

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

Drd. LUDU (căs. OȘLOBANU) ELENA LUANDA

REZUMAT

CERCETĂRI EPIDEMIOLOGICE PRIVIND VIRUSUL WEST NILE ÎN ROMÂNIA

**Teză pentru obținerea titlului științific de
„ Doctor în Medicină Veterinară”**

**Conducător științific,
Prof. Univ. Dr. PERIANU TUDOR**

**Iași
~2010~**

REZUMAT

Encefalita (febra) West Nile este o infecție arbovirală reemergentă, cu caracter zoonotic, care afectează ecvinele, omul și păsările determinând manifestări clinice ce variază ca intensitate de la cazuri asimptomatice până la meningoencefalite grave, uneori mortale.

Teza de doctorat intitulată „ **Cercetări epidemiologice privind virusul West Nile în România**” este extinsă pe 202 de pagini și este structurată, în conformitate cu prevederile legale actuale în două părți principale: prima parte intitulată „**Stadiul actual al cunoașterii**” este elaborată pe parcursul a 55 de pagini și conține 5 tabele și 14 figuri iar partea a doua „**Contribuții personale**” cuprinde 120 pagini, 36 de tabele și 46 de figuri, pentru o mai bună reprezentare și sintetizare a conținutului.

Prima parte este alcătuită din trei capitole în care sunt prezentate succint informații din literatura de specialitate referitoare la subiectul tezei și utilizate ulterior, în partea a doua a tezei ca referințe în interpretarea și discutarea rezultatelor obținute.

În primul capitol, intitulat „ **Virusul West Nile – istoric și importanță** ”, sunt prezentate date din literatura de specialitate referitoare la primele descrieri ale bolii și ale agentului etiologic, la istoricul evoluției virusului West Nile și importanța afecțiunilor pe care le determină. Agentul etiologic al encefalitei West Nile este reprezentat de virusul omonim, denumit astfel după locul în care a fost izolat pentru prima oară, districtul West Nile, Uganda (Africa de Est). În prezent repartiția virusului este vastă, semnalându-se în Africa, Europa, Orientul Mijlociu, în Asia Centrală și de Vest, Oceania și mai recent în America de Nord .

Începând cu anul 1996, anul în care s-a declarat prezența sa în România, virusul a devenit o problemă de sănătate publică și de supraveghere veterinară în Europa, în bazinul Mediteranean și mai târziu în SUA, unde epidemiile și epizootiile semnalate în populațiile de oameni și cabaline odată cu prima introducere a virusului în emisfera vestică au avut efecte dramatice.

Al doilea capitol intitulat „**Etiologie patogeneză și epidemiologie**”, este structurat în trei subcapitole în care sunt prezentate date referitoare la morfologie și încadrare filogenetică și particularitățile virusului, mecanismele patogenetice și ale răspunsului imun, accentuându-se pe importanța factorilor care influențează apariția bolii precum și o trecere în revistă a epidemiologiei infecțiilor determinate de virusul West Nile în lume și în România urmărindu-se toate aspectele epidemiologice caracteristice.

În ceea ce privește evoluția infecțiilor determinate de virusul West Nile în România, în perioada iulie - octombrie 1996, o epidemie de febra West Nile s-a înregistrat în zona de sud (în București și în lunca Dunării), aceasta a determinând apariția a sute de cazuri de îmbolnăvire la oameni, manifestate prin forma evolutivă neurologică - encefalita West Nile. În cazul acestei epidemii s-a înregistrat o rată a mortalității de aproximativ 10%. În octombrie 1996, anchete epidemiologice, entomologice, ornitologice și de mediu au fost realizate în București dar și în zonele rurale adiacente demonstrând că țânțari din genul *Culex P. pipiens* au fost unicii vectori ai epidemiei, fapt confirmat și de izolarea ulterioară a VWN, serotipul RO97-50, în urma recoltării de *Culex P. pipiens* prin aspirare de pe zidurile și tavanul unei case de lemn localizate în apropierea centrului orașului.

