

DENUMIREA PROIECTULUI

SISTEM DE AVERTIZARE ÎN TIMP REAL ASUPRA RISCULUI EPIDEMIOLOGIC ARBOVIRAL PENTRU ZONA BUCUREȘTI

COD PROIECT

PN 19140201

SURSA DE FINANȚARE

Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării – Program Nucleu 2019 – 2022, contract 47N/2019

Responsabil de proiect

Dr. Prioteasa Florian-Liviu

REZUMAT

Virusul *West Nile* (VWN) este un arbovirus (virus transmis prin intermediul vectorilor artropozi) menținut în cicluri enzootice de transmitere realizate între diferite specii de păsări și diferite specii de țânțari ornitofili, mamiferele (inclusiv omul) reprezentând gazde tangențiale (gazde accidentale care deși manifestă boala nu pot transmite virusul mai departe). Începând din a doua jumătate a sezonului cald (iulie – august) VWN provoacă infecții umane, în anumiți ani înregistrându-se epidemii severe. Deși în general, infecția cu VWN la om este asimptomatică sau prezintă o simptomatologie ușoară cu manifestări asemănătoare gripei, în unele cazuri (aprox. 1%) se manifestă ca o infecție gravă neuroinvasivă (meningo-encefalită virală) ce produce adesea sechele neurologice, iar în segmentul de populație vârstnică, pe fondul unor boli cronice asociate, cauzează adesea decese.

Având o populație de aproximativ două milioane de locuitori, orașul București este endemic pentru circulația virusului West Nile. În anul 1996 aici s-a înregistrat prima epidemie urbană majoră produsă de un arbovirus în Europa. Deși, după acest eveniment, municipalitatea a externalizat serviciul de control al populațiilor de vectori, aproape în fiecare sezon de transmitere aici s-au înregistrat cazuri de infecție neuroinvasivă cu virus West Nile în rândul populației umane și nu au putut fi prevenite noi epidemii precum cele din anii 2016 și 2018 când s-au înregistrat doar la nivelul capitalei 18, respectiv 53 de cazuri. Principalul motiv este reprezentat de absența unui sistem de avertizare în timp real asupra zonelor de tip 'focar', imperios necesar pentru intervenția eficientă în sensul diminuării riscului epidemic. Observațiile noastre anterioare au arătat că virusul West Nile se amplifică în microfocare. Structura ecologică și stabilitatea în timp a unui astfel de focar de circulație a virusului depinde foarte mult de ciclul biologic al patogenului și de biologia vectorului. Atât populațiile de vectori, cât și cele ale gazdelor vertebrate au o distribuție spațială heterogenă. Ca urmare, condițiile favorabile amplificării epizootice a virusului în cicluri multiple pasăre-țânțar-pasăre, sunt realizate concomitent doar în anumite zone, care generează cantități mari de virus circulant în natură, devenind astfel zone de risc pentru transmiterea virusului la om. În cazul VWN, aceste micro-focare sunt cel mai adesea temporare, tranzitorii, fiind deosebit de active o perioadă de câteva săptămâni, în a doua jumătate a verii, după care se sting natural.

OBIECTIVUL PROIECTULUI

Prezentul proiect a urmărit optimizarea metodelor de investigație entomologică și de diagnostic arboviral în vederea realizării un sistem de avertizare în timp real asupra zonelor și perioadelor de risc epidemic cu virus West Nile la nivelul municipiului București. Pornind de la ideea că virusul necesită o perioadă de amplificare în cicluri enzootice de tip păsări ↔ țânțari, proiectul și-a propus depistarea timpurie a prezenței VWN în populațiile de țânțari și avertizarea autorităților asupra zonelor de circulație virală înainte ca virusul să fie transmis către populația umană rezidentă, pentru a putea fi adoptate măsuri precoce de prevenire sau atenuare a riscului epidemic.

METODOLOGIE

- **Colectarea, identificarea și sortarea în probe a culicidelor (țânțarilor)**

Colectarea țânțarilor s-a făcut anual în perioada iunie – septembrie în mai multe situri din București. În alegerea siturilor de colectare s-a avut în vedere acoperirea cât mai multor tipuri de zone urbane (zone rezidențiale de case, zone rezidențiale de blocuri, zone rezidențiale mixte, zone verzi, zone periacvatice etc) precum și siguranța capcanelor utilizate. În acest sens am beneficiat de sprijinul Inspectoratului General al Poliției Române, al Administrației Lacuri Parcuri și Agrement București, al Institutului de Biologie al Academiei Române, al Uniunii Naționale a Transportatorilor Rutieri din România, al Companiei Municipale Eco-Igienizare București precum și de cel al unor persoane private care ne-au permis accesul și amplasarea capcanelor în curțile lor personale. Capcanele folosite pentru capturarea culicidelor au fost capcane de tip CDC Gravid-trap. Acestea au operat continuu din iunie până la sfârșitul lunii septembrie, colectarea materialului biologic făcându-se regulat, o dată la 2-3 zile. După colectare, țânțarii au fost aduși în laborator și identificați la nivel de specie cu ajutorul stereomicroscopului.



