

REZUMAT

Virusul hepatitei E (VHE) este agentul cauzal al unei hepatite acute cu evoluție autolimitantă la om și a unei infecții subclinice la animale. În Europa, atât la om, cât și la animale, cel mai frecvent genotip identificat este VHE-3. Dovezile directe au arătat că VHE de la suine și cerb au caracter zoonotic iar cele indirecte au arătat că în plus față de acestea, tulpini VHE de la iepure și probabil de la șobolan pot fi asociate cu infecția zoonotică. În România, există o necesitate în ceea ce privește identificarea și caracterizarea tulpinilor VHE circulante la om și animale. Caracterizarea tulpinilor VHE circulante în țara noastră și analiza filogenetică a acestora poate contribui la estimarea rolului animalelor în epidemiologia infecției cu VHE la om.

Teza de doctorat cu titlul **“Cercetări epidemiologice și etiologice privind infecția cu virusul hepatitei E la animalele sălbatice și evaluarea riscului zoonotic al acesteia”** este structurată, conform normelor în vigoare, în două părți principale: partea I, denumită **“Stadiul actual al cunoașterii”** ce include un număr de 34 de pagini în care sunt prezentate date extrase din literatura de specialitate cu privire la infecția cu VHE și partea a II-a, intitulată **„Contribuții personale”** în care sunt expuse rezultatele cercetărilor efectuate pe parcursul perioadei de studii doctorale. Aceste părți sunt completate, conform aceluiași norme, cu introducerea, rezumatul și lista surselor bibliografice.

Prima parte, **“Stadiul actual al cunoașterii”**, este structurată în patru capitole și subcapitolele asociate acestora, în care au fost prezentate informațiile extrase din literatura de specialitate cu privire la agentul etiologic și infecțiile produse de acesta la om și animale, situația epidemiologică a infecției cu VHE la animalele sălbatice, stadiul cunoașterii în România, precum și date referitoare la caracterul zoonotic al infecției cu VHE și epidemiologia infecției cu VHE la om asociată tulpinilor VHE zoonotice.

Primul capitol, cu titlul **“Date bibliografice privind infecția cu virusul hepatitei E”**, descrie în primele două subcapitole date legate de agentul etiologic și dinamica infecțiilor produse de acesta la om și animale. În subcapitolele ulterioare sunt prezentate date cu privire la diagnosticul infecției cu VHE și măsurile de profilaxie și combatere ale acesteia. Sintetizarea datelor cuprinse în acest capitol arată că VHE este un virus de tip ARN, monocatenar, nesegmentat cu polaritate pozitivă, ce cuprinde trei cadre deschise de citire (ORF 1-3). Virusul hepatitei E este singurul membru al familiei *Hepeviridae* în care au fost desemnate genotipuri și subtipuri pentru încadrarea diverselor tulpini de virus izolate de la om și animale. Dintre acestea, genotipurile 1-4 sunt considerate genotipuri majore, ultimele două având caracter zoonotic. Cea mai importantă problemă cu privire la izolarea *in vitro* a VHE o reprezintă lipsa unui sistem eficace de culturi celulare pentru propagarea acestuia, ceea ce explică modalități de transmitere insuficient cunoscute, mecanisme patogenetice neelucidate, limitarea studiilor de virulență și a celor de elaborare a vaccinurilor.

Capitolul II, intitulat **“Stadiul cunoașterii privind infecția cu virusul hepatitei E la animale sălbatice”**, include două subcapitole, în care sunt prezentate situațiile

epidemiologice ale infecțiilor cu VHE din specia *Ortohepevirus A* și, respectiv, *Ortohepevirus C* la animale sălbatice. Dintre genotipurile speciei *Ortohepevirus A*, doar VHE-3 a fost identificat la animale sălbatice în Europa. În acest continent, tulpini VHE încadrate în specia *Ortohepevirus C* au fost izolate de la șobolan, vulpe și nurcă.

În capitolul III, denumit “**Stadiul cunoașterii privind infecția cu virusul hepatitei E în România**”, sunt prezentate datele existente în literatura internațională și națională cu privire la infecția cu VHE în România. Datele prezentate în două subcapitole arată că infecția cu VHE a fost cercetată la om și suine. Studiile întreprinse la populația umană din estul României au fost realizate concomitent cu investigațiile realizate la suinele domestice și au dus la suspiciunea unei posibile asocieri a infecției la om cu prezența VHE la suine. Caracterizarea tulpinilor VHE izolate de la suinele domestice a arătat că acestea aparțin VHE-3.

