale. Circulația virusului în populația de cai din aceste zone este o consecință a ecosistemelor antropizate ce întrețin populațiile de vectori.
7. Testarea serologică privind infecția cu VWN la păsări migratoare și rezidente din Rezervația Biosferei Delta Dunării, a relevat o prevalență a anticorpilor de 11,8%. Seroprevalența astfel constatată confirmă atât **persistența virală** cât și **dispersia virusului** prin intermediul păsărilor migratoare.

8. Ancheta serologică de prevalență a flavivirusurilor circulante la câini, care a constatat în testarea a 363 de câini din padocuri, clinici și gospodării din șase județe din partea de est a României, a relevat o seroprevalență cumulată a **VNW** de 36,1%, ceea ce evidențiază **amploua distribuției** la nivel geografic a acestei infecții, **inclusiv în populațiile de câini**.
9. Valoarea crescută a seropozitivității la **câini**, denotă faptul că această specie poate servi ca **santinelă** pentru monitorizarea activității flavivirusurilor, putându-se stabili astfel potențialul de risc al infecției cu arbovirusuri la oameni și făcând posibilă și mai facilă detecția precoce a circulației virale.
10. Rezultatele obținute în urma testării pentru prezența anticorpilor specifici anti-VUSU la câini au demonstrat atât **co-infecția cu VWN** dar mai ales **infecția unică** cu virusul **Usutu**. Aceasta este **prima raportare** serologică a infecției cu virusul Usutu la animale în partea de est a României.
11. Comparând rezultatele utilizării a două *kit-uri* serologice (Ingezim WNV Compaq și ID Screen WNV Competition) pentru detecția anticorpilor specifici (IgG) dirijați împotriva VWN, prin retestarea probelor rezultate pozitive ($n = 86$) în prima etapă a investigației, s-a constatat o **corelare de 100%** între rezultatele obținute în urma testării probelor utilizând două *kit-uri* comerciale de detecție.
12. Analiza serologică desfășurată pe o cohortă de 176 de pacienți, utilizând tehnica imunoenzimatică ELISA pentru detecția anticorpilor specifici (IgG) pentru **VWN**, a condus la constatarea unei prevalențe a infecției de 3,4% în populația testată și la categoriile luate în studiu, ceea ce denotă **caracterul silențios** și o circulație virală fără exprimări clinice.
13. Depistarea infecției cu VWN în rândul pacienților umani asimptomatici evidențiază necesitatea implementării unui **sistem de prevenire și supraveghere** desfășurat în centrele de donare a sângelui.
14. Cercetările efectuate în direcția identificării unei corelații pozitive între comorbidități pre-existente în rândul populației asimptomatice și seroconversia specifică, nu au avut rezultatul anticipat. Deși corelația nu a fost confirmată, susținem abordarea unei strategii de recoltare a probelor de la pacienți selectați aleatoriu, fără criterii discriminatorii privitoare la alte comorbidități, în cadrul unui **studiu epidemiologic longitudinal** mai complex, sub egida concepului „*One health*”.
15. În urma testării a 88 de probe de la pacienți asimptomatici, în vederea identificării semnalelor serologice (IgG) pentru infecția cu virusul **Usutu**, **nu s-a putut confirma** circulația acestuia în rândul populației **umane** incluse în studiu.
16. Investigațiile entomologice desfășurate în două județe din zona de est a României au condus la identificarea a **11 specii indigene** de țânțari. Dintre aceștia, un grad ridicat al abundenței a fost remarcat la speciile competente pentru virusuri precum: Tahyna, Zika sau West Nile (*Aedes vexans*, *Culex pipiens* s.l. și *Culex modestus*).
17. Detecția unui număr considerabil de agenți patogeni prin tehnica PCR în timp real microfluid, în cadrul **sistemului BioMark real-time PCR**, poate sta la baza unui sistem de supraveghere preliminară a agenților patogeni cu transmitere vectorială.

18. **Supravegherea** constantă a **vectorilor și a speciilor cu rol de santinelă**, în cadrul unei strategii de monitorizare a infecției cu VWN la oameni și la alte specii de animale, reprezintă **aspecte critice pentru sănătatea publică**. De asemenea, calcularea prevalenței ratei de infecție la țânțari (**MIR**), reprezintă un indicator sigur în vederea **stabilirii riscului de infecție la oameni**.

19. Confirmarea prezenței virusului **Sindbis** în România este o premisă a studiilor ulterioare, ținând cont de faptul că acest virus are o importanță deosebită pentru sănătatea omului.

20. Caracterizarea celor două izolate virale (129 și 353cc) obținute de la țânțari relevă apartenența acestora la **linia genetică 2 a VWN**, fiind înrudite cu tulpini virale izolate de la pacienți umani și de la păsări din Europa.

21. Rezultatele obținute în acest studiu au condus la stabilirea unor **zone de risc** pentru infecțiile cu **VWN și Sindbis** și au generat informații cu privire la distribuția acestor agenți patogeni în județul Iași.

22. Caracterul de noutate al prezentei lucrări este susținut de prima semnalare a prezenței virusului **Sindbis** (VSB), detectat prin biologie moleculară în populațiile de țânțari din estul țării și de semnalele serologice specifice anti-**Usutu** (VUSU) obținute ca urmare a testării câinilor prin tehnica de seroneutralizare.

CHAPTER VIII

FINAL CONCLUSIONS

Following the research undertaken on viral infections transmitted by mosquitoes to animals and humans in the eastern part of Romania, the following conclusions can be drawn:

1. The investigations underwent in the frame of the PhD thesis estimated the **prevalence, the degree of propagation, the transmissibility and the circulation of some arboviruses** in the eastern part of Romania, considering the three links involved in their circulation: vectors, incidental hosts and amplifying hosts.
2. **WNV infection is endemic in Romania**, its evolution experiencing an expansion over time and at the regional level, with the focal maintenance supported by the ecological features of the territory, the abundance of competent vectors and amplifying hosts.
3. Our results obtained in the sero-epidemiological investigations using two serology techniques, namely **ELISA** and **seroneutralization**, confirm the latter as the gold-standard detection method and we recommend it to be used to eliminate false-positive responses due to serological cross-reactions with other flaviviruses.
4. By using the **two serological assays**, horse serum samples from three counties in the eastern part of Romania were tested: Iași, Vaslui and Tulcea. Specific **antibodies for WNV were detected in 38,4% (136/354)** of the samples, serological signals being present in all the analyzed counties, with the highest value of antibody prevalence observed in Iași county (19,5%), where viral circulation is confirmed yearly by human cases.
5. Following the testing of horse samples by two serological methods (ELISA and MNT) and for three viruses belonging to the same family (West Nile, Usutu and tick-borne encephalitis virus), the presence of **specific antibodies against Usutu viruses and tick-borne encephalitis could not be demonstrated**.
6. The horses serological profile on WNV infection can be acknowledged as an **indicator of viral circulation** for people in rural areas. The viral circulation in the horse population in these areas is a consequence of anthropogenic ecosystems that support vector populations.
7. The WNV serological testing in migratory and resident birds in the Danube Delta Biosphere Reservation revealed an antibody prevalence of 11,8%. The obtained seroprevalence confirms both **viral persistence and virus spread through migratory birds**.
8. The serological investigations regarding the prevalence of circulating flaviviruses in dogs, consisted of testing 363 samples collected from dogs from paddocks, clinics and households, in six counties in eastern Romania, revealed a cumulative seroprevalence of

WNV of 36,1%, which emphasize the **extent of the geographical distribution** of this **infection in dog populations**.

9. The increased value of seropositivity in **dogs** indicates that this species can serve as a **sentinel** to monitor the activity of flaviviruses, thus establishing the potential risk of arbovirus infection in humans and enabling even easier early detection of viral circulation.

10. The results obtained after testing for the presence of specific anti-USUV antibodies in dogs demonstrated both **co-infection with WNV** but especially **unique infection with Usutu virus**. This is the first serological report of Usutu virus infection in animals in the eastern part of Romania.

11. Comparing the results obtained by the use of two serological kits (Ingezim WNV Compaq and ID Screen WNV Competition) for the detection of specific antibodies (IgG) directed against WNV, by **retesting the positive results** (n = 86) obtained in the first stage of the investigation, we found a **correlation of 100%** of the test results using **two commercial detection kits**.

12. Serological analysis performed on 176 patients, using the ELISA enzyme-linked immunosorbent assay (IgG) for **WNV**, showed a prevalence of 3,4% in the tested population and emphasise the **silent circulation** without clinical expressions.

13. The detection of WNV infection among asymptomatic human patients highlights the need to implement a **prevention and surveillance system** developed in blood donation centres.

14. Although the correlation between pre-existing comorbidities in the asymptomatic population and specific seroconversion has not been confirmed, we support the approach of a randomized sampling strategy, without any discriminatory criteria in a **longitudinal epidemiological study**, under the "One health" concept.

15. Following the testing of 88 samples collected from asymptomatic patients, in order to detect serological signals (IgG) for **Usutu virus infection**, we **did not succeed to confirm** its circulation among the human population.

16. The entomological investigations conducted in two counties in the eastern part of Romania led to the identification of **11 native species of mosquitoes**. Of these, a high degree of abundance was noted in competent species for viruses such as Tahyna, Zika or West Nile (*Aedes vexans*, *Culex pipiens* s.l. and *Culex modestus*).

17. The detection of a considerable number of pathogens by the **microfluid real-time PCR** assay can determine the basis of a preliminary surveillance system of vector-borne pathogens.

18. **Regular surveillance of vectors and sentinel species** as part of a strategy to monitor WNV infection in humans and other animal species is a **critical aspect of public health**. Also, calculating the prevalence of the mosquito infection rate (**MIR**) is a certain **indicator to determine the risk of infection in humans**.

19. Confirmation of the **Sindbis virus in Romania** is a premise of further studies, considering the fact that this virus has a special importance for human health.