Fig. 1 Siturile de colectare a culicidelor din București (stg.) și capcană de tip CDC Gravid-trap (dr.)

După identificare, femelele aparținând complexului *Culex pipiens s.l.* (principalii vectori ai VWN) au fost grupate în probe de câte 20 – 50 indivizi în acord cu data și situl de colectare și supuse diagnosticului prezenței virusului *West Nile*.

- **Diagnosticul prezenței virusului West Nile în probele de țânțari**

Probele de țânțari au fost omogenizate în 1 ml de soluție tampon PBS (pH 7,2) suplimentată cu 20% ser fetal de vițel, 200 μg/ml streptomycină, 200 u/ml penicilină, 1 μg/ml amfotericină B, folosind un omogenizator de probe. Omogenatul a fost apoi centrifugat (14.000 rpm, 4 °C). ARN-ul a fost extras din 140 μL de supernatant folosind kitul comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania) și eluat în 50 μL de tampon AVE furnizat în kit. Extracția ARN a fost efectuată într-o încălțăminte BSL-2. După extracție, s-au folosit 10 uL de soluție de ARN, diagnosticul prezenței genomului VWN făcându-se prin tehnica RT-PCR în timp real într-un singur pas, folosind kitul West Nile Virus Real-TM, Sacace Biotechnologies, Como, Italia) pe un sistem QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Waltham, MA, SUA). Din cauza complexității acestei metode, în anii 2021, respectiv 2022 am optat pentru metoda de screening RAMP (Rapid Analyte Measurement Platform - Response Biomedical Corporation, Burnaby, BC, Canada), doar probele pozitive fiind supuse ulterior confirmării prin tehnica Real-Time RT-PCR. Testul RAMP este un test de screening imunocromatografic semi-cantitativ utilizat pentru diagnosticarea rapidă a VWN în probele de țânțari. Testul folosește particule fluorescente legate de anticorpi anti-VWN. Aceștia se atașează de particulele virale prezente în probe. Probele sunt puse la migrat într-un cartuș care conține o bandă de migrare cu o zonă de test și una de control. Particulele virale legate de anticorpii marcați fluorescent sunt captate în zona de test, iar anticorpii liberi sunt captați în zona de control. Aparatul RAMP măsoară intensitatea fluorescenței din zona de test și cea de control a benzii de migrare iar raportul dintre acestea este exprimat în unități RAMP cu valori cuprinse între 0 și 640. Conform instrucțiunilor producătorului, o probă de țânțari care afișează o valoare > 30 de unități este considerată pozitivă pentru VWN.

- **Aprecierea gradului de risc epidemiologic ale diferitelor zone urbane**

Pentru aprecierea gradului de risc epidemiologic de infecție cu VWN am definit un indice pe care l-am denumit **Indice Zonal de Risc (IZR)** și patru clase de valori ale acestuia corespunzătoare diferitelor grade de risc. Formula de calcul a acestui indice am stabilit-o ca fiind:

$$IZR = \frac{Ab * MIR}{1000}$$

unde Ab reprezintă abundența speciilor de culicide vectoare (calculată ca medie de capturare per capcană/ per 24h), iar MIR reprezintă Rata Minimă de Infecție a culicidelor vectoare (de la engl. Minimum Infection Rate) calculată ca raport între numărul probelor pozitive și numărul total de țânțari testați exprimat la mia de indivizi.

$$MIR = \frac{Nr. probe pozitive}{Nr. total țânțari testați} * 1000$$

Cele patru clase de valori de încadrare a gradului de risc epidemic în funcție de valoarea IZR sunt:

- Clasa I: $IZR \in [0,01 - 0,1)$ – risc redus;
- Clasa II: $IZR \in [0,1 - 0,2)$ – risc moderat;
- Clasa III: $IZR \in [0,2 - 0,4)$ – risc semnificativ;
- Clasa IV: $IZR \geq 0,4$ – risc major.

Pentru $IZR < 0.01$ considerăm risc absent.