Capitolul IV, “**Stadiul cunoașterii privind hepevirusurile cu caracter zoonotic și epidemiologia infecției la om**”, cuprinde date din literatura de specialitate cu privire la caracterul zoonotic al infecției cu VHE. Acest subiect a fost abordat sistematic, în trei subcapitole, prin documentări asupra capacității VHE de a traversa bariera de specie, asupra factorilor implicați în infecția zoonotică și asupra situației epidemiologice a infecției la om asociată tulpinilor VHE zoonotice. Atât studiile cu privire la infecția naturală, cât și la cea experimentală, arată că nu toate tulpinile VHE izolate de la animale pot fi asociate cu infecția zoonotică. În Europa, alimentația este considerată principala sursă de transmitere a infecției cu VHE. Predominanța subtipurii VHE-3c la om și substituția subtipurilor prevalente anterior în unele țări au fost asociate cu importurile cărnii de porc din alte țări Europene.

Partea a doua a prezentei teze de doctorat, “**Contribuții personale**”, cuprinde șase capitole (V-X): un prim capitol atribuit descrierii scopului, obiectivelor și activitățile asociate acestora, urmat de alte 4 capitole în care sunt detaliate părțile componente ale fiecărui studiu întreprins, de la material și metodă la rezultate și discuții și un ultim capitol desemnat concluziilor finale, în care sunt enumerate remarcile observate prin analiza generală a rezultatelor obținute.

În România, infecția cu VHE a fost documentată într-un număr redus de studii și realizate preponderent în zona de est a țării. Prin urmare, scopul acestei lucrări este de a evalua caracterul zoonotic al tulpinilor VHE circulante în România, prin cercetări menite să contribuie la îmbunătățirea datelor epidemiologice și etiologice ale infecției cu VHE în zona de est a țării. În acest sens, obiectivele propuse au constat în: evidențierea circulației VHE la animale sălbatice din estul României prin evaluarea seroprevalenței anticorpilor specifici anti-VHE la mistreți, identificarea tulpinilor VHE circulante la animalele sălbatice a căror carne poate fi utilizată în cosumul uman, evaluarea rolului șobolanilor în epidemiologia infecției cu VHE în aria de studiu, identificarea tulpinilor VHE circulante la populația umană din estul țării și stabilirea relațiilor filogenetice dintre tulpinile identificate, dintre acestea și cele anterior detectate la suinele domestice din România și alte tulpini VHE din întreaga lume, disponibile în GenBank. Pentru aceasta, au fost realizate succesiv o serie de activități principale, alături de unele cu caracter preliminar sau secundar, destinate atingerii obiectivelor

propuse. Activitățile întreprinse au uzat de metode serologice, moleculare și de analize bioinformatică. Acestea sunt descrise în capitolul V, intitulat “**Scopul și obiectivele tezei de doctorat**”.

În capitolul VI, denumit “**Investigații seroepidemiologice privind infecția cu virusul hepatitei E la mistreți**”, sunt prezentate rezultatele obținute în urma efectuării unei testări serologice a probelor de ser recoltate de la mistreți din 7 județe situate în estul României pentru detecția anticorpilor IgG anti-VHE. Au fost analizate 218 probe de ser recoltate de la mistreți în perioada sezoanelor de vânătoare 2014 și 2015, cu ajutorul kit-ului comercial ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species (IDVet Diagnostics, Montpellier, Franța). Protocolul de lucru s-a realizat conform instrucțiunilor furnizate de producătorul kit-ului. Datele cu privire la vârsta mistreților au fost obținute pentru animalele din județul Galați iar distribuția acestora în fonduri de vânătoare a fost cunoscută pentru același județ și pentru județul Buzău. Distribuția numărului de probe în cele 7 județe a variat, cel mai mare număr de probe fiind recoltate de la mistreții din județul Iași (n=110), urmat de județele Galați (n=38) și Buzău (n=30). Un număr mai mic de probe au fost recoltate de la mistreții din județele Bacău (n=18), Vrancea (n=16), Suceava (n=5) și Botoșani (n=1).