În ultimul capitol al primei părți intitulat „**Aspecte clinice, diagnostic, tratament și prevenție**” sunt descrise formele de manifestare clinică a infecțiilor cu virusul West Nile, metodele de diagnostic disponibile la ora actuală, precum și măsurile de profilaxia și combatere adoptate, punându-se accent în cadrul descrierii metodelor de profilaxie specifică, pe studiul utilizării în vaccinurilor vectoriale și în particular a celor bazate pe vectori lentivirali

Astfel s-a constatat că severitatea semnelor clinice în cazul infecțiilor determinate de virusul West Nile este influențată de mai mulți factori: vârsta, condițiile de creștere, virulența tulpinii virale și susceptibilitatea genetică a gazdei (Perianu T., 2006) iar manifestările clinice încadrează deopotrivă această maladie în cadrul arbovirozelor cu manifestări pseudogripale dar și în cadrul celor cu tropism visceral sau neurologic (encefalite și encefalomielite). La păsări boala evoluează asimptomatic în majoritatea cazurilor, în timp ce la oameni și cabaline simptomatologia poate varia de la o evoluție insidioasă sau un sindrom gripal, până la o meningoencefalită mortală. Faptul că semnele clinice specifice lipsesc îngreunează diagnosticul și semnalarea bolii (Steinman și col., 2002).

În afară de păsări sau cabaline și alte vertebrate sunt susceptibile la infecția cu virusul West Nile. Anticorpi anti-VWN au fost decelați la cel puțin 30 de specii diferite: animale de rentă, animale de companie și animale sălbatice. Seroprevalența pare să fie mai crescută în regiuni în care circulația virusului a fost detectată mai demult.

Diagnosticul de laborator este necesar având în vedere evoluția adesea subclinică sau asimptomatică a infecției și semnele clinice nespecifice iar testele serologice rămân principalele metode de diagnostic a infecției cu VWN. Testul serologic etalon este seroneutralizarea în plăci, utilizat atât pentru confirmarea infecției cât și aprecierea titrului anticorpilor neutralizanți specifici virusului West Nile, din ser sau din lichid cerebro-spinal. Virusul West Nile poate fi izolat pe culturi celulare și prin titrare în plăci iar identificarea se realizează prin „reverse-transcription polymerase chain reaction” (RT-PCR), real-time RT-PCR, teste de detecție a antigenelor, metode imunohistochimice.

Până în urmă cu 10 ani, controlul invaziei țânțarilor a fost singura strategie aplicată pentru a preveni și controla diseminarea virusului, însă frecvența crescută și gravitatea infecției în timpul ultimului deceniu a condus la producerea a numeroase vaccinuri împotriva VWN care sunt în diferite faze ale testării sau au obținut licență de comercializare (vaccinuri de uz veterinar - doar în SUA). Deși vaccinarea poate controla difuzibilitatea infecției în populațiile de ecvine, în România nu există un vaccin de uz veterinar disponibil.

O nouă generație de vaccinuri vectoriale printre care și vaccinurile bazate pe vectori lentivirali, devin din ce în ce mai utilizate în vaccinologie, deoarece au capacitatea de a induce un răspuns imun de calitate și constituie o alternativă de prevenire a multor boli la animale. Vaccinuri vectoriale (cu vector lentiviral sau rubeolic) determină o imunitate protectivă la șoareci în urma infecției experimentale cu virusul West Nile (Iglesias și col. 2006; Despres și col, 2005).

Pe parcursul capitolului IV intitulat „**Scopul și obiectivele cercetărilor**”, sunt subliniate premisele realizării tezei. Scopul cercetărilor este acela de a evalua situația epidemiologică referitoare la prezența și diseminarea virusului West Nile în România, monitorizarea zonelor cu risc crescut de urgență a infecției, pentru a putea cunoaște mai îndeaproape statusul imunitar al cabalinelor și al altor specii care reprezintă indicatori ai prezenței virusului West Nile și o primă santinelă în vederea supravegherii virusului în populația umană, precum și stabilirea unor metode eficiente de diagnostic și monitorizare a infecției, disponibile rapid în caz de suspiciune.