REZULTATE

• ANUL 2019

Anul 2019 a reprezentat anul de debut al proiectului când activitatea a fost focusată pe alegerea siturilor de colectare a culicidelor și pe alegerea unei metodologii de lucru optime în raport cu obiectivul general al proiectului. Am putea spune că anul 2019 a fost un an de testări în vederea stabilirii unei metodologii eficiente pentru următorii ani. În acest an, activitatea de colectare a culicidelor s-a efectuat în cea mai mare parte în jumătate de sud a capitalei. Din iunie și până în septembrie inclusiv, au fost colectați 14.796 de țânțari aparținând la 9 specii. Au fost constituite și testate 225 de probe de culicide însumând aproximativ 7500 de indivizi. Un număr de 15 probe, colectate exclusiv în luna august în patru situri, au fost pozitive pentru virusul *West Nile*. Cele patru situri pozitive au fost: Parcul Al. Ioan Cuza, Parcul Titan, zona Izvor și zona cartierului Sălaj. Pentru aceste zone a fost calculat Indicele Zonal de Risc.

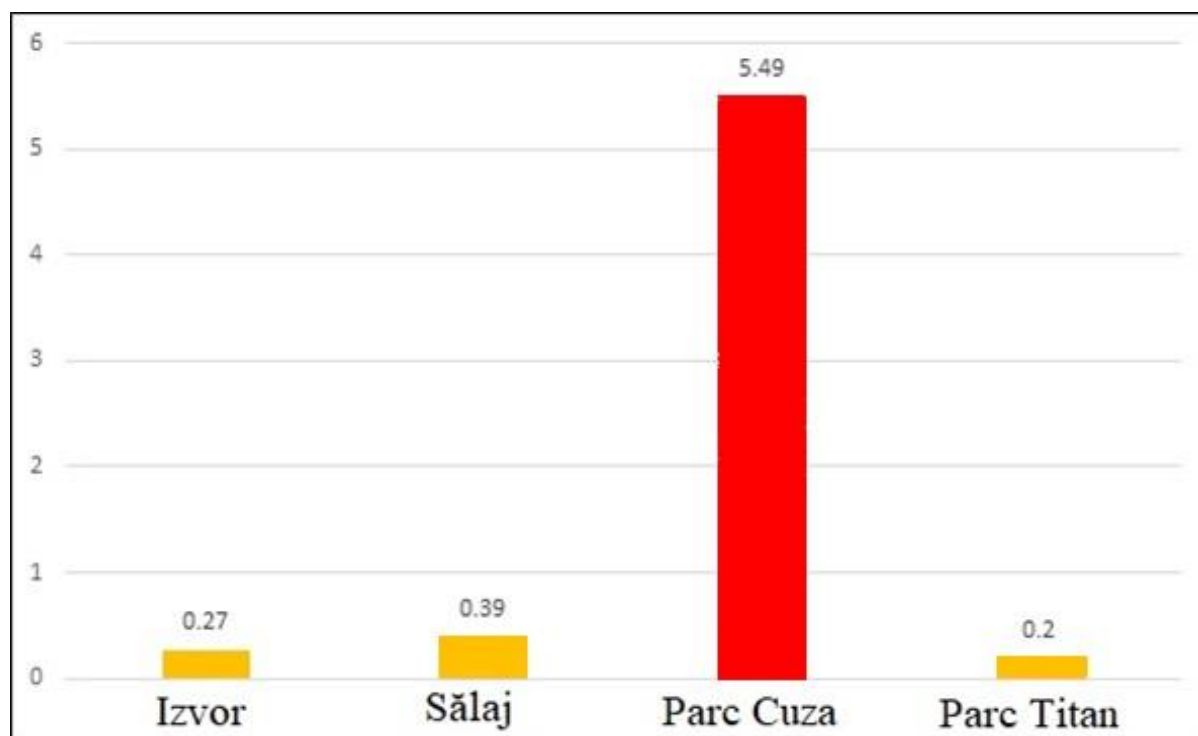


Fig. 2 Valorile IZR în cele 4 situri pozitive pentru VWN în anul 2019

Conform valorilor IZR, trei situri au fost încadrate în clasa III de risc epidemic și unul în clasa IV. Distribuția cazurilor umane de infecții cu virus West Nile din anul 2019 în orașul București (18) s-a corelat cu clasificarea zonelor în clasele de risc făcută de noi, cele mai multe cazuri înregistrându-se în proximitatea zonei de clasa IV. Din păcate, timpul scurs de la colectarea culicidelor până obținerea rezultatelor de diagnostic molecular al probelor a fost relativ lung și primele probe pozitive s-au confirmat concomitent cu semnalarea primelor cazuri umane de infecții cu virus West Nile. De aceea, pentru anul următor s-a avut în vedere optimizarea timpului dintre colectarea și diagnosticul molecular al probelor de culicide pentru a putea să emitem avertizări asupra zonelor de risc înaintea apariției cazurilor umane.