20. The characterization of the two viral isolates (129 and 353cc) from mosquitoes reveals their belonging to **lineage 2 of WNV**, related to viral strains isolated from human patients and birds from Europe.
21. The obtained results led to the establishment of risk areas for **WNV and Sindbis infections** and provide information on the distribution of these pathogens in Iasi County.
22. The novelty of this PhD thesis is supported by **the first signalling of the Sindbis virus (SINV)** circulation, detected by molecular biology in mosquito populations in the eastern part of the country and by **specific anti-USutu serological signals (USUV) obtained as a result of testing dogs by seroneutralization.**

BIBLIOGRAFIE

BIBLIOGRAPHY

1. Aberle, Stephan W. et al. 2018. „Increase in human west nile and usutu virus infections, Austria, 2018”. *Eurosurveillance*.
2. Adouchief, Samuel et al. 2016. „Sindbis virus as a human pathogen—epidemiology, clinical picture and pathogenesis”. *Reviews in Medical Virology*.
3. Agentia Nationala pentru Protectia Mediului (ANPM). <http://www.anpm.ro>. 2021
4. Ahlers, Laura R.H., și Alan G. Goodman. 2018. „The immune responses of the animal hosts of West Nile virus: A comparison of insects, birds, and mammals”. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
5. Angenvoort, J., A. C. Brault, R. A. Bowen, și M. H. Groschup. 2013. „West Nile viral infection of equids”. *Veterinary Microbiology*.
6. Ashraf, Usama et al. 2015. „Usutu virus: An emerging flavivirus in Europe”. *Viruses*.
7. Atkins, Gregory J. 2013. „The Pathogenesis of Alphaviruses”. *ISRN Virology*.
8. Austgen, L. E., Bowen, R. A., Bunning, M. L., Davis, B. S., Mitchell, C. J., & Chang, G. J. J. (2004). Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid1001.020616>
9. Autorino, Gian Luca et al. 2002. „West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy”. *Emerging Infectious Diseases*.
10. Avšič-Županc, T. et al. 1995. „Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains”. *Clinical and Diagnostic Virology*.
11. Ayadi, T. et al. 2017. „Evidence of exposure of laughing doves (*Spilopelia senegalensis*) to West Nile and Usutu viruses in southern Tunisian oases”. *Epidemiology and Infection*.
12. Azar, Sasha R., și Scott C. Weaver. 2019. „Vector competence: What has Zika virus taught us?”. *Viruses*.
13. Bai, Fengwei, E. Ashley Thompson, Parminder J.S. Vig, și A. Arturo Leis. 2019. „Current understanding of west nile virus clinical manifestations, immune responses, neuroinvasion, and immunotherapeutic implications”. *Pathogens* 8(4).
14. Bakonyi, Tamás et al. 2016. „Chronic West Nile virus infection in kea (*Nestor notabilis*)”. *Veterinary Microbiology*.
15. Bakonyi, Tamás et al. 2017. „Usutu virus infections among blood donors, Austria, july and august 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges”. *Eurosurveillance*.
16. Beck, C., Lowenski, S., Durand, B., Bahuon, C., Zientara, S., & Lecollinet, S. (2017). Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005936>
17. Beck, Cécile et al. 2013. „Flaviviruses in europe: Complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of west nile disease”. *International Journal of Environmental Research and Public Health*.
18. Beck, Cécile et al. 2015. „A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses”. *BioMed Research International*.
19. Beck, Cécile et al. 2017. „Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

20. Becker N, Jöst A, Weitzel T. The *Culex pipiens* complex in Europe. *J Am Mosq Control Assoc.* 2012 Dec;28(4 Suppl):53-67. doi: 10.2987/8756-971X-28.4s.53. PMID: 23401944.
21. Becker, Norbert et al. 2010. *Mosquitoes and Their Control: Second Edition Mosquitoes and their control: Second edition.*
22. Becker, Norbert, Artur Jöst, și Thomas Weitzel. 2012. „The culex pipiens complex in Europe”. *Journal of the American Mosquito Control Association.*
23. Bellini, Romeo et al. 2020. „Practical management plan for invasive mosquito species in Europe: I. Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*)”. *Travel Medicine and Infectious Disease.*
24. Benallal, K. E. et al. 2016. „First report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Oran, West of Algeria”. *Acta Tropica.*
25. Benzarti, Emma, Annick Linden, Daniel Desmecht, și Mutien Garigliany. 2019. „Mosquito-borne epornitic flaviviruses: An update and review”. *Journal of General Virology.*
26. Bernard, Kristen A. et al. 2001. „West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000”. *Emerging Infectious Diseases.* Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Germania;
27. Bielefeldt-Ohmann, Helle et al. 2017. „Characterization of non-lethal West Nile Virus (WNV) infection in horses: Subclinical pathology and innate immune response”. *Microbial Pathogenesis.*
28. Bigham, Abigail W. et al. 2011. „Host genetic risk factors for West Nile virus infection and disease progression”. *PLoS ONE.*
29. Birnberg, Lotty et al. 2019. „Field-captured *Aedes vexans* (Meigen, 1830) is a competent vector for Rift Valley fever phlebovirus in Europe”. *Parasites and Vectors.*
30. Bjarnadottir, Helga, și Jon J. Jonsson. 2005. „A rapid real-time qRT-PCR assay for ovine β -actin mRNA”. *Journal of Biotechnology.*
31. Blackburn, N. K., Reyers, F., Berry, W. L., & Shepherd, A. J. (1989). Susceptibility of dogs to West Nile virus: A survey and pathogenicity trial. *Journal of Comparative Pathology.* [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(89\)90090-X](https://doi.org/10.1016/0021-9975(89)90090-X)
32. Blitvich, Bradley J., și Andrew E. Firth 2017. „A review of flaviviruses that have no known arthropod vector”. *Viruses.*
33. Blitvich, Bradley J., și Andrew E. Firth. 2015. „Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization”. *Viruses.*
34. Bogovic, Petra. 2015. „Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management”. *World Journal of Clinical Cases.*
35. Bogovic, Petra. 2015. „Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management”. *World Journal of Clinical Cases.*
36. Bolling, Bethany G., Lars Eisen, Chester G. Moore, și Carol D. Blair. 2011. „Insect-specific flaviviruses from *Culex* mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*
37. Brinton, Margo A. 2013. „Replication cycle and molecular biology of the west nile virus”. *Viruses.*
38. Brownstein, John S. et al. 2002. „Spatial analysis of West Nile virus: rapid risk assessment of an introduced vector-borne zoonosis.” *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.).*
39. Brugman, Victor A. et al. 2018. „The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus transmission in Europe”. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15(2).
40. Buckweitz, S., Kleiboeker, S., Marioni, K., Ramos-Vara, J., Rottinghaus, A., Schwabenton, B., & Johnson, G. (2003). Serological, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and immunohistochemical detection of West Nile virus in a clinically affected dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* <https://doi.org/10.1177/104063870301500404>
41. Busani, L., Capelli, G., Cecchinato, M., Lorenzetto, M., Savini, G., Terregino, C., ... Marangon, S. (2011). West Nile virus circulation in Veneto region in 2008-2009. *Epidemiology and Infection.* <https://doi.org/10.1017/S0950268810001871>

42. C.M., S., L.-A., C., J.A., A., W.M., B., E., H., & C.W., C. (2006). Visuospatial function in the beagle dog: An early marker of cognitive decline in a model of human aging and dementia. *Neurobiology of Learning and Memory*.
43. Cadar, D. et al. 2017. „Blood donor screening for west nile virus (WNV) revealed acute usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016”. *Eurosurveillance* 22(14).
44. Calzolari, Mattia et al. 2015. „West Nile virus surveillance in 2013 via mosquito screening in northern Italy and the influence of weather on virus circulation”. *PLoS ONE* 10(10): 1-14.
45. Camp, J. V. et al. 2018. „Serological surveillance for Tahyna virus (California encephalitis orthobunyavirus, Peribunyaviridae) neutralizing antibodies in wild ungulates in Austria, Hungary and Romania”. *Zoonoses and Public Health* 65(4): 459-63.
46. Cannon, A. B., Luff, J. A., Brault, A. C., MacLachlan, N. J., Case, J. B., Green, E. N. G., & Sykes, J. E. (2006). Acute encephalitis, polyarthritis, and myocarditis associated with West Nile virus infection in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[1219:AEPAMA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[1219:AEPAMA]2.0.CO;2)
47. Cardinale, E. et al. 2017. „West Nile virus infection in horses, Indian ocean”. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
48. Carletti, Fabrizio et al. 2019. „Expanding usutu virus circulation in Italy: Detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018”. *Eurosurveillance* 24(3).
49. Carp Cărare M, 2014 – Microbiologie generală, Ed. Ion Ionescu de la Brad Iași.
50. Carson, Paul J. et al. 2014. „Characteristics of antibody responses in west nile virus-seropositive blood donors”. *Journal of Clinical Microbiology*.
51. Chakraborty, S., și R. L. Smith. 2019. „Error associated with estimates of Minimum Infection Rate for Endemic West Nile Virus in areas of low mosquito trap density”. *Scientific Reports*.
52. Chancey, Caren, Andriyan Grinev, Evgeniya Volkova, și Maria Rios. 2015. „The global ecology and epidemiology of west nile virus”. *BioMed Research International*.
53. Chaskopoulou, Alexandra et al. 2016. „Ecology of West Nile virus across four European countries: Review of weather profiles, vector population dynamics and vector control response Lucy Tusting and Jo Lines”. *Parasites and Vectors*.
54. Chevalier, V. et al. 2010. „Environmental risk factors of West Nile virus infection of horses in the Senegal River basin”. *Epidemiology and Infection*.
55. Chevalier, V., Marsot, M., Molia, S., Rasamoelina, H., Rakotondravao, R., Pedrono, M., ... Beck, C. (2020). Serological evidence of west nile and usutu viruses circulation in domestic and wild birds in wetlands of mali and madagascar in 2008. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph17061998>
56. Chevalier, Veronique, Sylvie Lecollinet, și Benoit Durand. 2011. „West Nile virus in Europe: A comparison of surveillance system designs in a changing epidemiological context”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
57. Chitimia-Dobler, Lidia, Adriana Hristea, Wilhelm Erber, și Tamara Vuković Janković. 2019. „TBE in Romania”. *Tick-borne encephalitis - The Book*.
58. Christova, Iva et al. 2020. „West Nile virus lineage 2 in humans and mosquitoes in Bulgaria, 2018–2019”. *Journal of Clinical Virology*.
59. Ciccozzi, Massimo et al. 2013. „Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2”. *Infection, Genetics and Evolution*.
60. Ciota, Alexander T. 2017. „West Nile virus and its vectors”. *Current Opinion in Insect Science*.
61. Ciota, Alexander T., și Laura D. Kramer. 2013. „Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus”. *Viruses* 5(12).
62. Clé, M. et al. 2019. „Usutu virus: A new threat?” *Epidemiology and Infection* 147: 1-11.
63. Clé, Marion et al. 2020. „Study of usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

