

ABSTRACT

Arboviruses or “arthropod-borne viruses” form an ecological group of pathogens transmitted to vertebrate hosts through blood-feeding arthropods. This group includes hundreds of viruses from nine families. However, the viruses with medical importance belong mainly to seven families (HUBALEK et al., 2014, BARZON, 2018).

The most common life cycle of arboviruses involves the vectors ingesting the virus while feeding on an infected host, followed by multiplication and diffusion of the microorganism in their body and subsequently passing it to another host during the feeding (BARZON, 2018, NAPP et al., 2018).

West Nile virus (WNV), Usutu virus (USUV), and the Tick-borne encephalitis virus (TBEV) are all arboviruses belonging to *Flaviviridae* family, characterized by vectorial transmission and sometimes associated with neuroinvasive infections. Sindbis virus (SINV), also vectored by mosquitoes, is included in *Togaviridae* family (Alphavirus genus) (BUCKLEY et al., 2003). The circulation of these viruses is considered endemic in some parts of Europe, with cases reported in many countries. (BARZON, 2018). The virus transmission is accomplished by arthropods such as mosquitoes (WNV, USUV, SINV) and ticks (TBEV) (BARZON, 2018).

The medical importance of arboviruses lies in their zoonotic potential. In humans, WNV usually evolves asymptotically or with flu-like symptoms. In 1% of the infections, humans develop the West Nile neuroinvasive disease, which is associated with meningoencephalitis, and in some cases fatalities (DAVIS et al., 2006, DAVID et al., 2016). USUV was also found responsible for severe neuro-invasive infections in humans (ZECCHIN et al., 2021). TBE infections may also include neurological symptoms (DUMPIS et al., 1999). SINV has mostly been associated with disease in humans, and so far, the infections were reported in the northern part of Europe (Sweden, Finland and Russia) and South Africa (BARZON, 2018). The disease is associated with fever, arthritis, and skin rash (ADOUCHIEF et al., 2016).

Since its first report in Romania in 1996, WNV circulation was recorded yearly, with significant outbreaks among humans (ECDC, 2019, COROIAN et al., 2022). Serological evidence was also recorded during the following years in domestic and wild birds (LUDU OSLOBANU et al., 2014, PAȘTIU et al., 2016). Although WNV causes disease and mortality every year, in Romania it remains passively monitored in humans, birds, and horses, solely with acute neurological cases being tested.

USUV antibodies were recently documented for the first time in Romania, in a domestic dog, but its presence in humans, birds, or other susceptible hosts have not yet been demonstrated (CRIVEI et al., 2021).

The only report of Sindbis virus in Romania dates back to 1975, a low seroprevalence being registered in humans (DRĂGĂNESCU et al., 1975).

Additionally, information on the tick-borne encephalitis (TBE) epidemiology in Romania is scarce and partly outdated.

The first part (I) of the present thesis is structured into five chapters and summarizes information from literature about West Nile virus, Usutu virus, Tick-borne encephalitis virus and Sindbis virus. Chapter I.1 includes literature data on arboviruses

Ecology and eco-epidemiology of Arboviruses in Romania and their classification. Chapter I.2. comprise information on the taxonomy, virology, life cycle, epidemiology, pathogenicity, zoonotic potential and diagnostic methods of West Nile virus. Chapter I.3. describes information on the taxonomy, virology, life cycle, epidemiology, pathogenicity, zoonotic potential and diagnostic methods of Usutu virus. Chapter I.4 includes information on the taxonomy, virology, life cycle, epidemiology, pathogenicity, zoonotic potential and diagnostic methods of Sindbis virus. Chapter I.5. comprise information on the taxonomy, virology, life cycle, epidemiology, pathogenicity, zoonotic potential and diagnostic methods of Tick-borne encephalitis virus.

The second part (II) of the thesis includes the aims of the study, three original studies focused on the ecology and eco-epidemiology of West Nile, Usutu, Sindbis and Tick-borne encephalitis virus in Romania, conclusions, recommendations and originality elements of the study. The thesis ends with the cited references (237 titles).