- **Anul 2020**

Deși planul inițial pentru această fază a proiectului prevedea eșantionarea și evaluarea riscului epidemiologic arboviral doar a zonei de nord a capitalei, am considerat necesar ca supravegherea entomologică să se facă pe o zonă cât mai largă la nivelul orașului pentru a putea obține date necesare optimizării sistemului de avertizare și pentru a contribui cât mai curând la diminuarea riscului de infecții cu VWN. În acest sens, supravegherea entomologică s-a efectuat în 16 situri acoperind toate sectoarele capitalei. În majoritatea siturilor investigate, supravegherea entomologică a început în luna iunie și s-a desfășurat cu regularitate până în a doua jumătate a lunii septembrie. Anul 2020 s-a caracterizat printr-o abundență apreciabilă a culicidelor fapt ce a generat un efort considerabil pentru identificarea acestora și sortarea lor în probe de diagnostic molecular. Pe întreg parcursul activității de supraveghere vectorială, în cele 16 situri s-au colectat și identificat în total 43.660 de țânțari aparținând la zece specii. Au fost constituite 492 de probe însumând 18.387 femele de țânțari. S-au înregistrat 14 probe pozitive pentru virusul West Nile din țânțari colectați în opt situri. Primele probe pozitive s-au înregistrat în zona lacului Fundeni (8-10 iulie) și pe strada Bacău din cartierul Sălaj (10 -14 iulie). La data de 22 iulie au fost informate asupra zonelor de risc următoarele instituții: Institutul Național de Sănătate Publică(INSP), Primăria Municipiului București(PMB) și Compania Municipală Eco-Igienizare București. Pe întreg sezonul de supraveghere vectorială au fost emise către instituțiile amintite mai multe informări oficiale asupra zonelor cu risc de infecții cu VWN. Valorile IZR înregistrate au fost semnificativ mai mici față de anul precedent variind între 0,02 și 0,25. În anul 2020 un singur caz de infecție cu VWN la om a fost înregistrat în București.

Tabelul 1. Valorile IZR în cele opt situri pozitive pentru VWN în anul 2020

Sit	Valoare generală IZR	Clasa de risc	Semnificație
Herăstrău	0,15	II	Risc moderat
Fundeni	0,12	II	Risc moderat
Izvor	0,05	I	Risc redus
Lacul Morii	0,25	III	Risc semnificativ
P ^{la} Concordiei	0,06	I	Risc redus
Titan	0,03	I	Risc redus
Sălaj	0,02	I	Risc redus

Uranus	0,02	I	Risc redus
--------	------	---	------------

- **Anul 2021**

În anul 2021, pentru reducerea timpului necesar diagnosticului arboviral, am optat pentru testarea probelor de culicide prin metoda de screening RAMP și doar probele pozitive au făcut obiectul confirmării prin metoda moleculară RT-PCR. Un număr total de 210 probe, însumând 8878 de femele aparținând speciei *Culex pipiens* s.l. au fost analizate prin metoda RAMP. Un număr de 24 de probe au fost pozitive pentru virusul *West Nile* dintre care 21 au fost confirmate RT-PCR. Probele pozitive confirmate s-au înregistrat doar în patru din cele 15 situri investigate în acest an. Doar probele pozitive confirmate RT-PCR au fost luate în considerare la stabilirea zonelor de risc epidemiologic. Astfel, putem spune ca pe parcursul anului 2021, au fost identificate 4 zone de risc epidemic în sudul, centru și vestul capitalei (fig. 3). Autoritățile (INSP și PMB) au fost înștiințate imediat după confirmarea PCR a fiecărei probe pentru implementarea urgentă a măsurilor de control al vectorilor în vederea limitării riscului epidemic. Valorile IZR au fost cuprinse între 0,01 și 0,78, două zone fiind incluse în clasa de risc redus și două zone în clasa de risc major.