Obiectivele principale urmărite pe parcursul cercetărilor sunt reprezentate de implementarea în laborator a tehnicilor de diagnostic și protocoalelor de lucru utilizate în mod curent în supravegherea circulației virusului West Nile în alte țări precum și testarea și validarea unor noi metode de diagnostic, realizarea unei anchete sero-epidemiologice referitoare la infecția cu virusul West Nile la cabaline din județele situate în bazinul inferior al Dunării și la păsări sălbatice și domestice din Delta Dunării, elaborarea unei noi metode ELISA indirectă pentru diagnosticul serologic al infecțiilor determinate de virusul West Nile la cabaline și elaborarea și

testarea unui vaccin bazat pe vectori lentivirali capabil să protejeze cabalinele împotriva infecțiilor determinate de virusul West Nile.

Capitolul V intitulat „**Cercetări privind metodologia de diagnostic în infecțiile cu virusul West Nile**”, este structurat în două subcapitole. În primul subcapitol este sunt descrise pe larg metodele serologice utilizate pentru diagnosticul de rutină al infecțiilor determinate de virusul West Nile (testul *ID Screen® West Nile indirect*, testul *MAC ELISA*, tehnicile de seroneutralizare) și cercetările realizate în vederea evaluării reproductibilității testului ELISA indirect. Astfel, testarea comparativă a unui număr de 76 de probe utilizând testul *ID Screen® West Nile indirect*, efectuată în două laboratoare diferite (USAMV Iași și UMR 1161 Alfort Franța) a dovedit o reproductibilitate a testelor realizate în România de 94,45% . De asemenea sunt descrise cercetările realizate în vederea validării a două teste comercial: un test rapid de diagnostic la cabaline *ImmunoComb* produs de Biogaled Laboratories și un test ELISA de competiție (*ID Screen® West Nile Competition*) în vederea utilizării pentru diagnosticul serologic la păsări. Testările utilizând kitul de diagnostic rapid ELISA „WNV-ImunnoComb-Equine West Nile Virus Antibody Test Kit”, fabricat de Biogal Galed aplicat pe probe testate în prealabil prin seroneutralizare a dovedit o sensibilitate de 97,67% și o specificitate de 95,55%. În ceea ce privește kitul ELISA *ID Screen® West Nile Competition*, acesta s-a dovedit specific, rezultatele obținute în urma testării serurilor de păsări fiind în concordanță cu rezultatele testului de seroneutralizare, demonstrând că metoda se pretează unui examen de acuratețe în laboratoare cu un grad mic de securitate și facilitând diagnosticul serologic în condiții de securitate de grad I al infecțiilor determinate de virusul West Nile la păsări.

Al doilea subcapitol prezintă cercetări privind metodele de diagnostic virusologic al infecțiilor determinate de virusul West Nile, respectiv evidențierea efectului citopatogen pe culturi celulare. Prezența infecțiilor cu virusul West Nile la animale și păsări din regiunea studiată, semnalată inițial prin investigații serologice a fost confirmată prin examen virusologic, în culturi celulare obținându-se un efect citopatogen pentru 4 probe din organe de ciori și pentru 1 probă de țânțari.

În capitolul VI intitulat „**Observații privind prezența și diseminarea virusului West Nile în România**” sunt descrise metodele de lucru, materialele utilizate și rezultatele obținute în urma efectuării unor anchete epidemiologice privind infecția cu virusul West Nile în intervalul 2006-2008, la cabaline din județe situate în bazinul inferior al Dunării și la păsări domestice și sălbatice (considerate rezervoare naturale ale virusului) precum și de la alte specii nereceptive în mod natural la infecția cu acest virus, dar care în urma contactului cu virusul West Nile suportă seroconversie specifică.

În cadrul cercetărilor au fost prelevate un număr de 1701 probe de sânge de la cabaline dintre care un număr de 1488 probe au fost testate serologic pentru punerea în evidență a IgG anti-virusul West Nile iar 69 de probe au fost analizate și pentru decelarea IgM.