64. Colpitts, Tonya M., Michael J. Conway, Ruth R. Montgomery, și Erol Fikrig. 2012. „West Nile virus: Biology, transmission, and human infection”. *Clinical Microbiology Reviews*.
65. Cooke, William H., Katarzyna Grala, și Robert C. Wallis. 2006. „Avian GIS models signal human risk for West Nile virus in Mississippi”. *International Journal of Health Geographics*.
66. Cotar, Ani Ioana et al. 2018. „West Nile virus lineage 2 in Romania, 2015-2016: Co-circulation and strain replacement”. *Parasites and Vectors* 11(1): 1-5.
67. Crivei Luciana Alexandra, Oslobanu L., Anita A., Anita D., Rățoi (Anton) I, Cozma A., Crivei I. (2019) - Preliminary data regarding seroprevalence and risk factors associated with west nile virus infection in horses in Eastern Romania. *Bulletin USAMV Veterinary Medicine, Timișoara*.
68. Crivei Luciana Alexandra, Rățoi (Anton) I., Anița A., Savuța G., Oșlobanu L., 2018b, West Nile virus infections in Romania after the 2010 outbreak- a retrospective study in human and animal population, *Lucrări Științifice, Vol. 60, Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași*.
69. Crivei, A. L., Rățoi (Anton), I., Răileanu, C., Porea, D., Anița, D., Savuța, G., & Oșlobanu, L. (2018). First Record of West Nile Virus Specific Seroconversion in Dogs From Eastern Romania. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:2017.0060>
70. Crowder, David W. et al. 2013. „West Nile Virus Prevalence across Landscapes Is Mediated by Local Effects of Agriculture on Vector and Host Communities”. *PLoS ONE*.
71. Danis, Kostas et al. 2011. „Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010”. *Emerging Infectious Diseases*.
72. Davoust, B., Leparç-Goffart, I., Demoncheaux, J. P., Tine, R., Diarra, M., Trombini, G., ... Marié, J. Lou. (2014). Serologic surveillance for West Nile virus in dogs, Africa. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2008.130691>
73. Delta: surveillance, phylogeography and vector feeding patterns”, Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, Department of Biology of Hamburg University, Germania;
74. Di Gennaro, Annapia et al. 2014. „Serum neutralization assay can efficiently replace plaque reduction neutralization test for detection and quantitation of west nile virus antibodies in human and animal serum samples”. *Clinical and Vaccine Immunology*.
75. Di Luca, Marco et al. 2017. „First record of the invasive mosquito species *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) on the southernmost Mediterranean islands of Italy and Europe”. *Parasites and Vectors*.
76. Diagne, Moussa Moïse et al. 2019. „Usutu virus isolated from rodents in Senegal”. *Viruses*.
77. Diamond, Michael S., Mark Throsby, Jaap Goudsmit, și John de Kruif. 2009. „The Human Antibody Response Against WNV”. În *West Nile Encephalitis Virus Infection*.
78. Diamond, Michael S., Theodore C. Pierson, și Daved H. Fremont. 2008. „The structural immunology of antibody protection against West Nile virus”. *Immunological Reviews*.
79. Dinu, S. et al. 2015. „West Nile virus circulation in South-Eastern Romania, 2011 to 2013”. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 20(20).
80. Domanović, Dragoslav et al. 2019. „West nile and usutu virus infections and challenges to blood safety in the European Union”. *Emerging Infectious Diseases* 25(6): 1050-57.
81. Dong, Hongping, Bo Zhang, și Pei Yong Shi. 2008. „Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein”. *Virology*.
82. Dos Santos Franco, Lorrany, Leticia Tsieme Gushi, Wilson Barros Luiz, și Jaime Henrique Amorim. 2019. „Seeking Flavivirus Cross-Protective Immunity”. *Frontiers in Immunology*.
83. Dunkelberger, Jason R., și Wen Chao Song. 2010. „Complement and its role in innate and adaptive immune responses”. *Cell Research*.

84. Durand, B. et al. 2005. „Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France”. *Veterinary Record*.
85. Durand, B., Haskouri, H., Lowenski, S., Vachieri, N., Beck, C., & Lecollinet, S. (2016). Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: Dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S095026881600011X>
86. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020. West Nile virus in the EU/EEA. Stockholm: ECDC; 2013. doi 10.2900/85718
87. Eiden, Martin et al. 2014. „Isolation of sindbis virus from a hooded crow in Germany”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
88. Epp, Tasha, Cheryl Waldner, Keith West, și Hugh Townsend. 2007. „Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses”. *Canadian Veterinary Journal*.
89. Esser, Helen J. et al. 2019. „Risk factors associated with sustained circulation of six zoonotic arboviruses: A systematic review for selection of surveillance sites in non-endemic areas”. *Parasites and Vectors*.
90. European Centre for Disease Prevention and Control. West Nile virus risk assessment tool
91. Figuerola, Jordi et al. 2008. „Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain”. *Veterinary Microbiology*.
92. Franson, J. Christian, Erik K. Hofmeister, Gail H. Collins, și Robert J. Dusek. 2011. „Short report: Seroprevalence of West Nile virus in feral horses on Sheldon National Wildlife Refuge, Nevada, United States”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
93. Fülöp, Attila et al. 2018. „Autumn Passage of Soaring Birds over Dobrogea (Romania): A Migration Corridor in Southeast Europe”. *Ardea* 106(1): 61.
94. Gaibani, Paolo, și Giada Rossini. 2017. „An overview of Usutu virus”. *Microbes and Infection* 19(7-8).
95. Gao, Xiaoyan, Roger Nasci, și Guodong Liang. 2010. „The neglected arboviral infections in mainland china”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
96. Garcia, Melissa N., Rodrigo Hasbun, și Kristy O. Murray. 2015. „Persistence of West Nile virus”. *Microbes and Infection*.
97. García-Bocanegra, I., Jurado-Tarifa, E., Cano-Terriza, D., Martínez, R., Pérez-Marín, J. E., & Lecollinet, S. (2018). Exposure to West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in dogs in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1111/tbed.12801>
98. García-Bocanegra, Ignacio et al. 2011. „West nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010”. *Emerging Infectious Diseases*.
99. García-Bocanegra, Ignacio et al. 2012. „Seroprevalence and risk factors associated to West Nile virus in horses from Andalusia, Southern Spain”. *Veterinary Microbiology*.
100. Gaunt, M. C., Waldner, C., & Taylor, S. M. (2015). Serological survey of West Nile virus in pet dogs from Saskatchewan, Canada. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1780>
101. Golding, N., Nunn, M.A., Medlock, J.M. et al. West Nile virus vector *Culex modestus* established in southern England. *Parasites Vectors* 5, 32 (2012). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-32>
102. Gray, Timothy J., și Cameron E. Webb. 2014. „A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus”. *International Journal of General Medicine*.
103. Grubaugh, Nathan D. et al. 2016. „Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching”. *Cell Host and Microbe*.
104. Hachid, A. et al. 2019. „Evidence of West Nile virus circulation among humans in central northern Algeria”. *New Microbes and New Infections*.
105. Hamer, Gabriel L. et al. 2008. „Rapid amplification of West Nile virus the role of hatch-year birds”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.

106. Han, Linda L. et al. 1999. „Risk Factors for West Nile Virus Infection and Meningoencephalitis, Romania, 1996”. The Journal of Infectious Diseases.
107. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005 Aug;11(8):1167-73. doi: 10.3201/eid1108.050289a. PMID: 16102302; PMCID: PMC3320478.
108. Heringa, Jaap. 2008. „Sequence Similarity”. În *Encyclopedia of Life Sciences*.
109. Hernandez, Eunis, Ryan Torres, și Andrea L. Joyce. 2019. „Environmental and Sociological Factors Associated with the Incidence of West Nile Virus Cases in the Northern San Joaquin Valley of California, 2011-2015”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
110. Hernández-Triana, Luis M. et al. 2014. „Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: A review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease”. *Frontiers in Public Health*.
111. Hernández-Triana, Luis M. et al. 2018. „Assessment of vector competence of UK mosquitoes for Usutu virus of African origin”. *Parasites and Vectors*.
112. Holzmann, Heidemarie et al. 2009. „Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria”. *Emerging Infectious Diseases*.
113. Huang, Yan Jang S., Stephen Higgs, și Dana L. Vanlandingham. 2019. „Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses”. *Frontiers in Microbiology* 10(JAN): 1-14.
114. Hubalek, Z. et al. 2014. „Isolation of Tahyna Virus (California Encephalitis Group) From *Anopheles hyrcanus* (Diptera, Culicidae), a Mosquito Species New to, and Expanding in, Central Europe”. *Journal of Medical Entomology*.
115. Hubálek, Zdenek et al. 2005. „Mosquitoborne viruses, Czech Republic, 2002”. *Emerging Infectious Diseases*.
116. Hubálek, Zdenek et al. 2008. „Mosquito-borne viruses in Europe”. *Parasitology Research* 103(SUPPL. 1).
117. Jaenson, Thomas G.T. et al. 2018. „The importance of wildlife in the ecology and epidemiology of the TBE virus in Sweden: Incidence of human TBE correlates with abundance of deer and hares”. *Parasites and Vectors*.
118. Jaenson, Thomas G.T., Marika Hjertqvist, Tomas Bergström, și Åke Lundkvist. 2012. „Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden”. *Parasites and Vectors*.
119. Jean, Cynthia M., Somayeh Honarmand, Janice K. Louie, și Carol A. Glaser. 2007. „Risk factors for West Nile virus neuroinvasive disease, California, 2005”. *Emerging Infectious Diseases*.
120. Johnson, Karyn N. 2015. „The impact of Wolbachia on virus infection in mosquitoes”. *Viruses*.
121. Jöst, Hanna et al. 2010. „Isolation and phylogenetic analysis of sindbis viruses from mosquitoes in Germany”. *Journal of Clinical Microbiology*.
122. Jöst, Hanna et al. 2011. „Medical importance of Sindbis virus in south-west Germany”. *Journal of Clinical Virology*.
123. Juřicová, Z., Z. Hubálek, J. Halouzka, și S. Šikutová. 2009. „Serological examination of songbirds (passeriformes) for mosquito-borne viruses sindbis, řahyňa, and batai in a south moravian wetland (Czech Republic)”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
124. Keyes, B.E., și C.E. Grue. 1982. „Capturing birds with mist nets: A review”. *North American Bird Bander*.
125. Kile, J. C., Panella, N. A., Komar, N., Chow, C. C., MacNeil, A., Robbins, B., & Bunning, M. L. (2005). Serologic survey of cats and dogs during an epidemic of West Nile virus infection in humans. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
<https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1349>