The aim of Chapter II.1. was to analyze the integrated influence of various multi-annual abiotic and biotic factors with the human WNND cases over a period of five years (2015–2019). A database containing all the localities in Romania was developed. Abiotic and biotic predictors were included for each locality: geographic variables, climatic data, and biotic factors. Spatial distribution of the WNND infections was analyzed using directional distribution (DD). The Spearman's rank correlation coefficient was employed to assess the strength of association between the WNND infections and predictors. A model was generated using the random forest ensemble learning method. A total number of 535 human WNND cases were confirmed in 308 localities. The DD showed a south-eastern geographical distribution. Weak correlation was observed between the number of human WNND cases for each year and the predictors. The highest predicted probability was around urbanized patches in the south and southeast. Increased surveillance and control measures of vectors in risk areas should be implemented and educational campaigns should be made available for the general public in order to raise awareness of the disease and inform the population about prophylactic measures.

Considering the currently outdated knowledge regarding the epidemiology of WNV, USUV and TBEV viruses in Romania, the aim of Chapter II.2. was to assess the seroprevalence rates of these viruses among healthy blood donors in north-western Romania. Human blood samples from healthy donors were collected between November 2019 and February 2020 in six counties from the north-western region of Romania. The samples were serologically tested by ELISA and serum neutralization test. Overall, we obtained a seroprevalence of 3.17% for WNV, 0.08% for TBEV, and 0% for USUV. Despite the low seroprevalence of WNV, USUV, and TBEV in our study, we highlight the need for continuous nationwide vector and disease surveillance and implementation of control measures. Further research is required for an optimal overview of the epidemiological status of the Romanian population regarding these flaviviruses together with countrywide awareness campaigns.

In the Chapter II.3. we aimed to analyze the presence of antibodies for WNV, USUV and SINV in migratory and resident birds in the South-Eastern region of Romania, as avian hosts represent the main reservoir for human infection. Blood samples were collected from wild birds between May 2018 and October 2019 in nine locations from three counties. All the samples were serologically tested by ELISA and a serum

neutralization test. Overall, a seroprevalence of 8.72% was registered for the West Nile virus, 2.71% for the Usutu virus, and 0% for the Sindbis virus.

REFERENCES

1. HUBÁLEK, Z., RUDOLF, I., NOWOTNY, N., 2014. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv Virus Res*, 89: 201-275.
2. BARZON, L. 2018. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol*, 107: 38-47.
3. NAPP, S., PETRIĆ, D., BUSQUETS, N., 2018. West Nile virus and other mosquito-borne viruses present in Eastern Europe. *Pathog Glob Health*, 112: 233-248.
4. BUCKLEY A., DAWSON, A., MOSS, S. R., HINSLEY, S. A., BELLAMY, P. E., GOULD, E. A., 2003. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol*, 84: 2807-2817.
5. DAVIS, L.E., DEBIASI, R., GOADE, D.E., HAALAND, K.Y., HARRINGTON, J.A., HARNAR, J.B., PERGAM, S.A., KING, M.K., DEMASTERS, B.K., TYLER, K.L., 2006. West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol*, 60: 286-300,
6. DAVID, S., ABRSHAM, A.M., 2016. Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect Dis*, 48: 571-586.
7. ZECCHIN, B., FUSARO, A., MILANI, A., SCHIVO, A., RAVAGNAN, S., ORMELLI, S., MAVIAN, C., MICHELUTTI, A., TONIOLO, F., BARZON, L., 2021. The central role of Italy in the spatial spread of Usutu virus in Europe. *Virus Evol*, 7: veab048.
8. DUMPIS, U., CROOK, D., OKSI, J. 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis*, 28: 882-890.
9. ADOUCHIEF, S., SMURA, T., SANE, J., VAPALAHTI, O., KURKELA, S., 2016. Sindbis virus as a human pathogen—epidemiology, clinical picture and pathogenesis. *Rev med virol*, 26: 221-241.
10. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019. Historical data by Year - West Nile Virus Seasonal Surveillance, Stockholm, Sweden. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical> (accessed on 23 March 2022).
11. COROIAN, M., MIHALCA, A.D., DOBLER, G., EURINGER, K., GIRL, P., BORŞAN, S.-D., KALMÁR, Z., TINCUȚA-BRICIU, V.T., FLONTA, M., TOPAN, A., RĂDULESCU, A.L., UNGUR, A., LUPŞE M.S., 2022 Seroprevalence rates against West Nile, Usutu, and Tick-Borne Encephalitis viruses in blood-donors from north-western Romania. *IJERPH*, 19: 8182.
12. LUDU E.L., MIHU-PINTILIE, A., ANITĂ, D., ANITA, A., LECOLLINET, S., SAVUTA, G., 2014. West Nile virus reemergence in Romania: A serologic survey in host species. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14: 330-337.
13. PAŞTIU, A.I., PAP, P.L., VĂGĂSI, C.I., NICULAE, M., PÁLL, E., DOMŞA, C., BRUDAŞCĂ, F.G., SPÎNU, M., 2016. Wild birds in Romania are more exposed to West Nile Virus than to Newcastle disease virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 16: 176-180.
14. CRIVEI, L.A., 2021. Arboviroze cu caracter zoonotic transmise de țânțari în România. Doctoral thesis, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Iași, Romania.

