

Peculiarities of directions and causal agents' distribution of tick-borne encephalitis in the Republic of Moldova

*S. Gheorghita¹, V. Chicu², V. Burlacu¹, V. Melnic¹, A. Gutsu¹, N. Caraman¹, A. Gori¹, V. Ternovoi³

¹National Center of Public Health, Chisinau, the Republic of Moldova

²Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, the Republic of Moldova

³State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Novosibirsk, Russia

*Corresponding author: sgheorghita@cnspl.md. Article received July 17, 2013; accepted September 15, 2013

Abstract

The aim of the study is to determine the circulation of tick-borne encephalitis (TBE) causal agents in the Ixodidae ticks population and the evaluation of the TBE threat to public health. The species of ticks *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus* and *Haemaphysalis punctata* can be often met in the ecosystems of the Republic of Moldova. The species *I. ricinus* is the most numerous and widespread one, the fact that shows its high epidemiological significance. At the same time the species *D. reticulatus*, *D. marginatus* and *H. punctata* are the potential directions of TBE maintaining the TBE viruses in the environment. The laboratory results got by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have indicated the TBE virus antigen in 25.2% of the ticks, collected in the period of 2009-2012. Using the polymerase chain reaction method it has been established that on average the RNA of TBE virus has been 8.1% of all tested tick samples. The specific antibodies to tick-borne encephalitis virus have been identified in 9 (4%) tested human specimens. The rationalization of the system of epidemiological surveillance and control of tick-borne encephalitis consists in developing and implementing a definition of the case for report on the basis of clinical and laboratory criteria, as well as the communication with epidemiological station, and studying to obtain standardized and comparable data.

Key words: ixodidae ticks, tick-borne encephalitis, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction.

Particularitățile răspândirii vectorilor și agenților cauzali ai encefalitei acariene în Republica Moldova

Introducere

Encefalita acariană, transmisă de căpușele artropode, reprezintă o maladie infecțioasă de etiologie virală cu afectarea sistemului nervos central și o răspândire endemică [1, 2]. Boala a fost descrisă pentru prima dată în Orientul îndepărtat al fostei URSS, la începutul anilor 30. Primele descrieri clinice aparțin savantului A. Panov (1935), numită encefalită de primăvară-vară, ceea ce indică la sezonabilitatea infecției. În 1937, L. Zilber și colab. au izolat virusul encefalitei acariene din probe de creier de la persoanele decedate, prelevate din sângele și lichidul cefalo-rahidian al bolnavilor, precum și din căpușele ixodide și de la mamiferele sălbatice [1, 3, 4]. E. Pavlovschii, în 1939 a descris principalele manifestări ale encefalitei acariene și modul, în care agentul etiologic este menținut în natură [5]. Encefalita acariană este descrisă ca

o maladie cu manifestări clinice asemănătoare gripei, care evoluează în 2-4 zile, după care, în 20-30% cazuri boala se agravează brusc cu apariția semnelor de afectare a sistemului nervos central (meningita, meningoencefalita, meningoencefalomielita sau meningoradiculita) [6].

Cazurile de îmbolnăvire în populația umană au o distribuție geografică vastă și se înregistrează aproape în toate țările continentului european: Belarus, Ucraina, România, Austria, Republica Cehă, Estonia, Finlanda, Germania, Ungaria, Lituania, Slovenia, Federația Rusă etc. [5, 7]. În țările UE, povara reală a bolii este în proces de estimare, fiind stabilit faptul că encefalita acariană necesită o asistență medicală costisitoare, inclusiv terapie intensivă și poate fi însoțită de sechele grave și îngrijire medicală de durată [2].

Virusul encefalitei acariene face parte din genul *Flavivirus*,

familia *Flaviviridae* cu 3 subtipuri: European (Eu-TBEV), Siberian (S-TBEV) și Est îndepărtat (FE-TBEV), grupul ecologic al arbovirusurilor, constituit dintr-un ARN monocatenar, se caracterizează prin tropism spre țesutul sistemului nervos [8].

Encefalita acariană este o zoonoză cu focalitate naturală, rezervorul căreia sunt mamiferele, păsările și reptilele. Ixodidele (ordinul acarieni, familia *Ixodidae*) constituie vectori precum și rezervoare ale agenților cauzali, care persistă în organismul lor pe parcursul ciclului vital, de la stadiul de larvă până la imago [9]. Căpușele, datorită capacităților de adaptare la condițiile de mediu, au răspândire extrem de vastă. Pentru ixodide omul reprezintă doar o gazdă accidentală, în cazul când se află în arealul acestora [4]. Din punct de vedere al importanței epidemiologice ca vectori ai agenților patogeni, ixodidele se află pe locul doi, fiind precedate doar de țânțari [10].