126. Kilpatrick, A. Marm, Mark A. Meola, Robin M. Moudy, și Laura D. Kramer. 2008. „Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes”. *PLoS Pathogens*.
127. Knap, N., și T. Avšič-Županc. 2015. „Factors affecting the ecology of tick-borne encephalitis in Slovenia”. *Epidemiology and Infection*.
128. Kolodziejek, Jolanta et al. 2018. „Integrated analysis of human-animal-vector surveillance: West Nile virus infections in Austria, 2015-2016”. *Emerging Microbes and Infections*.
129. Komar, N., Panella, N. A., & Boyce, E. (2001). Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid0704.017424>
130. Kramer, Laura D., Linda M. Styer, și Gregory D. Ebel. 2008. „A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus”. *Annual Review of Entomology* 53(1): 61-81.
131. Kříž, Bohumir, C. Beneš, și M. Daniel. 2009. „Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008)”. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*.
132. Kulasekera, Varuni L. et al. 2001. „West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000”. *Emerging Infectious Diseases*.
133. Kumar, Sudhir, Glen Stecher, și Koichiro Tamura. 2016. „MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets”. *Molecular biology and evolution*.
134. Kurkela, Satu et al. 2005. „Clinical and Laboratory Manifestations of Sindbis Virus Infection: Prospective Study, Finland, 2002–2003”. *The Journal of Infectious Diseases*.
135. Kurkela, Satu et al. 2008. „Sindbis virus infection in resident birds, migratory birds, and humans, finland”. *Emerging Infectious Diseases*.
136. Lan, D., Ji, W., Yu, D., Chu, J., Wang, C., Yang, Z., & Hua, X. (2011). Serological evidence of West Nile virus in dogs and cats in China. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0913-8>
137. Lanciotti, Robert S. et al. 2002. „Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East”. *Virology*.
138. Laurent-Rolle, Maudry et al. 2010. „The NS5 Protein of the Virulent West Nile Virus NY99 Strain Is a Potent Antagonist of Type I Interferon-Mediated JAK-STAT Signaling”. *Journal of Virology*.
139. Leggewie M., 2016 „Susceptibility of *Culex* species native to Germany for West Nile virus and the role of *Wolbachia* in virus-vector interaction”, Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences Department of Biology University of Hamburg &Department of Molecular Parasitology Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Germania;
140. Levy, J. K., Lappin, M. R., Glaser, A. L., Birkenheuer, A. J., Anderson, T. C., & Edinboro, C. H. (2011). Prevalence of infectious diseases in cats and dogs rescued following hurricane katrina. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. <https://doi.org/10.2460/javma.238.3.311>
141. Li, Wenjuan et al. 2014. „Tahyna virus infection, a neglected arboviral disease in the Qinghai-Tibet Plateau of China”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
142. Lichtensteiger, C. A., Heinz-Taheny, K., Osborne, T. S., Novak, R. J., Lewis, B. A., & Firth, M. L. (2003). West Nile virus encephalitis and myocarditis in wolf and dog. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid0910.020617>
143. Lillibridge, K. M., Parsons, R., Randle, Y., Travassos Da Rosa, A. P. A., Guzman, H., Siirin, M., ... Tesh, R. B. (2004). The 2002 introduction of West Nile virus into Harris County, Texas, an area historically endemic for St. Louis encephalitis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.676>
144. Lindsey, Nicole P., J. Erin Staples, Jennifer A. Lehman, și Marc Fischer. 2012. „Medical risk factors for severe West Nile virus disease, United States, 2008-2010”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.

145. Ling, Jiaxin et al. 2019. „Introduction and Dispersal of Sindbis Virus from Central Africa to Europe”. *Journal of Virology*.
146. Linke, Sonja et al. 2007. „Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR”. *Journal of Virological Methods*.
147. Lu, Zhi et al. 2009. „Tahyna virus and human infection, China”. *Emerging Infectious Diseases*.
148. Ludu Oslobanu, Elena Luanda et al. 2014. „West Nile virus reemergence in Romania: A serologic survey in host species”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 14(5): 330-37.
149. Ludu Oslobanu, Luanda Elena, Anca Pâslaru, și Gheorghe Savuța. 2015. „West Nile Virus Seroprevalence in Horses from Romania: First Step in the Infection Risk Assessment”. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*.
150. Ludu (Căs. Oşlobanu) E. L., 2010. “Cercetări Epidemiologice Privind Virusul West Nile În România”. Teză de doctorat, Facultatea de Medicină Veterinară, Iași.
151. Lundström, Jan O. et al. 2019. „Sindbis virus polyarthrititis outbreak signalled by virus prevalence in the mosquito vectors”. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(8): 1-20.
152. Lundström, Jan O., și Martin Pfeffer. 2010. „Phylogeographic structure and evolutionary history of sindbis virus”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
153. Lwande Wesula Olivia, Gladys Mosomtai, Samwel Symekher (2015). „West Nile virus, a reemerging virus” *Precision Medicine* 2015; 2: e604. doi: 10.14800/pm.604
154. Magurano, F. et al. 2012. „Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy”. *Clinical Microbiology and Infection*.
155. Mallya, Shruti et al. 2018. „Factors associated with human West Nile virus infection in Ontario: A generalized linear mixed modelling approach”. *BMC Infectious Diseases*.
156. Mancini, G. et al. 2017. „Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy”. *Veterinaria Italiana*.
157. Maquart, M., Dahmani, M., Marié, J. Lou, Gravier, P., Leparç-Goffart, I., & Davoust, B. (2017). First Serological Evidence of West Nile Virus in Horses and Dogs from Corsica Island, France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2024>
158. Marchi, Serena, Claudia Maria Trombetta, și Emanuele Montomoli. 2018. „Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases as a Global Health Problem”. În *Public Health - Emerging and Re-emerging Issues*.
159. Michel, Friederike et al. 2018. „West Nile virus and Usutu virus monitoring of wild birds in Germany”. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15(1).
160. Michelet, Lorraine et al. 2014. „High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe”. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
161. Montagnaro, S., Piantedosi, D., Ciarcia, R., Loponte, R., Veneziano, V., Fusco, G., ... Pagnini, U. (2019). Serological Evidence of Mosquito-Borne Flaviviruses Circulation in Hunting Dogs in Campania Region, Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2337>
162. Montecino-Latorre, Diego, și Christopher M. Barker. 2018. „Overwintering of West Nile virus in a bird community with a communal crow roost”. *Scientific Reports*.
163. Montgomery, Ruth R., și Kristy O. Murray. 2015. „Risk factors for West Nile virus infection and disease in populations and individuals”. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*.
164. Moutailler, Sara et al. 2019. „A new high-throughput tool to screen mosquito-borne viruses in Zika virus endemic/epidemic areas”. *Viruses*.
165. Mumtaz, Imtiaz M. et al. 2012. „Bone marrow of NZB/W mice is the major site for plasma cells resistant to dexamethasone and cyclophosphamide: Implications for the treatment of autoimmunity”. *Journal of Autoimmunity*.
166. Muñoz, J., Eritja, R., Alcaide, M., Montalvo, T., Soriguer, R. C., & Figuerola, J. (2011). Host-Feeding Patterns of Native *Culex pipiens* and Invasive *Aedes albopictus* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in

- Urban Zones From Barcelona, Spain. *Journal of Medical Entomology*.
<https://doi.org/10.1603/me11016>
167. Murray, Kristy O. et al. 2006. „Risk factors for encephalitis and death from West Nile virus infection”. *Epidemiology and Infection*.
168. Murray, Kristy O., Duke Ruktanonchai, et al. 2013. „West Nile virus, Texas, USA, 2012”. *Emerging Infectious Diseases*.
169. Murray, Kristy O., Melissa N. Garcia, Chris Yan, și Rodion Gorchakov. 2013. „Persistence of detectable immunoglobulin M antibodies up to 8 years after infection with West Nile virus”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
170. Musso, Didier, și Philippe Desprès. 2020. „Serological diagnosis of flavivirus-associated human infections”. *Diagnostics*.
171. Mweene-Ndumba, Idah et al. 2015. „Seroprevalence of West Nile virus specific IgG and IgM antibodies in north-western and western provinces of Zambia”. *African Health Sciences*.
172. N., Hudopisk et al. 2013. „Tick-borne Encephalitis Associated with Consumption of Raw Goat Milk, Slovenia, 2012.” *Emerging Infectious Diseases*.
173. Napp, Sebastián, Dusan Petrić, și Núria Busquets. 2018. „West Nile virus and other mosquito-borne viruses present in Eastern Europe”. *Pathogens and Global Health*.
174. Navaratnarajah, Chanakha K., și Richard J. Kuhn. 2007. „Functional characterization of the Sindbis virus E2 glycoprotein by transposon linker-insertion mutagenesis”. *Virology*.
175. Ndiaye, El Hadji et al. 2016. „Vector competence of *Aedes vexans* (Meigen), *Culex poicilipes* (Theobald) and *Cx. quinquefasciatus* Say from Senegal for West and East African lineages of Rift Valley fever virus”. *Parasites and Vectors*.
176. Nicolescu, G, A Vladimirescu, și O Ciolpan. 2002. „The distribution of mosquitoes in Romania (Diptera: Culicidae). Part I: Anopheles, Aedes and Culex”. *European Mosquito Bulletin*.
177. Nicolescu, G. 1995. „The mosquitoes (Diptera:Culicidae) from Romania: an annotated checklist and bibliography.” *Roumanian archives of microbiology and immunology*.
178. Nicolescu, Gabriela, Alexandra Viadimirescu, și Octavian Ciolpan. 2003. „The distribution of mosquitoes in Romania (Diptera: Culicidae).Part II: Culiseta, Coquillettidia, Ochlerotatus, Orthopodomyia and Uranotaenia”. *European Mosquito Bulletin, Journal of the European Mosquito Control Association*.
179. Nicolescu, Gabriela, Alexandru Vladimirescu, și Octavian Ciolpan. 2003. „The distribution of mosquitoes in Romania (Diptera: Culicidae). Part III: Detailed maps for Anopheles, Aedes and Culex”. *European Mosquito Bulletin*.
180. Niczyporuk, Jowita Samanta et al. 2015. „Occurrence of west nile virus antibodies in wild birds, horses, and humans in Poland”. *BioMed Research International*.
181. O'Donnell, Kyle L. et al. 2017. „Potential of a northern population of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus”. *Journal of Medical Entomology*.
182. OIE-WAHIS (OIE World Animal Health Information System), <https://www.icr.ro/pagini/the-danube-delta-biosphere-reserve-ddbr>, 2021.
183. Ong, Ruo Yan, Fok Moon Lum, și Lisa F.P. Ng. 2014. „The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections”. *Future Virology*.
184. Osório, Hugo Costa et al. 2008. „Species composition and dynamics of adult mosquitoes of southern Portugal”. *European Mosquito Bulletin Journal of the European Mosquito Control Association*.
185. Ozkul, A., Yildirim, Y., Pinar, D., Akcali, A., Yilmaz, V., & Colak, D. (2006). Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiology and Infection*.
<https://doi.org/10.1017/S0950268805005492>
186. Pachler, Karin et al. 2014. „Putative new west nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013”. *Emerging Infectious Diseases*.