Ecology and eco-epidemiology of Arboviruses in Romania

15. DRĂGĂNESCU, N., IFTIMOVICI, R., GIRJABU, E., IACOBESCU, V., BUȘILA, A., CVAȘNIUC, D., TUDOR, G., MĂNĂSTIREANU, M., 1975. Investigations on the presence of antibodies to several alphaviruses in humans and domestic animals of a region with elevated epidemiological potential. *Virologie*, 26: 99-102.

REZUMAT

Arbovirusurile formează o grupă ecologică de patogeni, transmiși gazdelor vertebrate prin intermediul artropodelor care se hrănesc cu sânge. Acest grup conține sute de virusuri, care aparțin la noua familie. Virusurile cu importanță medicală aparțin în principal la șapte familii (HUBALEK et al., 2014, BARZON, 2018).

Ciclul biologic al arbovirusurilor implică vectorii, care ingerează virusul de la gazde infectate în timpul hrănirii. Acest proces este urmat de multiplicare și difuzarea microorganismului în corpul acestora. Ulterior, acesta este transmis unei alte gazde în timpul hrănirii (BARZON, 2018, NAPP et al., 2018).

Virusurile West Nile (WNV), Usutu (USUV) și cel al encefalitei de căpușă (TBEV) sunt arbovirusuri care aparțin familiei *Flaviviridae*, caracterizate de transmitere vectorială, uneori asociate cu infecții neuroinvasive. Virusul Sindbis (SINV), este de asemenea transmis de către țânțari, fiind inclus în familia *Togaviridae* (genul *Alphavirus*) (BUCKLEY et al., 2003). Circulația acestor virusuri este considerată endemică în unele părți ale Europei, anual, multe țări înregistrând un număr semnificativ de cazuri (BARZON, 2018). Transmiterea virusului este realizată de către artropode precum țânțari (WNV, USUV, SINV) sau căpușe (TBEV) (BARZON, 2018).

Importanța medicală a acestor arbovirusuri rezultă din potențialul lor zoonotic. La oameni, WNV evoluează de obicei asimptomatic, sau cu simptome asemănătoare unei gripe. La 1% dintre infecții, oamenii dezvoltă forma neuroinvasivă, care este asociată cu meningoencefalită, uneori fatală (DAVIS et al., 2006, DAVID et al., 2016). USUV este de asemenea responsabil de forme neuroinvasive severe la oameni (ZECCHIN et al., 2021). Infecțiile cu TBEV pot să determine în unele cazuri simptomatologie nervoasă (DUMPIS et al., 1999). Virusul Sindbis a fost mai mult asociat cu îmbolnăviri la oameni în nordul Europei (Suedia, Finlanda și Rusia) și în Africa de Sud (BARZON, 2018). Boala produce o simptomatologie polimorfă precum febră, artrite și erupții cutanate (ADOUCHIEF et al., 2016).

De la prima raportare a WNV în România, în anul 1996, circulația acestuia a fost înregistrată anual, producând epidemii la oameni (ECDC, 2019, COROIAN et al., 2022). În următorii ani, au fost identificați și anticorpi la păsări domestice și sălbatice (LUDU OSLOBANU et al., 2014, PAȘTIU et al., 2016). Cu toate că WNV cauzează mortalități anual în România, acesta rămâne supravegheat pasiv de către autorități la oameni, păsări și cai, fiind testate doar cazurile cu manifestare neurologică.

Anticorpi pentru USUV au fost descoperiți recent pentru prima dată în România la un câine domestic, dar prezența acestuia la oameni, păsări sau alte gazde susceptibile nu a fost încă demonstrată (CRIVEI et al., 2021).