Seroprevalența aparentă a anticorpilor IgG anti-VHE, înregistrată în cadrul acestui studiu, a fost de 11.92% (26/218; 95% CI, 0.076 – 0.162). Analiza rezultatelor obținute a arătat că au fost identificați pozitiv mistreți din 5 județe din cele 7 analizate, respectiv Iași, Bacău, Vrancea, Galați și Buzău, aceste rezultate putându-se datora distribuției neuniforme a numărului de probe în fiecare județ. Animale seropozitive au fost identificate în două din cele 18 fonduri de vânătoare analizate din județul Galați și în 3 din cele 15 fonduri de vânătoare analizate din județul Buzău. Aceste rezultate au semnalat caracterul persistent și, totodată, a celui de propagare a infecției cu VHE la populația de mistreți din estul României, prin identificarea infecției și în alte fonduri de vânătoare decât cele anterior identificate pozitiv de Botezatu și colab., 2014.

Seroprevalența înregistrată a fost mai mare decât cea anterior detectată la mistreți din zona de studiu iar raportarea acesteia la ratele de seroprevalență înregistrate în alte țări Europene indică o rată relativ scăzută. Aceste rezultate se pot datora tehnicilor diferite de diagnostic, a factorilor aflați în legătură cu caracteristicile biologice și ecologice ale populațiilor de mistreți și a celor legați de răspândirea virusului în perioadele analizate.

Analiza rezultatelor în funcție de categoria de vârstă analizată a arătat că acestea sunt în concordanță cu cele din literatura de specialitate, care atestă că infecția cu VHE la mistreți nu este dependentă de vârstă.

Semnalarea infecției cu VHE la populația de mistreți analizată, prin detecția anticorpilor IgG anti-VHE, a reprezentat fundamentul studiilor ulterioare, care au avut ca obiective identificarea și caracterizarea tulpinilor VHE circulante la animale sălbatice din zona de studiu.

În continuare, capitolul VII, intitulat “**Detecția moleculară a virusului hepatitei E la mistreți, cervide și iepuri sălbatici**”, cuprinde rezultatele obținute în urma testării probelor recoltate de la mistreți, cervide și iepuri din zona de studiu. Probele au fost recoltate de la animale vânată în perioada sezoanelor de vânătoare 2013-2015,

dedicate fiecărei specii de vânat. Au fost analizate 78 de probe, 50 de la mistreți (probe de ficat, n=45 și probe de splină, n=5), 16 de la cervide (probe de ficat) și 12 de la iepuri sălbatici (probe de ficat). Nu se cunosc datele cu privire la vârsta cervidelor și a iepurilor de la care s-au recoltat probele de ficat și cele cu privire la distribuția numărului de animale în cadrul celor două specii de cervide analizate: *Capreolus capreolus* și *Cervus elaphus*. Pentru 37 din cei 50 de mistreți analizați, au fost obținute date cu privire la vârstă, aceștia fiind încadrați în una din următoarele categorii de vârstă: < 1 an (n=4), 1-2 ani (n=11), > 2 ani (n=22).

Activitățile întreprinse au utilizat metode moleculare clasice [Cooper și colab., 2005; Bouquet și colab., 2011] și în timp real [Jothikumar și colab., 2006; Barnaud și colab., 2012] iar analiza bioinformatică a inclus instrumentele necesare încadrării tulpinilor VHE identificate (BIOEDIT, BLAST, MEGA 7).

Rezultatele obținute a arătat că VHE a fost identificat în 9 probe din cele 78 analizate, acestea provenind de la mistreți. Datele publicate în literatura de specialitate arată că lipsa sau ratele scăzute de detecție a VHE la cervide sunt comune pentru o serie de studii care au întreprins cercetări simultane la mistreți și la acestea. În baza acestor date au fost emise unele ipoteze, care ar putea reprezenta o parte din cauzele lipsei de detecție a VHE la cervide: selectivitatea acestora în alegerea surselor de hrană și apă, precum și particularitățile anatomice - lipsa vezicii biliare, aceasta din urmă fiind esențială pentru disocierea lipidelor de virioni, prin secreția acidului dezoxicolic, necesar unui astfel de proces.

Mistreții ARN-VHE pozitivi au provenit din două județe, Vrancea și Suceava, care sunt situate la polurile opuse în aria de studiu - estul României. Prevalența aparentă a VHE la mistreții analizați a fost de 18%, iar cea pentru fiecare județ identificat pozitiv de 25% (2/8) și de 23.33% (7/30). ARN-ul VHE a fost detectat la mistreții din categoria de vârstă 1-2 ani (2/11 – 18.18%) și la cei din categoria > 2 ani (7/22 – 31.81%). Analiza rezultatelor, în funcție de tipul de țesut analizat, a arătat că 2 din cele 9 probe identificate pozitiv sunt de origine splenică.