187. Palo, R. Thomas. 2014. „Tick-borne encephalitis transmission risk: Its dependence on host population dynamics and climate effects”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
188. Papa, A., A. Anastasiadou, și M. Delianidou. 2015. „West Nile virus IgM and IgG antibodies three years post- infection”. *Hippokratia*.
189. Papa, Anna et al. 2011. „Persistence of West Nile virus immunoglobulin M antibodies, Greece”. *Journal of Medical Virology*.
190. Papa, Anna et al. 2012. „West nile virus lineage 2 from blood donor, Greece”. *Emerging Infectious Diseases*.
191. Papa, Anna et al. 2020. „West Nile virus lineage 2 in Culex mosquitoes in Thessaly, Greece, 2019”. *Acta Tropica*.
192. Paștiu, Anamaria Ioana et al. 2016. „Wild birds in Romania are more exposed to west nile virus than to newcastle disease virus”. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
193. Păstrav, Ioana Raluca, Cristian Domșa, și Andrei Daniel Mihalca. 2020. „Synopsis of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Romania”. *Zootaxa*.
194. Patsoula, Eleni et al. 2016. „West Nile Virus Circulation in Mosquitoes in Greece (2010-2013)”. *BioMed Research International*.
195. Paty, M. C. 2013. „The expansion of vector-borne diseases and the implications for blood transfusion safety: The case of West Nile Virus, dengue and chikungunya”. *Transfusion Clinique et Biologique*.
196. Paz, Shlomit. 2015. „Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.
197. Petersen, Lyle R., și Anthony A. Marfin. 2002. „West Nile virus: A primer for the clinician”. *Annals of Internal Medicine* 137(3): 173-79.
198. Petrović, T. et al. 2013. „Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: First isolation and characterisation of WNV strains from Serbia”. *Eurosurveillance*.
199. Pezzotti, P. et al. 2011. „Prevalenceprevalence of IgM and IgG antibodies to West Nile virus among blood donors in an affected area of north-eastern Italy, summer 2009”. *Eurosurveillance*.
200. Pfeffer, Martin, și Gerhard Dobler. 2011. „Tick-borne encephalitis virus in dogs - Is this an issue?”. *Parasites and Vectors*.
201. Philpott, David C.E. et al. 2019. „Acute and delayed deaths after west nile virus infection, Texas, USA, 2002–2012”. *Emerging Infectious Diseases*.
202. Phoutrides, E., Jusino-Mendez, T., Perez-Medina, T., Seda-Lozada, R., Garcia-Negron, M., Davila-Toro, F., & Hunsperger, E. (2011). The utility of animal surveillance in the detection of West Nile virus activity in Puerto Rico, 2007. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0011>
203. Pinto, M. C. et al. 2011. „Octenol as Attractant to Nyssomyia neivai (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Field”. *Journal of Medical Entomology*.
204. Pisani, Giulio, Karen Cristiano, Simonetta Pupella, și Giancarlo Maria Liumbruno. 2016. „West Nile Virus in Europe and Safety of Blood Transfusion”. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*.
205. Ponce, Patricio, Dlego Morales, Adriana Argoti, și Varsovia E. Cevallos. 2018. „First Report of Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) (Diptera: Culicidae), the Asian Tiger Mosquito, in Ecuador”. *Journal of Medical Entomology*.
206. Porea D., 2018 - „Cercetări epidemiologice și etiologice privind infecția cu virusul hepatitei E la animalele sălbatice și evaluarea riscului zoonotic al acesteia”, Teză de doctorat, Facultatea de Medicină Veterinară, Iași
207. Pourrut, Xavier, Dieudonné Nkoghé, Janusz Paweska, și Eric Leroy. 2010. „First serological evidence of West Nile virus in human rural populations of Gabon”. *Virology Journal*.
208. Prince, Harry E. et al. 2007. „Persistence of West Nile virus-specific antibodies in viremic blood donors”. *Clinical and Vaccine Immunology*.

209. Prioteasa, Liviu F., Sorin Dinu, Elena Fălcuță, și Cornelia S. Ceianu. 2015. „Established Population of the Invasive Mosquito Species *Aedes albopictus* in Romania, 2012–14”. *Journal of the American Mosquito Control Association* 31(2): 177-81.
210. Prioteasa, Liviu F., Sorin Dinu, Elena Fălcuță, și Cornelia S. Ceianu. 2015. „Established population of the invasive mosquito species *aedes albopictus* in Romania, 2012-14”. *Journal of the American Mosquito Control Association*.
211. Răileanu C., 2016 - „Cercetări epidemiologice și etiologice asupra unor boli infecțioase emergente cu transmitere vectorială în zona de est a României”, Teză de doctorat, Facultatea de Medicină Veterinară, Iași
212. Ravindra, K. V. et al. 2004. „West Nile Virus--Associated Encephalitis in Recipients of Renal and Pancreas Transplants: Case Series and Literature Review”. *Clinical Infectious Diseases*.
213. Riabi, Samira et al. 2010. „Prevalence of IgG antibodies against West Nile virus in blood donors during the 2003 outbreak in Tunisia”. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
214. Rios, Jonathan J. et al. 2010. „OAS1 polymorphisms are associated with susceptibility to West Nile encephalitis in horses”. *PLoS ONE*.
215. Rocheleau, J. P., Michel, P., Lindsay, L. R., Drebot, M., Dibernardo, A., Ogden, N. H., ... Arsenault, J. (2017). Emerging arboviruses in Quebec, Canada: Assessing public health risk by serology in humans, horses and pet dogs. *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002205>
216. Rodrigues, Nádia Cristina Pinheiro et al. 2018. „Risk factors for arbovirus infections in a low-income community of Rio de Janeiro, Brazil, 2015-2016”. *PLoS ONE*.
217. Roehrig, John T. et al. 2003. „Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases”. *Emerging Infectious Diseases*.
218. Roesch, Ferdinand, Gonzalo Moratorio, Gonzalo Moratorio, și Marco Vignuzzi. 2019. „Usutu virus: An arbovirus on the rise”. *Viruses* 11(7).
219. Rückert, Claudia, și Gregory D. Ebel. 2018. „How Do Virus–Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence?” *Trends in Parasitology*.
220. Rudolf, Ivo et al. 2017. „West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe”. *Parasites and Vectors*.
221. Rushton, James O. et al. 2013. „Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011”. *Emerging Infectious Diseases*.
222. Saiz, Juan Carlos, și Ana Belén Blázquez. 2017. „Usutu virus: Current knowledge and future perspectives”. *Virus Adaptation and Treatment*.
223. Salat, Jiri et al. 2017. „Tick-borne encephalitis in sheep, Romania”. *Emerging Infectious Diseases*.
224. Salazar, Patricia et al. 2004. „Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death”. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.
225. Savini, G. et al. 2012. „Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy”. *Veterinary Microbiology*.
226. Savuta Gheorghe, *Epidemiologie veterinara generala*, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași, 2001, ISBN 973-8014-40-9
227. Scheuch, Dorothee E. et al. 2018a. „Detection of usutu, sindbis, and batai viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in Germany, 2011–2016”. *Viruses*.
228. Schwartz, Alex, și Jacob C. Koella. 2001. „Trade-offs, conflicts of interest and manipulation in *Plasmodium*-mosquito interactions”. *Trends in Parasitology*.
229. Sejvar, James J. 2003. „West Nile virus: An historical overview”. *Ochsner Journal*.
230. Sejvar, James J. 2014. „Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection”. *Viruses* 6(2): 606-23.

231. Semenza, Jan C. et al. 2016. „Climate change projections of West Nile virus infections in Europe: Implications for blood safety practices”. Environmental Health: A Global Access Science Source.
232. Simmonds, Peter et al. 2017. „ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae”. Journal of General Virology.
233. Sribu, A. et al. 2011. „Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010”. Eurosurveillance 16(2): 1-5.
234. T., Balenghien et al. 2008. „Vector competence of some French Culex and Aedes mosquitoes for West Nile Virus”. Vector-Borne and Zoonotic Diseases.
235. The Danube Delta Biosphere Reserve (DDBR) <https://www.icr.ro/pagini/the-danube-delta-biosphere-reserve-ddbr>. 2021
236. Tiawsirisup, S. et al. 2008. „Vector Competence of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus and Potential as an Enzootic Vector”. Journal of Medical Entomology.
237. Tingström, Olov et al. 2016. „Detection of Sindbis and Inkoo Virus RNA in Genetically Typed Mosquito Larvae Sampled in Northern Sweden”. Vector-Borne and Zoonotic Diseases.
238. Tomazatos A., 2020 - „Arthropod-borne viruses in Danube Delta: surveillance, phylogeography and vector feeding patterns”, Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, Department of Biology of Hamburg University, Germania;
239. Tomazatos, Alexandru, Stephanie Jansen, Stefan Pfister, Edina Török, Iulia Maranda, Cintia Horváth, et al. 2019. „Ecology of west nile virus in the danube delta, Romania: Phylogeography, xenosurveillance and mosquito host-feeding patterns”. Viruses.
240. Tomazatos, Alexandru, Stephanie Jansen, Stefan Pfister, Edina Török, Iulia Maranda, Cintia Horv, et al. 2019. „Mosquito Host-Feeding Patterns”. : 1-18.
241. Török, Edina et al. 2016. „Pilot longitudinal mosquito surveillance study in the Danube Delta Biosphere Reserve and the first reports of *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 and *Aedes hungaricus* Mihályi, 1955 for Romania”. Parasites and Vectors 9(1): 1-13. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1484-7>.
242. Tsai, T. F. et al. 1998. „West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania”. Lancet.
243. Turell, M. J., J. O. Lundström, și B. Niklasson. 1990. „Transmission of Ockelbo virus by *Aedes cinereus*, *Ae. communis*, and *Ae. excrucians* (Diptera: Culicidae) collected in an enzootic area in central Sweden.” Journal of medical entomology.
244. Vaidyanathan, Rajeev, și Thomas W. Scott. 2006. „Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection”. Apoptosis.
245. Valiakos, G. et al. 2011. „Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010”. Eurosurveillance.
246. Valiakos, George et al. 2013. „West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence”. În Viral Replication,.
247. Vasić, Ana et al. 2019. „Evidence of West Nile virus (WNV) circulation in wild birds and WNV RNA negativity in mosquitoes of the Danube Delta Biosphere Reserve, Romania, 2016”. Tropical Medicine and Infectious Disease 4(3).
248. Vázquez, A. et al. 2011. „Usutu virus - Potential risk of human disease in Europe”. Eurosurveillance.
249. Velasco, María et al. 2020. „Imported human west nile virus lineage 2 infection in Spain: Neurological and gastrointestinal complications”. Viruses.
250. Vilibić-Čavlek, T et al. 2014. „Tick-borne encephalitis virus: Epidemiological and clinical picture, diagnosis and prevention [Virus krpeljnog encefalitisa: Epidemiološka i klinička slika, dijagnostika i prevencija]”. Acta Medica Croatica.
251. Vilibic-Cavlek, T. et al. 2014. „First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak”. Infection.
252. Vogels, Chantal B.F. et al. 2016. „Vector competence of northern European *Culex pipiens* biotypes and hybrids for West Nile virus is differentially affected by temperature”. Parasites and Vectors.