Singura raportare a virusului SINV în România, a fost realizată în anul 1975, când a fost înregistrată o seroprevalență scăzută la oameni (DRĂGĂNESCU et al., 1975).

De asemenea, datele epidemiologice ale TBEV în România sunt incomplete și învechite.

Prima parte (I) a acestei teze este structurată în cinci capitole și sumarizează informațiile din literatură despre virusurile West Nile, Usutu, al encefalitei de căpușă și Sindbis. Capitolul I.1. include date din literatură despre arbovirusuri și clasificarea

Ecologia și eco-epidemiologia Arbovirusurilor din România

acestora. Capitolul I.2. cuprinde informații despre taxonomie, virusologie, ciclul biologic, epidemiologie, patogenitate, potențial zoonotic și metode de diagnostic ale virusului West Nile. Capitolul I.3. cuprinde informații despre taxonomie, virusologie, ciclul biologic, epidemiologie, patogenitate, potențial zoonotic și metode de diagnostic ale virusului Usutu. Capitolul I.4. cuprinde informații despre taxonomie, virusologie, ciclul biologic, epidemiologie, patogenitate, potențial zoonotic și metode de diagnostic ale virusului Sindbis. Capitolul I.5. cuprinde informații despre taxonomie, virusologie, ciclul biologic, epidemiologie, patogenitate, potențial zoonotic și metode de diagnostic ale virusului encefalitei de căpușă.

A doua parte (II) cuprinde scopul tezei și trei articole originale, focusate pe ecologia și eco-epidemiologia virusurilor West Nile, Usutu, Sindbis și al encefalita de căpușă în România, concluzii, recomandări și elemente de originalitate ale studiului. Teza se încheie cu bibliografia (237 de titluri citate).

Scopul Capitolului II.1. a fost de a analiza influența integrată a mai multor factori multi-anuali, biotici și abiotici, cu cazurile de infectare umană cu virusul West Nile, forma neuroinvasivă în România, pe o perioadă de cinci ani (2015-2019). A fost dezvoltată o bază de date care cuprinde toate localitățile din România. Au fost incluși factorii biotici și abiotici pentru fiecare localitate: variabile geografice, date climatice și factori biotici. Distribuția spațială a cazurilor de infectare cu forma neuroinvasivă de West Nile a fost analizată folosind distribuția direcțională (DD). Coeficientul de corelație Spearman's rank a fost folosit pentru a verifica intensitatea asocierii dintre infecțiile cu forma neuroinvasivă de West Nile și predictorii. A fost generat un model folosind metoda Random forest ensemble learning. A fost înregistrat un număr de 535 de infectări cu forma neuroinvasivă de West Nile, în 308 de localități. Distribuția direcțională a evidențiat o distribuție geografică sud-estică a cazurilor. Au fost observate corelații slabe între numărul de infectări cu forma neuroinvasivă de West Nile pentru fiecare an și predictorii. Cea mai mare probabilitate a fost observată în zona aglomerărilor urbane din sudul și sud-estul țării. Recomandăm o sporire a supravegherii și implementarea unor măsurilor de control a vectorilor în zonele de risc. De asemenea, se recomandă campanii educative de conștientizare a riscului și de informare cu privire la măsurile de profilaxie pentru populație.

Având în vedere cunoștințele învechite cu privire la epidemiologia virusurilor West Nile, Usutu și al encefalitei de căpușă în România, scopul Capitolului II.2. a fost de a evalua rata de seroprevalență a acestor virusuri, la donatori de sânge umani din nord-vestul României. Au fost colectate probe de sânge de la oameni în perioada Noiembrie 2019 și Februarie 2020 în șase județe din nord-vestul României. Probele au fost testate serologic folosind metoda ELISA și testul de seroneutralizare. A fost obținută o seroprevalență de 3.17% pentru virusul West Nile, 0.08% pentru virusul encefalitei de căpușă și 0% pentru virusul Usutu. În ciuda valorilor scăzute de seroprevalență, subliniem nevoia continuă de supraveghere la nivel național a acestor virusuri și a vectorilor care le transmit. De asemenea, recomandăm sporirea măsurilor de control a vectorilor. Studii suplimentare sunt necesare pentru o situație mai clară a statusului epidemiologic a acestor flavivirusuri la nivelul populației din România, împreună cu campanii naționale riguroase de conștientizare a riscului.