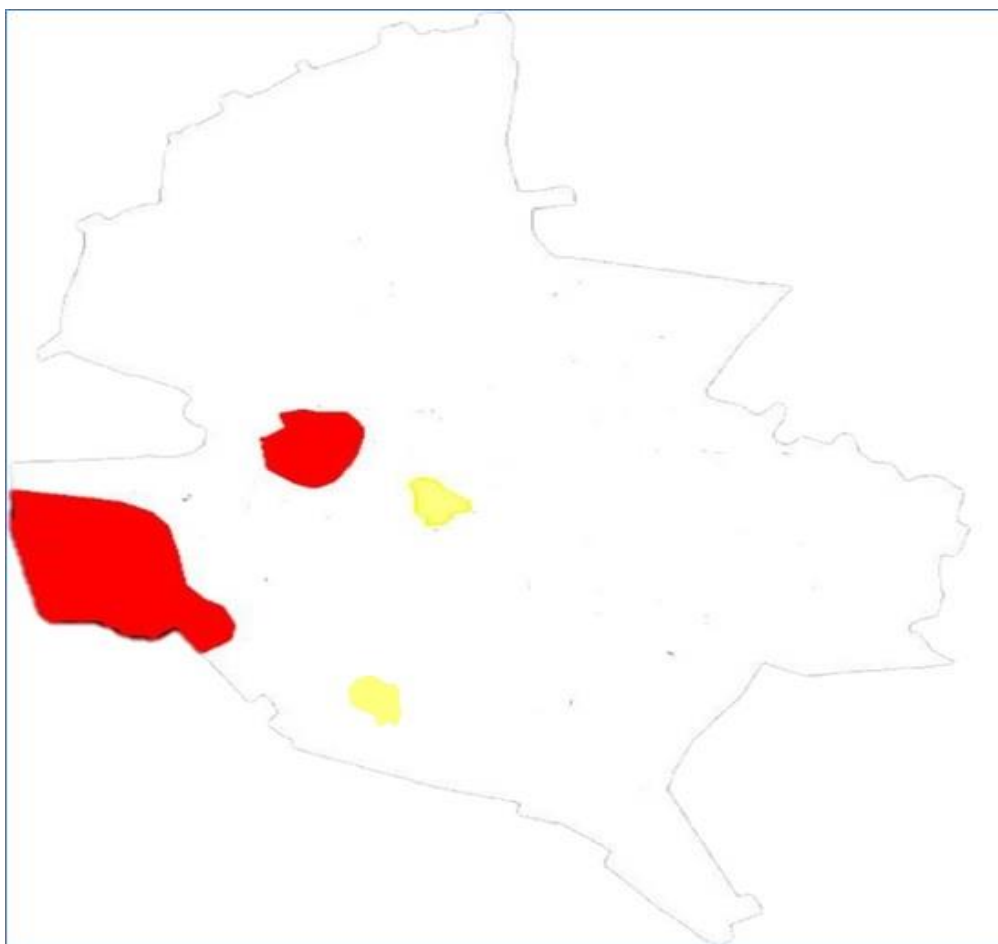


Fig. 3. Zonele de risc epidemiologic din București în anul 2021 (cu galben zonele de risc redus; cu roșu zonele de risc major)

- **Anul 2022**

Anul acesta s-a înregistrat o circulație intensă a VWN cu o largă distribuție spațială. Până la începutul lunii august prezența virusului a fost pusă în evidență în cinci zone: Rahova, Crângași, Drumul Taberei, Brâncuși și Izvor. Primele probe pozitive s-au înregistrat în prima decadă a lunii iulie. Până la data de 20 iulie au fost trimise către INSP și PMB 3 înștiințări referitoare la larga distribuție a VWN la nivelul capitalei, avertizând asupra pericolului de infectare în rândul populației rezidente. Până în luna octombrie au fost înregistrate 20 de cazuri umane de infecție cu VWN în București. Harta zonelor de risc pentru acest an va fi disponibilă după prelucrarea și analiza tuturor datelor colectate în acest an.

ARTICOLE PUBLICATE PE PARCURSUL PROIECTULUI

Prioteasa, F.L.; Tiron, G.V.; Dinu, S.; Fălcuță, E. Using Rapid Analyte Measurement Platform (RAMP) as a Tool for an Early Warning System Assessing West Nile Virus Epidemiological Risk in Bucharest, Romania. *Trop. Med. Infect.Dis.* **2022**, 7, 327.

<https://doi.org/10.3390/tropicalmed7110327>

Stancu, I.G.; Prioteasa, F.L.; Tiron, G.V.; Cotar, A.I.; Fălcuță, E.; Porea, D.; Dinu, S.; Ceianu, C.S.; Csutak, O. Distribution of Insecticide Resistance Genetic Markers in the West Nile Virus Vector *Culex pipiens* from South-Eastern Romania. *Insects.* **2022**, 13,1062.

<https://doi.org/10.3390/insects13111062>