253. Vogels, Chantal B.F., Giel P. Göertz, Gorben P. Pijlman, și Constantianus J.M. Koenraadt. 2017. „Vector competence of European mosquitoes for west Nile virus”. *Emerging Microbes and Infections*.
254. Weissenböck, Herbert et al. 2013. „Usutu virus, Italy, 1996”. *Emerging Infectious Diseases*.
255. Wilkins, Pamela A., Amy L. Glaser, și Sue M. McDonnell. 2006. „Passive transfer of naturally acquired specific immunity against West Nile virus to foals in a semi-feral pony herd”. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
256. Wodak, Eveline et al. 2011. „Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009”. *Veterinary Microbiology*.
257. Wollants, Elke et al. 2018. „Use of next-generation sequencing for diagnosis of west nile virus infection in patient returning to Belgium from Hungary”. *Emerging Infectious Diseases*.
258. Won Jung, Je et al. 2015. „A novel olfactory pathway is essential for fast and efficient blood-feeding in mosquitoes”. *Scientific Reports*.
259. Zaaijer, Hans L. et al. 2019. „Usutu virus infection in Dutch blood donors”. *Transfusion*.
260. Zannoli, Silvia, și Vittorio Sambri. 2019. „West nile virus and usutu virus co-circulation in europe: Epidemiology and implications”. *Microorganisms*.
261. Zehender, 2017. „Reconstructing the recent West Nile virus lineage 2 epidemic in Europe and Italy using discrete and continuous phylogeography”. *PLoS ONE*.
262. Zehender, Gianguglielmo et al. 2011. „Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin”. *Infection, Genetics and Evolution*.
263. Zhou, Yangsheng et al. 2007. „Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase”. *Journal of Virology*.
264. Ziegler, U. et al. 2012. „Monitoring of West Nile Virus Infections in Germany”. *Zoonoses and Public Health*.
265. Ziegler, Ute, Artem Skrypnyk, et al. 2013. „West nile virus antibody prevalence in horses of Ukraine”. *Viruses*
266. Ziegler, Ute, Joke Angenvoort, et al. 2013. „Use of competition elisa for monitoring of west nile virus infections in horses in germany”. *International Journal of Environmental Research and Public Health*.

Anexa 1/Annex 1

Disponerea regiunilor virale de interes în placa 96x96, pentru tehnica RT-PCR Microfluid
Arrangement of viral designs in 96x96 Microfluidic plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Germiston	Saboya+	Kok_II	RVFV	Ndumu	Spond_I	Sindbis	YFV	Middelburg	WN_1B	Zika4	D1
B	Pongola	ONN	Kok_Bai	JEV	KedV	Spond_II	Sind_I	FJ_AO_1	Chik_ECSA	WN_1C	Zika6	D2
C	Orungo	Inkoo	Kok_Tor	JEV_I	BannaVS7	Tahyna	Sind_2_3	FJ_AO_3_6	Chik_IndECSA	WN_2.1	Zika7	D3
D	batai_1	Uganda-NS2B	Kok_Map	JEV_II	Simbu_polyP	EnM_gI	Sind_IV	FJ_AO_4	Chik_Asia	WN_2.2	Zika8	D4
E	batai_2	Ilesha-L	Kok_Strat	JEV_IIIa	Bwamba	EnM_gII	Sind_V	FJ_AC_AE	Chik_Wafri	WN_3	Deng_1	Ross1
F	Ngari	SemlikiForest-I	Nyando_I	JEV_IIIb	Banzi	EnM_gIII	Sind_VI	FJ_AmS_1	ChikV	WN_4	Deng_2	Ross2
G	Barmah Forest	SemlikiForest-II	Nyando_II	JEV_IV	Wesselbron	EnM_gIV	Kout_I	FJ_AmS_2	Zika2	WN	Deng_3	Actine
H	Yaounde_polyP	Kok_I	RVF_SEgS	JEV_V	Usutu	EnM_gV	Kout_II	RossRiver	WN_1A	Zika3	Deng_4	E.Coli

Anexa 2 / Annex 2

Lista virusurilor transmise de țânțari, familia virală, genul și specia, utilizate pentru detecția virală în tehnica RT-PCR Microfluid, placă 96x96
List of mosquito-borne viruses, targets, viral family, genus and species, used for viral detection in 96x96 Microfluidic assay

Familie	Gen	Virus/specie	Abreviere
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Banži	Banži
		Dengue	DENV
		Japanese Encephalitis	JEV
		Kedougou	Kedougou
		Koutango	Kout
		Kokobera virus groupe	Kok
		Murray Encephalitis	EnM_gI
		Spondweni	Spond
		Saboya	Saboya+
		Wesselsbron	Wesselbron
		Yellow fever	YFV
		Zika	Zika
		Usutu	Usutu
		West Nile	WN
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Phlebovirus</i>	Rift Valley fever	RVFV
<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	Batai	batai
		Bwamba/Pongola	Bwa
		Ilesha	ile
		Inkoo	Inkoo
		Ngari	Ngari
		Nyando	Nyando
		Tahyna	Tahy
		Germiston	Germi
		Yaounde	Yaounde
		Simbu	Simbu
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Barmah Forest	Barmah
		Chikungunya	Chik
		Ross River	RRV
		Semliki forest	SemFV
		Sindbis	Sindbis
		O'Nyong-Nyong	ONN
		Middelburg	
		Ndumu	Ndumu

Familie	Gen	Virus/specie	Abreviere
<i>Reoviridae</i>	<i>Seadornavirus</i>	Banna	BannaV
	<i>Orbivirus</i>	Orungo	Orungo
Control intern		<i>Beta-actine</i>	beta-actine
Control intern de inhibiție PCR		<i>Escherichia coli</i>	eae

Anexa 3 / Annex 3

LISTA FIGURILOR

LIST OF FIGURES

Figura 1.1 Structura genomului la flavivirusuri, cu proteinele structurale și nestructurale (talk.ictvonline.org)/ Figure 1.1 Flaviviruses genome organization and the it's structural and non-structural proteins;	31
Figura 1.2: Înrudirea genetică a flavivirusurilor/ Figure 1.2: Genetic relateness of flaviviruses (Lazearlab.org);	32
Figura 1.3 Structura genomului VWN, ce cuprinde ambele tipuri de proteine: structurale și nestructurale (După Lwande ș.a, 2015)/ Figure 1.3 WNV genomic structure, encompassing both structural and non-structural proteins (According to Lwande șet al, 2015);	33
Figura 1.4: Mecanismele de transmitere ale VWN (După Tomazatos A., 2020)/ Figure 1.4 Overview of WNV transmission cycle (According to Tomazatos A., 2020);	36
Figura 1.5 Principalele linii genetice ale VWN (După Chancey ș.a., 2015)/ Figure 1.5 Major WNV lineages (According to Chancey et al., 2015);	37
Figura 1.6 Organizarea genomului VUSU (După Saiz și Blázquez, 2017)/ Figure 1.6 Genomic structure of USUV (According to Saiz și Blázquez, 2017);	43
Figura 1.7: Distribuția virusurilor Usutu (roșu) și WN (verde) la nivelul Europei (După Zannoli și Sambri, 2019)/ Figure 1.7 Geographic distribution of Usutu (red) and West Nile (green) viruses in Europe (Acoording to Zannoli și Sambri, 2019)	45
Figură 1.8 Organizarea genomului la alphavirusuri – Sindbis (După Ong, Lum, și Ng, 2014)/ Figure1.8 Genome organization of alphaviruses – SINV (According to Ong, Lum, and Ng, 2014);	51
Figura 2.1 Distribuția țânțarilor din taxonul <i>Cx.pipiens</i> la nivel European, în luna octombrie, 2020/ Figure 2.1 The current known distribution of the <i>Cx.pipiens</i> group in Europe, in October 2020 (ECDC, EFSA 2020);	54
Figura 2.2: Distribuția țânțarilor din specia <i>Cx.modestus</i> la nivel European, în luna septembrie, 2020/ Figure 2.2: The current known distribution of the <i>Cx.modestus</i> in Europe, in September 2020 (ECDC, EFSA 2020);	56
Figura 2.3 Distribuția țânțarilor din specia <i>Ae.vexans</i> la nivel European, în luna octombrie, 2020/ Figure 2.3 The current known distribution of the <i>Ae.vexans</i> in Europe, in October 2020 (ECDC, EFSA 2020)	57
Figura 2.4 Distribuția țânțarilor din specia <i>Ae.albopictus</i> la nivel European, în luna septembrie, 2020/ Figure 2.4 The current known distribution of the <i>Ae.albopictus</i> in Europe, in September 2020 (ECDC, EFSA 2020);	58
Figura 3.1 Prezentarea schematică a factorilor ce influențează capacitatea vectorială (După Leggewie M., 2016)/ Figure 3.1 Schematic representation of factors involved in vectorial capacity (According to Leggewie M., 2016);	60
Figura 3.2 Etapele transmiterii virusului de către un vector competent (Vector competența): 1) Preluarea virusului o dată cu sângele în momentul hrănirii, 2) infectarea celulelor epiteliale de la nivelul intestinului mediu și replicarea virusului la același nivel, 3) diseminarea virusului la nivelul hemocelului, 4) infecția și replicarea virusului la nivelul țesuturilor periferice, 5) infecția glandelor salivare, 6) descărcarea particulelor virale la nivelul cavităților apicale ale acinilor descărcarea particulelor virale la nivelul cavităților apicale ale acinilor salivari și prezența virusului în salivari și prezența virusului în saliva/ Figure 3.2 Sequential steps in viral transmission (Vector competence): 1) Viral loading during feeding process, 2) infection and viral replication in midgut epithelial cells, 3) viral dissemination to hemolymph, 4the infection of and replication in peripheral tissues, 5) the	62