Analizele ulterioare au arătat că 5 produși RT-nested PCR au fost obținuți: pentru una din cele două probe de splină VHE pozitive și pentru patru din cele șapte probe de ficat VHE pozitive. Analiza filogenetică a evidențiat că diferite tulpini de VHE circulă la mistreții din cele două județe, prin încadrarea tulpinilor identificate în 2 grupuri monofiletice.

Raportarea rezultatelor obținute la cele prezentate în literatura de specialitate a dus la suspiciunea caracterului zoonotic al tulpinilor VHE identificate, prin înrudirea genetică a acestora cu tulpini ale VHE izolate din cazurile autohtone de infecție la om. De asemenea, înrudirea tulpinilor VHE izolate de la mistreți din județul Suceava cu o tulpină VHE anterior identificată la suinele domestice din țara noastră, sugerează o posibilă corelare a ratelor crescute de seroprevalență a anticorpilor IgG anti - VHE la populația din estul României cu prezența VHE la animalele din această zonă.

Pentru a evalua rolul șobolanilor în epidemiologia infecției cu VHE în zona de studiu, dar și al altor animale sălbatice, în capitolul VIII, denumit "**Studii moleculare pentru identificarea tulpinilor VHE circulante la șobolan și la alte specii de**

animale”, au fost efectuate analize moleculare și bioinformatică necesare încadrării tulpinilor VHE circulante. Au fost analizate, prin diferite metode de biologie moleculară, 69 de probe de ficat recoltate de la animale sălbatice (52 de șobolani, patru dihuri, o nutrie, un bizam, o cârțiță, un șoarece și nouă vulpi). Toate probele au fost testate prin trei protocoale descrise în literatura de specialitate. Două dintre acestea sunt specifice pentru detecția genotipurilor patogene pentru om (VHE-1 - VHE-4) și au fost descrise în capitolul anterior iar una pentru detecția a diverse hepevirusuri, printre care și a VHE de la șobolan [Johns și colab., 2010]. În urma analizelor efectuate, VHE a fost identificat la șobolani prin utilizarea metodei specifice pentru detecția VHE de la șobolani și de la alte mamifere.

În plus, probele recoltate de la vulpi au fost analizate prin două protocoale de lucru PCR clasic dezvoltate în acest scop, care au utilizat seturile de primeri folosite de Bodewes și colab., 2013 pentru detecția VHE la vulpi din Olanda. Aceste protocoale au fost denumite PCR-ORF2 și PCR-ORF1, în funcție de segmentul amplificat. Analiza electroforetică a produșilor de amplificare obținuți prin PCR-ORF1 a evidențiat prezența unei benzi ADN în poziția așteptată (362bp) pentru una din cele 9 probe analizate. Prezența benzilor nespecifice de amplificare pentru acest produs arată necesitatea optimizării protocoalelor dezvoltate și a reconfirmării prezenței VHE la vulpe în țara noastră.

Șobolanii au fost capturați în diferite locații din patru județe (Suceava, Iași, Bacău și Tulcea) situate în zona de studiu: proximitatea unei crescătorii de suine în sistem intensiv, proximitatea unei crescătorii de suine în sistem semi-intensiv, proximitatea unei crescătorii de suine în sistem extensiv, proximitatea unei crescătorii cu diverse specii de animale (stână), proximitatea unei ferme de bovine, proximitatea ghelelor de gunoi și în împrejurimile așezărilor rurale. Au fost identificate ca fiind ARN-VHE pozitiv nouă din cele 52 de probe testate. Analiza rezultatelor a arătat că VHE este prezent la șobolani din fiecare județ analizat și din patru locații din cele șapte analizate. Aceste rezultate arată o distribuție largă a VHE la șobolani în zona de studiu.

Caracterizarea tulpinilor VHE identificate a arătat că acestea aparțin subtipului specific VHE de la șobolan, respectiv C1. Analiza filogenetică a evidențiat grade diferite de înrudire genetică dintre tulpinile izolate (84.84% - 91.18%) iar procentele maxime de identitate nucleotidică dintre acestea și cele din GenBank au valori cuprinse între 85% și 89%. Aceeași analiză a arătat că una din tulpinile identificate la șobolanii din județul Bacău se înrudește genetic cu două tulpini VHE-4 izolate de la suine în China, în proporție de 73% și 72% (identitate nucleotidică). Aceste rezultate generează noi date cu privire la gradul de înrudire genetică dintre speciile genului *Orthohepevirus*.