Atestarea fenomenului de schimbare a climei a determinat focusarea atenției Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) la începutul anilor 90, asupra unei noi provocări, asociată cu creșterea pericolului bolilor infecțioase transmise prin vectori. Monitoringul instituit a inclus proceduri urmărind trei direcții: răspândirea vectorilor, modificarea arealului și particularitățile lor de interacțiune cu gazdele intermediare și gazdele-rezervor; studiul incidenței bolilor parazitare și infecțioase în condiții de extindere a arealului vectorilor; comportamentul omului și a marjei de rezistență și elasticitate în cadrul echilibrului dinamic ce se creează între populațiile umane, a vectorului și a agentului patogen [11]. În condițiile actuale, de globalizare intensivă și schimbări climaterice majore, tot mai actuale sunt studiile privind biologia, ecologia și rolul epidemiologic al celor mai importanți vectori din domeniul arahnentomologiei [12]. În prezent, în întreaga lume a crescut interesul pentru bolile transmise prin vectori în contextul, în care incidența acestora este în ascendență [13, 14, 15].

Republica Moldova se află într-o zonă temperată, cu climă caldă, diverse ecosisteme și cu prezența tuturor componentelor sistemului parazitare, care crează condiții favorabile pentru circulația virusului encefalitei acariene în populația vectorilor, animalelor și a multiplicării contactelor vector – om. Situația ecologo-faunistică a țării noastre la etapa actuală este influențată și de procesele de modificare continuă a teritoriilor prin intermediul activităților antropogene, distrugerea spațiilor împădurite și acvatice, urbanizarea intensă, modificări ale complexului agro-industrial etc. [16, 17]. Studiile anterioare efectuate în țară au demonstrat prezența virusului encefalitei acariene la vectori - speciile de ixodide [18], ce atestă existența și menținerea agentului cauzal în limita habitatului vectorilor și creșterea pericolului de contractare a bolii odată cu extinderea arealului în condițiile actuale de schimbare a climei. Totodată, rezultatele studiului de seroprevalență, efectuate în anii 80 ai secolului trecut, pentru detectarea anticorpilor specifici față de encefalita acariană a elucidat rezultate pozitive la 16 persoane (0,6%) din 2634 de persoane investigate [19].

În rețeaua de supraveghere a bolilor infecțioase din țările

membre ale Uniunii Europene, encefalita acariană a fost inclusă în lista maladiilor raportabile în 2012 [15]. Totodată, în unele țări din regiunea europeană, evidența statistică a cazurilor de encefalită acariană, a existat și anterior, inclusiv în Republica Moldova.

Scopul prezentului studiu a constat în determinarea circulației agentului cauzal al encefalitei acariene în populațiile de vectori, estimarea pericolului de apariție a acestei nosologii și corelația cu morbiditatea umană și a fost realizat în anii 2009-2012, cu suportul și în colaborare cu laboratorul Centrului de Stat Științific – Virusologic și Biotehnologic „Vector”, Novosibirsk, Federația Rusă.

Material și metode

Studiul a fost realizat în diverse ecosisteme: păduri, margini de păduri, biotopuri palustre, zone de agrement și odihnă în zonele geografice ale Republicii Moldova. Căpușele au fost colectate în puncte santinelă, în perioada activității lor biologice maxime (lunile de primăvară-toamnă) prin metode clasice parazitologice [20]. De pe vegetație și animale domestice (vite mari și mici cornute, câini) au fost colectate 1801 exemplare căpușe ixodide. Identificarea la nivel de specie s-a realizat în baza determinantului [20] cu ajutorul examenului microscopic al specimenelor la binocular, în laboratorul Centrului Național de Sănătate Publică (CNSP). A fost stabilită diversitatea speciilor ixodide, abundența și răspândirea lor teritorială. Prin metoda randomizată căpușele au fost selectate pentru determinarea prezenței agentului cauzal al encefalitei acariene, fiind formate din 2 loturi. Căpușele, 290 de exemplare, sistematic aparținând gen. *Ixodes*, *Dermacentor* și *Haemaphysalis* au fost examinate în laboratorul CNSP. În laboratorul Centrului de Stat Științific-Virusologic și Biotehnologic „Vector” Novosibirsk, Federația Rusă au fost examinate 344 de exemplare căpușe.