infection of salivary glands, 6) shedding the viral particles into the apical cavities of acinar cells and its presence in mosquito saliva (According to Azar and Weaver, 2019);	
Figura 3.3 Prezentarea schematică a barierelor anatomice pe care virusul trebuie să le depășească pentru a putea fi transmis (După Grubaugh ș.a., 2016)/ Figure 3.3 Overview of the anatomical barriers involved in virus transmission (According to Grubaugh et al., 2016);	63
Figura 6.1 Zonele de recoltare a probelor incluse în studiu (original)/ Figure 6.1 Collection points for counted for study (original);	75
Figura 6.2 Punctele de prelevare a probelor din Rezervația Biosferei Delta Dunării (Realizată de Mihai Alexe) (original)/ Figure 6.2 Danube Delta Reservation collection points by Mihai Alexe (original);	90
Figura 6.3 Zonele de recoltare a probelor de sânge de la câini (original)/ Figure 6.3 Collection points for dogs blood samples (original)	97
Figura 6.4 Distribuția seroprevalenței în funcție de proveniența probelor/ Figure 6.4 Seroprevalence distribution of samples based on their collection site;	103
Figura 6.5 Distribuția probelor pozitive obținute prin MNT la câinii incluși în studiu (original)/ Figure 6.5 Distribution of positive samples MNT in dogs (original);	107
Figura 7.1 Punctele de colectare, din județul Iași, incluse în studiu în anii 2018 și 2019 (original)/ Figure 7.1 Collection points from Iași county, in 2018 and 2019 (original);	123
Figura 7.2 Punctele de colectare, din județul Tulcea, incluse în studiu în anul 2019 (original)/ Fig.7.2 Collection points from Tulcea county, in 2019 (original);	124
Figura 7.3 Specimene colectate (femele), magnificație WF 10X/20: a) <i>Aedes sticticus</i> ; b) <i>Culex modestus</i> ; c) <i>Aedes vexans</i> ; d) <i>Uranotaenia unguiculata</i> (Original)/ Figure 7.3 Collected specimens, (females) magnification WF 10X/20: a) <i>Aedes sticticus</i> ; b) <i>Culex modestus</i> ; c) <i>Aedes vexans</i> ; d) <i>Uranotaenia unguiculata</i> (Original);	134
Figura 7.4 Specimene colectate (femele) din specia <i>Aedes caspius</i> , magnificație WF 10X/20 (Original)/	134
Figure 7.4 <i>Aedes caspius</i> collected specimens, (females) magnification WF 10X/20 (Original);	
Figură 7.5 Ponderea speciilor de țânțari incluse în studiu/ Figure 7.5 Percentage of analyzed mosquitoes by species;	135
Figura 7.6 Specimene colectate din specia <i>Culex pipiens</i> s.l., magnificație WF 10X/20; a și b femele nehrănite, c) femelă gravidă; d) femelă hrănită (Original)/ Figure 7.6 <i>Culex pipiens</i> s.l.collected specimens, magnification WF 10X/20; a + b) unfed females; c) gravid female; d) blood-fed female (Original);;	136
Figura 7.7 Detecția agenților virali utilizând sistemul BioMark™ dynamic array (cip 96.96)/ Figure 7.7 Viruses detection using BioMark™ dynamic array system (cip 96.96);	138
Figura 7.8 Curba de amplificare pentru confirmarea semnalelor pozitive obținute prin tehnica PCR în timp real microfluid, regiunea 3'NC (a) și regiunea ProC (b) (Probele 140, 216, 223, 224, 257, 353)/ Figure 7.8 Amplification curve for samples 140, 216, 223, 224, 257, 353, region 3'UTR (a) and region ProC (b) (Samples 140, 216, 223, 224, 257, 353);	143
Figura 7.9 Cultură celulară Vero, infectată cu omogenat de țânțari la 4 zile p.i, magnificație 10x (a-proba 129, b-proba135, c-proba 136)/ Figure 7.9 Vero cells 4 dpi, magnification 10x, samples a)129,b)135, c)136;	144
Figura 7.10 Cultură celulară Vero (proba 353), infectată cu omogenat de țânțar la 1 zi (a), 2 zile (b), 3 zile (c) și 6 zile p.i (d), magnificație 10x/ Figure 7.10 Vero cell culture, sample 353, infected with mosquito homogenate at 1dpi (a), 2 dpi (b), 3dpi (c) and 6dpi (d), magnification 10x;	145
Figura 7.11 Aspecte morfologice ale monostratului de celule Vero, proba 224, la 4 zile p.i, magnificație 5X, proba 224 / Figure 7.11 . Morphological aspects of Vero cell culture, infected with mosquito homogenate at 4 dpi, magnification 5X, sample 224	145

Figura 7.12 Aspecte morfologice ale monostratului de celule Vero, probele 257 (A și B) și 223 (C și D) la 4 zile p.i, magnificație 10X / Figure 7.12 Morphological aspects of Vero cell culture, infected with mosquito homogenate at 4 dpi, magnification 10X, samples 257 (A and B) and 223 (C and D)	146
Figura 7.13 Aspectul culturii celulare, linia C6/36, la 5 zile p.i., magnificație 10x (a) celule neinfectate; (b) celule infectate cu omogenatul de țânțari: proba 257 și (c) proba 216 și (d) celule infectate cu supernatant de la celule Vero, proba 353/ Figure 7.13 C6/36 cells infected with mosquito homogenate and Vero cells supernatant, at 5 dpi, magnification 10x (a) uninfected cells; (b) sample 257; (c) sample 216; (d) sample 353;	148
Figura 7.14 Aspectul culturilor celulare infectate cu omogenat de țânțari, magnificație 10x, proba 140. (a) celule linia Vero neinfectate, la 7 zile p.i; (b) celule Vero infectate, la 7 zile p.i; (c) celule linia C6/36 neinfectate la 5 zile p.i; (d) celule linia C6/36 infectate la 5 zile p.i./ Figure 7.14 Vero and C6/36 cells at 5 and 7 days post-infection, sample 140;	149
Figura 7.15 Profilul electroforetic al ampliconilor RT-PCR, pentru detecția VSIN, la 20 și 30 minute la 100V/ Figure 7.15 Electrophoretic profile of RT-PCR amplicons for detection of SINV, at 20 and 30 minutes at 100V;	150
Figura 7.16 Profilul electroforetic al produșilor RT-PCR / Figure 7.16 Electrophoretic profile of RT-PCR products;	151
Figura 7.17 Arbore filogenetic generat prin alinierea secvențelor obținute cu cele omoloage din baza de date GenBank (tulpinile VWN obținute în acest studiu sunt evidențiate prin buline: alb și negru) / Figure 7.17 Phylogenetic tree based on the alignment of the generated sequences with the best hits to our sequences in GenBank (the mosquitoes WNV strains obtained in our study are highlighted through dark and white dots);	152

Anexa 4 / Annex 4

LISTA TABELELOR

LIST OF TABLES

Tabel 6.1/ Table 6.1 Numărul de probe și variabilele incluse în studiu/ Number and variables included in study;	76
Tabel 6.2/Table 6.2 Valorile de referință pentru raportul S/P pentru interpretarea rezultatelor / Reference values of the S/P ratio for results interpretation;	78
Tabel 6.3/Table 6.3 Sușele virale și diluțiile necesare pentru seroneutralizare/Viral strains used for seroneutralisation test;	80
Tabel 6.4/Table 6.4 Numărul total de probe ELISA pozitive în județele incluse în studiu / Number of ELISA positive samples by county;	82
Tabel 6.5/Table 6.5 Rezultatele obținute prin ELISA, în funcție de variabile / ELISA results according to variables considered in study;	83
Tabel 6.6/Table 6.6 Titrul anticorpilor anti-VWN obținuți în urma testării prin MNT a probelor pozitive prin ELISA / Anti WNV antibodies titre resulted after MNT testing;	84
Tabel 6.7/Table 6.7 Rezultatele pozitive obținute în urma testării prin MNT, în funcție de variabilele incluse în studiu / MNT positive results based on studies variables	84
Tabel 6.8/Table 6.8 Titrul comparativ al anticorpilor pentru probele pozitive pentru VWN și VUSU, prin testul de virus microneutralizare / Comparable antibodies titre in positive samples for WNV and USUV, by MNT;	85
Tabel 6.9/Table 6.9 Speciile, genul și statusul păsărilor sălbatice luate în studiu / The bird species and their migratory status;	92
Tabel 6.10/Table 6.10 Seroprevalența obținută în funcție de statusul păsărilor / Seroprevalence obtained according to bird status;	93
Tabel 6.11/Table 6.11 Exemplele sălbatice din RBDD depistate pozitive pentru West Nile prin ELISA de competiție și rezultatul corespunzător prin virus neutralizare (VNT) / Wild birds tested positive for WNV by ELISA and VNT;	94
Tabelul 6.12/ Table 6.12 Zonele de recoltare și proveniența probelor de sânge de la câini / Collection points for dogs blood samples;	97
Tabel 6.13/ Table 6.13 Numărul și proveniența probelor incluse în prima etapă a studiului / The number and origin of the tested samples;	98
Tabel 6.14 /Table 6.14 Numărul și proveniența probelor incluse în a doua etapă a studiului / Number and the source of the samples tested in the second part of the study;	99
Tabel 6.15/Table 6.15 Repartiția pe sexe a câinilor incluși în studiu / Distribution per sexes of tested samples;	100
Tabel 6.16/Table 6.16 Repartiția pe categorii de vârstă a câinilor incluși în studiu / Distribution per age of tested samples;	100
Tabel 6.17/Table 6.17 Distribuția pe categorii de talie a probelor testate / Distribution per breeding size of tested samples;	100
Tabel 6.18/Table 6.18 Distribuția probelor testate în funcție de gradul de expunere / Distribution of tested samples by exposure;	101
Tabel 6.19/Table 6.19 Probe suplimentare analizate în cadrul studiului / Additional samples tested during the study;	101
Tabel 6.20/Table 6.20 Testarea fidelității rezultatelor obținute în urma testării prin metoda imunoenzimatică ELISA, utilizând două kit-uri de detecție / Fidelity of the results obtained after testing by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, using two different detection kits;	103

Tabel 6.21/ Table 6.21 Seropozitivitatea animalelor pe baza caracteristicilor individuale / Animals seropositivity based on their individual characteristics;	104
Tabel 6.22/ Table 6.22 Distribuția probelor în funcție de variabilele individuale / Samples distribution based on individual variables;	105
Tabel 6.23/ Table 6.23 Valorile titrurilor anticorpilor neutralizanți împotriva virusurilor West Nile și Usutu la câini din județe din estul României / Neutralizing antibodies titre against WNV and VUSU in dogs from Eastern side of Romania;	106
Tabel 6.24/ Table 6.24 Seroprevalența (%) și intervalul de confidență (95%) pe județe obținute prin tehnica MNT la probele de câini / MNT seroprevalence (%) distribution in counties and confidence interval (95%) in dogs serum samples;	107
Tabel 6.25/ Table 6.25 Seroprevalența obținută la câini, în studii conduse la nivel mondial / Dogs seroprevalence obtained in worldwide studies;	108
Tabel 6.26/ Table 6.26 Comorbiditățile pacienților incluși în studiul pentru detecția arbovirusurilor (După Lindsey ș.a., 2012) / Comorbidities of tested patients (After Lindsey et al. 2012);	114
Tabel 6.27/ Table 6.27 Caracterele demografice ale pacienților incluși în studiu / Demographic characters of tested patients;	114
Tabel 6.28/ Table 6.28 Distribuția numărului de pacienți incluși în studiul retrospectiv, în funcție de categoria de vârstă și gen / Number and distribution of retrospectively tested patients, according to age and gender;	115
Tabel 6.29/ Table 6.29 Date privind probele pozitive pentru detecția anticorpilor IgM anti-WNV / Data regarding positive samples for anti-WNV IgM;	117
Tabel 7.1/ Table 7.1 Repartiția în <i>pool</i> -uri a speciimenelor hrânite / The distribution in pools of bloodfed specimens;	125
Tabel 7.2/ Table 7.2 Primeri folosiți pentru amplificarea genelor specifice virusului West Nile / Primer sets used for specific WNV amplification;	128
Tabel 7.3/ Table 7.3 Setul de primeri utilizați pentru amplificarea și secvențierea genei specifice VWN / Primer sets used for specific amplification and sequencing of WNV;	132
Tabel 7.4/ Table 7.4 Setul de primeri utilizați pentru amplificarea genei specifice ale VSIN / Primer sets used to amplify specific region of SINV;	132
Tabel 7.5/ Table 7.5 Numărul total de țânțari colectați și ponderea lor pe specie / Total number of collected specimens by species and their proportion;	135
Tabel 7.6/ Table 7.6 Abundența și dinamica lunară a speciilor incluse în studiu / Mosquito abundance and monthly dynamics;	137
Tabel 7.7/ Table 7.7 Diversitatea și distribuția speciilor de țânțari analizate, din anul 2019 / Diversity and distribution of adult mosquitoes of six species collected at seven study sites in 2019;	139
Tabel 7.8/ Table 7.8 Diversitatea și distribuția speciilor de țânțari analizate, din anul 2018 / Diversity and distribution of adult mosquitoes of six species collected at seven study sites in 2018;	139
Tabel 7.9/ Table 7.9 Rata minimă a infecției pentru țânțarilor pe specie, perioadă și județ / Minimal infection rate for WNV per species, time span and county;	140
Tabel 7.10/ Table 7.10 Numărul de specimene colectate per punct de colectare (N), numărul de țânțari testați (Nt), numărul de <i>pool</i> -uri testate (Np) și numărul de <i>pool</i> -uri pozitive pentru virusurile West Nile și Sindbis / Collected specimens per sites (N), number of tested mosquitoes (Nt) and tested pools (Np) and WNV and SINV positive pools;	142
Tabel 7.11/ Table 7.11 Validarea rezultatelor obținute prin tehnica PCR în timp real microfluid, prin amplificarea regiunilor de interes din genomul VWN prin duplex PCR în timp real / Microfluidic RT rtPCR results confirmation by RT-rtPCR;	143
Tabel 7.12/ Table 7.12 Tipul de inocul viral și rezultatele obținute în urma amplificării în timp real / Type of viral inoculum and the real-time PCR results;	147