În capitolul II.3. scopul nostru a fost de a analiza prezența anticorpilor pentru virusurile West Nile, Usutu și Sindbis, la păsări migratoare și rezidente, în sud-estul României, având în vedere rolul de rezervor al gazdelor aviare, pentru infectările umane.

Probe de sânge de la păsări sălbatice au fost recoltate între Mai 2018 și Octombrie 2019 din nouă localități, aparținând la trei județe. Toate probele au fost testate folosind metoda ELISA și testul de seroneutralizare. A fost obținută o seroprevalență de 8.72% pentru virusul West Nile, 2.71% pentru virusul Usutu și 0% pentru virusul Sindbis.

BIBLIOGRAFIE

1. HUBÁLEK, Z., RUDOLF, I., NOWOTNY, N., 2014. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv Virus Res*, 89: 201-275.
2. BARZON, L. 2018. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol*, 107: 38-47.
3. NAPP, S., PETRIĆ, D., BUSQUETS, N., 2018. West Nile virus and other mosquito-borne viruses present in Eastern Europe. *Pathog Glob Health*, 112: 233-248.
4. BUCKLEY A., DAWSON, A., MOSS, S. R., HINSLEY, S. A., BELLAMY, P. E., GOULD, E. A., 2003. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol*, 84: 2807-2817.
5. DAVIS, L.E., DEBIASI, R., GOADE, D.E., HAALAND, K.Y., HARRINGTON, J.A., HARNAR, J.B., PERGAM, S.A., KING, M.K., DEMASTERS, B.K., TYLER, K.L., 2006. West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol*, 60: 286-300,
6. DAVID, S., ABRSHAM, A.M., 2016. Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect Dis*, 48: 571-586.
7. ZECCHIN, B., FUSARO, A., MILANI, A., SCHIVO, A., RAVAGNAN, S., ORMELLI, S., MAVIAN, C., MICHELUTTI, A., TONIOLO, F., BARZON, L., 2021. The central role of Italy in the spatial spread of Usutu virus in Europe. *Virus Evol*, 7: veab048.
8. DUMPIS, U., CROOK, D., OKSI, J. 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis*, 28: 882-890.
9. ADOUCHIEF, S., SMURA, T., SANE, J., VAPALAHTI, O., KURKELA, S., 2016. Sindbis virus as a human pathogen—epidemiology, clinical picture and pathogenesis. *Rev med virol*, 26: 221-241.
10. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019. Historical data by Year - West Nile Virus Seasonal Surveillance, Stockholm, Sweden. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical> (accessed on 23 March 2022).
11. COROIAN, M., MIHALCA, A.D., DOBLER, G., EURINGER, K., GIRL, P., BORȘAN, S.-D., KALMÁR, Z., TINCUȚA-BRICIU, V.T., FLONTA, M., TOPAN, A., RĂDULESCU, A.L., UNGUR, A., LUPȘE M.S., 2022 Seroprevalence rates against West Nile, Usutu, and Tick-Borne Encephalitis viruses in blood-donors from north-western Romania. *IJERPH*, 19: 8182.
12. LUDU E.L., MIHU-PINTILIE, A., ANITĂ, D., ANITA, A., LECOLLINET, S., SAVUTA, G., 2014. West Nile virus reemergence in Romania: A serologic survey in host species. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14: 330-337.
13. PAȘTIU, A.I., PAP, P.L., VĂGĂSI, C.I., NICULAE, M., PÁLL, E., DOMȘA, C., BRUDAȘCĂ, F.G., SPÎNU, M., 2016. Wild birds in Romania are more exposed to West Nile Virus than to Newcastle disease virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 16: 176-180.

Ecologia și eco-epidemiologia Arbovirusurilor din România

14. CRIVEI, L.A., 2021. Arboviroze cu caracter zoonotic transmise de țânțari în România. Doctoral thesis, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Iași, Romania.
15. DRĂGĂNESCU, N., IFTIMOVICI, R., GIRJABU, E., IACOBESCU, V., BUȘILA, A., CVAȘNIUC, D., TUDOR, G., MĂNĂSTIREANU, M., 1975. Investigations on the presence of antibodies to several alphaviruses in humans and domestic animals of a region with elevated epidemiological potential. *Virologie*, 26: 99-102.