În studiul de seroprevalență pentru determinarea frecvenței anticorpilor specifici față de antigenul encefalitei acariene au fost incluse probe de ser, prelevate de la persoane care s-au adresat pentru testarea de laborator la borelioza Lyme, au prezentat manifestări clinice compatibile cu encefalita acariană și au indicat în anamneză prezența ”mușcăturii” de căpușe. Screeningul serologic a inclus 259 de probe de ser uman. Materialul colectat a fost examinat prin metodele: microbiologice (serologice de determinare a antigenului și a anticorpilor specifici în serul uman în reacția imunoenzimatică (ELISA), folosind kitul Вектор ВКЭ – антиген (Federația Rusă) și kitul diagnostic Nova LISA TBE IgM IgG (Germania); biologie moleculară – amplificarea ARN în reacția de polimerizare în lanț (PCR), folosind kitul ПНБО Сорт (Интерлабсервис, Россия). Analiza datelor s-a efectuat prin metode epidemiologice și statistice în baza programului Microsoft Office Excel 2010.

Rezultate și discuții

Căpușele ixodide, colectate de pe vegetație din diverse ecosisteme, taxonomic s-au încadrat în 4 specii: *Ixodes ricinus* (n = 826; 76,8%); *Dermacentor reticulatus* (n = 104; 9,7%);

D. marginatus (n = 86; 8,0%) și *Haemaphysalis punctata* (n = 59; 5,5%) (fig. 1). Specia dominantă s-a dovedit a fi *I. ricinus*, fiind cea mai larg răspândită în ecosistemele cercetate. Celelalte specii au fost identificate într-un număr mai mic.

Antigenul virusului encefalitei acariene a fost determinat la toate 4 specii *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus* și *H. punctata* colectate, înregistrând un potențial vectorial divers și, concomitent, fiind implicate într-un proces epizootic continuu. Rezultatele cercetărilor de laborator a 290 de exemplare căpușe au elucidat faptul că ponderea probelor pozitive care semnifică căpușe contaminate, în medie pe țară a constituit 25,1%.

Din numărul total de căpușe contaminate (fig. 2) *Dermacentor sp.* îi revine cea mai mare pondere de 76,7%, succedată de *I. ricinus* – 17,8% și *Haemaphysalis sp.* – 5,5%.

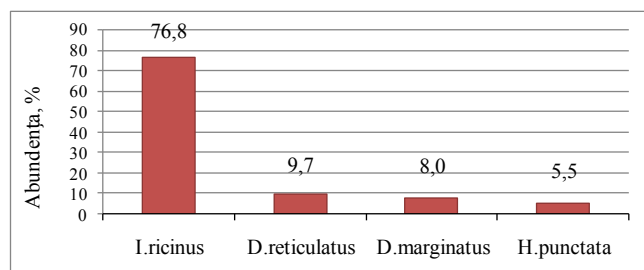


Fig. 1. Diversitatea și abundența speciilor ixodide (*Acarina: Ixodidae*), colectate de pe vegetație din diverse ecosisteme ale Republicii Moldova.

Astfel, rolul principal în menținerea circulației virusului encefalitei acariene în natură și transmiterea lui speciilor de animale, pe care preponderent se alimentează, aparține căpușelor *Dermacentor sp.* Cât privește riscul de contractare a agentului patogen de către om, prin intermediul acestei specii de vector, el este mai mic, comparativ cu specia *I. ricinus*, fiindcă căpușele *Dermacentor sp.* foarte rar atacă omul. Căpușele *I. ricinus* sunt vectorii care trebuie să preocupe specialiștii de sănătate publică, fiindcă rezultatele au demonstrat o prezență a antigenului virusului encefalitei acariene în fiecare a 6-ea căpușă investigată.

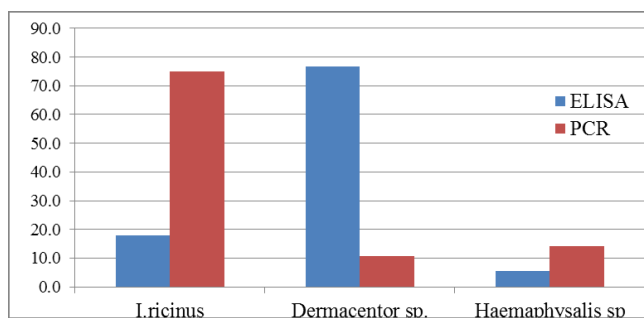


Fig. 2. Distribuția rezultatelor pozitive de contaminare a speciilor ixodide cu virusul encefalitei acariene.