Capitolul IX, **“Cercetări privind caracterul zoonotic al infecției cu virusul hepatitei E prin evaluarea acesteia la populația umană din estul României”**, cuprinde rezultatele analizelor serologice și moleculare realizate pentru identificarea infecției cu VHE la grupuri de pacienți din populația de est a României. În acest sens, au fost preluate probe biologice (ser, plasmă sau fecale) din 3 unități sanitare din estul României: Spitalul de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași, Direcția de Sănătate Publică Iași (DSP Iași) și Direcția de Sănătate Publică Vrancea (DSP Vrancea).

Au fost analizate două grupuri de pacienți spitalizați în cadrul a două spitale din zona de studiu: pacienți cu hepatită acută (Spitalul de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" Iași) și pacienți fără afecțiuni hepatice (Spitalul Județean de Urgență "Sfântul Pantelimon" Focșani). În cadrul primului grup (n=94) au fost incluși pacienți cu hepatita acută de cauză necunoscută (n= 48) și pacienți cu hepatită acută non-A, non-B (n=46) iar în cadrul celui de-al doilea grup (n=40), pacienți cu TBC (n=3) și paciente lehuze (n=37). În studiu au fost incluse și probe de la personal medical (n=16) din cadrul Spitalului de Boli Infecțioase "Sfânta Parascheva" din Iași.

Probele de ser de la personalul medical, de la pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută și de la cei fără afecțiuni hepatice au fost testate, inițial, pentru detecția anticorpilor totali anti-VHE (Ab VHE) cu ajutorul kit-ului comercial ELISA HEV Ab (Diagnostic Bioprobes, Italia). Ulterior, o parte din probele de la pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută au fost testate, împreună cu cele de la pacienții cu hepatită acută non-A, non-B pentru detecția anticorpilor IgM anti-VHE cu ajutorul kit-ului comercial ELISA HEV IgM (Diagnostic Bioprobes, Italia). Probele de ser de la pacienții fără afecțiuni hepatice Ab VHE pozitivi și probele de la pacienții cu hepatită acută cu diferite rezultate serologice au fost testate pentru detecția ARN-ului VHE.

Rezultatele obținute arată că infecția cu VHE a fost prezentă la 29.16% (95% IC, 16.31 - 42.03) din pacienții cu hepatită acută de cauză necunoscută și la 32.5% (95% IC, 17.98 - 47.02) din pacienții fără afecțiuni hepatice, prin detecția anticorpilor totali anti-VHE. Detecția anticorpilor IgM anti-VHE la pacienții cu hepatită acută a arătat că 10% (9/90) au prezentat o infecție acută cu VHE la momentul spitalizării. Detecția ARN-ului VHE la doi pacienți dintre cei nouă IgM anti-VHE pozitivi, arată că aceștia au suferit o infecție cu VHE relativ recentă față de momentul spitalizării. Unul din cei doi pacienți cu ARN-VHE pozitivi a consumat carne de porc aprovizionată din galantarul unui magazin.

Caracterizarea tulpinilor VHE circulante a dus la încadrarea acestora în subtipul VHE-3c, cel mai frecvent subtip identificat în Europa. Analiza filogenetică a arătat că acestea se înrudesesc genetic cu tulpini VHE de la om, suine, mistreți și capra domestică din Europa. Aceste rezultate, împreună cu cele obținute la caracterizarea tulpinilor VHE circulante la mistreți, care au arătat prezența a diferite subtipuri de VHE-3, au dus la emiterea a două ipoteze cu privire la infecția cu VHE detectată la om. Prima ipoteză sugerează asocierea infecției cu importurile cărnii de porc din țări ale UE în care VHE-3c este prevalent iar cea de-a doua ipoteză sugerează posibilitatea unei infecții autohtone și implicit existența a diverse subtipuri de VHE la om și animale în România.

Capitolul X, "**Concluzii finale**", cuprinde o sinteză a concluziilor parțiale, după o analiză de ansamblu a datelor prezentate în capitolele anterioare. Rezultatele acestei lucrări oferă date noi cu privire la infecția cu VHE în România, prin semnalarea acesteia la populația umană și la animale sălbatice din estul țării. Observațiile făcute pe parcursul acestei lucrări, în urma cercetărilor întreprinse, semnalează posibilitatea unor infecții zoonotice cu VHE și necesitatea implementării unui program național de prevenire, supraveghere și control a hepatitei E în România.