Tabel 7.13/ Table 7.13 Tipul de inocul viral pentru al doilea pasaj pe linia C6/36 și rezultatele obținute în urma amplificării în timp real / Type of viral inoculum for the second passage on C6/36 cells and the real-time PCR results; **148**

LISTA ABREVIERILOR ABBREVIATIONS

Abreviere	Descrierea completa
▪ 100 TCID ₅₀	100 tissue culture infective dose;
▪ ADN	Acid dezoxiribonucleic;
▪ ADNc	Acid dezoxiribonucleic complementar;
▪ <i>Ae. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i> ;
▪ <i>An.</i>	<i>Anopheles</i> ;
▪ ANPM	Agentia Nationala pentru Protectia Mediului; Departamentul pentru Sănătatea Animală, Unitatea de Virusologie, din
▪ ANSES	cadrul Agenției naționale pentru siguranța sanitară a alimentelor, mediului și muncii, Maisons-Alfort, Franța;
▪ ANSVSA	Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor;
▪ ARN	Acid ribonucleic;
▪ BLAST	Basic Local Alignment Search Tool;
▪ bp	Base pairs (perechi de baze);
▪ BSL3	Nivel de biosecuritate 3 ;
▪ Cf	Concentrația finală;
▪ Ci	Concentrația inițială;
▪ Ct	Threshold cycle (ciclul prag);
▪ CV	Coeficientul de variație ;
▪ <i>Cx.</i>	<i>Culex</i> ;
▪ <i>Cx.pipiens</i> s.l.	<i>Culex pipiens</i> sensu lato;
▪ DDBR	Danube Delta Biosphere Reserve (Rezervația Biosferei Delta Dunării);
▪ ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
▪ ECP	Efect citopatic;
▪ EFSA	European Food Safety Authority (Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară);
▪ EIP	Extrinsic incubation period (perioada de incubare extrinsecă);
▪ ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (reacția imunoenzimatică ELISA);
▪ EWN	Encefalita West Nile;
▪ FMV-IS	Facultății de Medicină Veterinară Iași ;
▪ FWN	Febră West Nile;
▪ IgG	Imunoglobulina G;
▪ IgM	Imunoglobulina M;
▪ IMED	Institutul de Infecțiologie, Friedrich-Loeffler, Germania;
▪ IP	Inhibition percentage (procentului de inhibiție);
▪ M	Micromolar;
▪ MAb	Monoclonal antibody (anticorp monoclonal);
▪ MIR	Minimum infection rate (rata minimă a infecției);
▪ MNT	Testul de virus micro-neutralizare;
▪ MWN	Meningita West Nile;
▪ NS	non-structural protein (proteine nestructurale);
▪ nt	Nucleotide;
▪ NTR	Regiuni netraduse;
▪ OAS1	Oligoadenilat sintetaza
▪ OD	Densitatea optică

▪ OIE	Oficiul Internațional al Epizootiilor
▪ OMS	Organizația Mondială a Sănătății
▪ ORF	Open reading frame (cadru deschis de citire)
▪ P	Pearson's correlation
▪ p.i	Post-infecție
▪ PCR	Polymerase chain reaction (reacția de polimerizare în lanț)
▪ pr-E	Proteina de înveliș
▪ prM/M	Proteina premembranară/membranară
▪ PWN	Poliomielita cu virus West Nile
▪ rRT-PCR	Real time reverse transcription-polymerase chain reaction
▪ RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction (revers transcripție PCR)
▪ RU	Unităților relative
▪ s.l	Sensu lato
▪ spp	Species
▪ TBE	Tick-borne encephalitis (encefalita de căpușă);
▪ TBEV	Tick borne encephalitis virus (virusul encefalitei de căpușă)
▪ UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (Organizația Națiunilor Unite pentru Educație, Știință și Cultură);
▪ UTR	Regiune necodantă
▪ VBAT	Virusul Batai
▪ VCHIK	Chickungunya
▪ VDEN	virusul Dengue
▪ VESL	virusul Encefalitei St. Louis
▪ Vf	volumul final
▪ Vi	volumul inițial
▪ VINK	Virusul Inkoo
▪ VLED	Virusul Lednice
▪ VNT	Testul de virus neutralizare
▪ VSIN	Virusul Sindbis
▪ VTAH	Virusul Tahyna
▪ VUSU	Virusul Usutu
▪ VWN	Virusul West Nile
▪ μl	Microlitri
▪ F	Femelă
▪ M	Mascul
▪ Rz	Rezident
▪ Mg	Migrator
▪ RdRp	ARN polimeraza-ARN dependentă
▪ N	Numărul de țânțari testați
▪ Nt	Numărul de <i>pool</i> -uri testate
▪ Np	Numărul de <i>pool</i> -uri pozitive pentru virusurile West Nile și Sindbis

LISTA LUCRĂRILOR LIST OF PUBLICATIONS

Prim-autor – Lucrări științifice indexate BDI

- **Crivei Luciana Alexandra**, Rățoi (Anton) I., Anița A., Savuța G., Oșlobanu L., 2018, West Nile virus infections in Romania after the 2010 outbreak- a retrospective study in human and animal population, *Lucrări Științifice*, Vol. 60, *Medicină Veterinară*, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași.
- **Crivei Luciana Alexandra**, Rățoi (Anton) I., Răileanu C., Porea D., Anita D., Savuta G., Oslobanu L., (2018) - First Record of West Nile Virus Specific Seroconversion in Dogs from Eastern Romania. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* 75(2), Cluj-Napoca.
- **Crivei Luciana Alexandra**, Oslobanu L., Anita A., Anita D., Rățoi (Anton) I., Cozma A., Crivei I. (2019) - Preliminary data regarding seroprevalence and risk factors associated with west nile virus infection in horses in Eastern Romania. *Bulletin USAMV Veterinary Medicine*, Timișoara.

Co-autor - Lucrări științifice indexate ISI

- Vasić A., Zdravković N., Aniță D., Bojkovski J., Marinov M., Mathis A., Niculaua M., Oșlobanu L. E., Pavlović I., Petrić D., Pflüger V., Pudar D., Savuța G., Simeunović P., Veronesi E., Silaghi C., SCOPES AMSAR training group: Anton I. A., **Crivei L. A** ș.a., 2019, - Species diversity, host preference and arbovirus detection of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Serbia. *Parasites & vectors*, 12(1), 61. IF = 3,163.
- Porea Daniela, Anita A., Vata A., Teodor D., **Crivei L.**, Raileanu C., Gotu V., Ratoi I., Cozma A., Anita D., Oslobanu L., Pavio N., Savuta G. (2020) „Common European Origin of Hepatitis E Virus in Human Population from Eastern Romania”. *Frontiers in Public Health*”. *Frontiers in Public Health*. IF = 2,483.

Co-autor – Lucrări științifice indexate BDI

- Rățoi I. A. (Anton), **Crivei L. A.**, Oșlobanu L. E., Diculencu D., Savuța G., 2018, Preliminary data regarding the nontuberculous mycobacteria isolation from clinical specimens, from human patients, in Iași County, Vol. 75(1), *Veterinary Medicine*, *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*.
- Rățoi I. A. (Anton), Michelet L., **Crivei L. A.**, Oșlobanu L. E., Aniță A. E., Boschioli M. L., Savuța G., Diversity of nontuberculous mycobacteria isolated

- from animal samples, *Lucrări Științifice*, Vol. 61, *Medicină Veterinară*, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu De La Brad”, Iași.
- Vasić A, Oşlobanu LE, Marinov M, **Crivei L.A**, Răţoi IA, Aniţă A, Aniţă D, Doroşencu A, Alexe V, Răileanu Ş, Simeunović P, Raileanu C, Falcuța E, Prioteasa FI, Bojkovski J, Pavlović I, Mathis A, Tews Ba, Savuța G, Veronesi E, Silaghi C, SCOPES AMSAR training group, 2019, Evidence of West Nile Virus (WNV) Circulation in Wild Birds and WNV RNA Negativity in Mosquitoes of the Danube Delta Biosphere Reserve, Romania, 2016. *Trop Med Infect Dis.* 4(3), doi:10.3390/tropicalmed4030116.
 - Răţoi I.A., Cozma A. P., Dascălu M. A., **Crivei L. A.**, Brătuleanu B., Oşlobanu L., Aniţă D., Aniţă A., Savuța G., 2019 Bolile transfrontaliere la animale - o permanentă provocare!, *Lucrări Științifice - Medicină Veterinară*, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, vol 54, p. 58-68 .
 - Raţoi I. A., **Crivei L.**, Porea D., Dascalu A., Cozma A., Oşlobanu L., Anița D., Anița A., Savuța G., Preliminary seroepidemiological investigation regarding M. avium infection in wild boars and foxes, The 18th International Conference "Life Sciences for Sustainable Development", 6th– 28th September, 2019, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine from Cluj-Napoca.
 - Crivei Ioana Cristina, **Crivei L.**, Radu L., Carp-Carare C (2018). Mobile management & monitoring system for cattle reproduction. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, Timișoara.
 - Anița D., Răileanu C., Oşlobanu L., **Crivei L.**, Savuța G., Anița A., (2018) - Detection of BHV-1 antibodies in bovine raised in rural households from Iași County., *Universitea de Științ Agricole și Medecină Veterinară “Ion Ionescu de la Brad” de la Iasi*.
 - Cozma A, Maciuca I., **Crivei L.**, Carp-Carare C., Rimbu C., Anita A., Anita D., Timofte D (2018) Characterisation of phylogenetic background of faecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, Timișoara.