Rezultate obținute au subliniat faptul că seroprevalența se menține la niveluri ridicate în cadrul populațiilor de cabaline provenind din județele plasate în zone în care prezența vectorilor țânțari și condițiile climatice facilitează întreținerea virusului în natură Brăila, Galați și Tulcea.

În urma testării probelor recoltate de la păsări utilizând testele de seroneutralizare și testul ELISA de competiție se poate aprecia o prevalență medie de 2,7 % respectiv 12 probe pozitive dintr-un total de 378 analizate. Cel mai mare număr de probe pozitive s-a obținut la serurile provenite de la *Corvidee*, și *Passeriforme* ceea ce concordă cu datele din literatura de specialitate. Testările realizate la rumegătoare au evidențiat o seroprevalență globală de 5,10%.

Capitolul VII intitulat „**Elaborarea și testarea unei metode ELISA pentru diagnosticul serologic al infecțiilor determinate de virusul West Nile**”, prezintă materialele și metodele utilizate în vederea elaborării unei noi metode ELISA indirectă, bazată pe utilizarea ca și antigen pentru captușirea microplăcilor a unei secvențe genetice recombinante ce codează proteina anvelopei (E) virusului West Nile, proteina cu cel mai important rol în imunogenitate. În continuare sunt descrise rezultatele obținute ca urmare a perfecționării noului protocol de lucru și valorile intrinseci estimate pentru aceste. Valorile intrinseci ale noii metode indirectă ELISA au fost raportate la rezultatele obținute în urma testării serurilor utilizând testul de seroneutralizare, estimându-se o sensibilitate de 92,3% și o specificitate de 100%.

Capitolul VIII, intitulat „**Cercetări privind elaborarea unui vaccin vectorial destinat utilizării în imunoprofilaxia infecției cu virusul West Nile la cabaline**” supune atenției descrierea cercetărilor ce au urmărit obținerea unui vector lentiviral în care este inserată transgena ce codează pentru proteina E a virusului West Nile, folosit ulterior pentru elaborarea unui nou vaccin destinat imunoprofilaxiei infecției cu virusul West Nile la cabaline. În același capitol sunt prezentate testările preliminare *in vitro* și *in vivo* pentru evaluarea calității vaccinului și capacității imunogene și se remarcă faptul că răspunsul obținut în urma imunizării șoarecilor cu noul vaccin bazat pe vectori lentivirali a fost puternic și a asigurat o protecție stabilă în timp, fără a periclita sănătatea și statusul fiziologic normal al animalelor de laborator, aspecte ce sunt comparabile cu cele descrise în literatura de specialitate.

În final, în capitolul IX intitulat „**Cercetări privind testarea imunogenității vaccinului vectorial la cabaline**”, este descris protocolul de lucru și rezultatele obținute în cadrul unui studiu ce a urmărit evaluarea cineticii răspunsului imun în urma inoculării experimentale a vaccinului la cabaline. Testarea a fost realizată inițial într-o fază pilot, pe un grup de patru cabaline, urmărindu-se stabilirea dozei optime pentru inoculare, pentru ca într-o etapă ulterioară

să se realizeze o testare a vectorului în comparație cu un vaccin comercial iar rezultatele obținute la cabalinele vaccinate relevă faptul ca animalele au dezvoltat un răspuns imun umoral împotriva virusului West Nile, cu o evoluție ce corespunde dozei administrate. În ceea ce privește comparația cu răspunsul imun obținut la cabalinele cărora li s-a administrat vaccinul comercial *Recombitek® Equine West Nile virus vaccine*, începând cu ziua a 14-a post vaccinare s-a înregistrat apariția unui răspuns imun net superior la animalele imunizate cu noua variantă de vaccin.

În cadrul capitolului X „**Concluzii finale**” sunt redactate un număr de 23 de concluzii desprinse în urma realizării cercetărilor.

Concluzionând se poate afirma infecțiile determinate de virusul West Nile trebuie supravegheate într-un mod continuu iar circulația agentului patogen trebuie rapid detectată, astfel încât autoritățile sanitare să poată implementa măsuri protective având în vedere implicațiile infecției în sănătatea animală dar și în sănătatea publică, ca zoonoză emergentă.