Prin intermediul tehnicii PCR au fost testate 344 de exemplare căpușe, ARN virusului encefalitei acariene a fost identificat în 8,1% probe din numărul total de exemplare

ixodide investigate. Ponderea probelor pozitive a avut o distribuție inversă, comparativ cu rezultatele investigațiilor la prezența antigenului virusului encefalitei acariene: rata căpușelor speciei *I. Ricinus*, la care s-a identificat ARN viral a constituit 75,0%, *Haemaphysalis sp.* – 14,3% și *Dermacentor sp.* – 10,7% (fig. 2).

Aceste date confirmă persistența agentului cauzal al encefalitei acariene în populațiile diferitor specii de ixodide, preponderent la specia *I. ricinus* prezentând pericol de transmitere a agenților cauzali ai encefalitei acariene la om. Probabilitatea transmiterii infecției la om depinde de mai mulți factori: relația virus-gazdă, doza de virus inoculată, locul mușcăturii căpușei, precum și de alte particularități ce țin de capacitatea organismului de a răspunde prin mecanisme imunologice de protecție la infecție etc. [5].

În studiul de seroprevalență au fost selectate randomizat probe de ser, prelevate conform cerințelor de biosiguranță. Probele de ser au fost împărțite în 2 aliquote, pentru determinarea anticorpilor specifici față de antigenii boreliozei Lyme și encefalitei acariene. În lotul de cercetare la encefalită acariană, probele au fost incluse indiferent de rezultatul la borelioza Lyme. Analiza structurii eșantionului cercetat denotă că dintre 259 de persoane investigate (77,6%), care au remarcat prezența mușcăturii de căpușe, au avut reședință în zonă urbană – 212 și rurală – 47 de persoane. Printre criteriile de selectare a probelor în studiu a fost listată și manifestarea clinică compatibilă cu encefalita acariană. Persoanele selectate au avut următoarele manifestări clinice și sindroame: febră, eritem, encefalomielită, encefalită, vasculită, artrită și diagnoze clinice de neuropatie facială, infecție respiratorie virală acută, infecție enterovirală, febra Q, leptospiroză etc.

În rezultatul investigațiilor, anticorpi specifici față de virusul encefalitei acariene au fost depistați la 25 de persoane (9,6%), dintre care 16 persoane au prezentat, în paralel, anticorpi specifici față de virusul encefalitei acariene și pentru *Borrelia burgdorferi*. Din eșantionul de cercetare, anticorpi specifici doar față de virusul encefalitei acariene s-au depistat la 9 persoane (4%) din mun. Chișinău (6) și Tiraspol (3), cu vârsta cuprinsă între 1-10 ani – 4 persoane, 20-30 de ani – 3 persoane, 49-50 de ani și 60 de ani - câte o persoană. În perioada 2011-2012, prin metoda imunoenzimatică (Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) au fost depistate în 7 probe de ser IgG: 3 probe – pe parcursul lunilor ianuarie – martie și 4 – în lunile mai – iulie, pe când IgM - în 2 probe prelevate în lunile iunie – iulie. Astfel, studiul de seroprevalență a demonstrat că în eșantionul de cercetare, ponderea probelor cu anticorpi specifici față de antigenul encefalitei acariene a constituit 4,0%. Criteriile de laborator indicate pentru confirmarea cazurilor clinice includ următoarele metode: detectarea anticorpilor specifici IgM și IgG în sânge, detectarea IgM în LCR, stabilirea seroconversiei sau creșterea de patru sau mai multe ori a titrului anticorpilor serici specifici, detectarea acidului nucleic viral sau izolarea virusului în prelevatele biologice [21].

Deși lista maladiilor raportabile în sistemul de supraveghere a bolilor infecțioase în țara noastră include și encefalita

transmisă prin căpușe, la moment definiția de caz pentru raportarea acestei nosologii nu este elaborată. Definiția de caz pentru raportarea encefalitei acariene în rețeaua de supraveghere a bolilor infecțioase din țările membre ale Uniunii Europene a fost aprobată în 2012 și urmează să fie transpusă și în sistemul național de supraveghere cu respectarea aceluiași criterii de raportare drept "caz probabil", pentru care se presupune existența circumstanțelor clinice și detectarea IgM într-o probă de ser și "caz confirmat" - manifestările clinice cu confirmare prin metodele de laborator enumerate. Definiția de "caz posibil" nu se aplică în cazul encefalitei acariene.

Această maladie în țara noastră nu a fost înregistrată în statistica oficială până în 2010, primele cazuri fiind raportate în 2011 – 2 cazuri și 2012 – 1 caz în regiunea transnistreană. Cazurile au fost confirmate prin metode de laborator, fiind raportate în formularul statistic nr. 2 "Privind bolile infecțioase și parazitare".

Concluzii

Rezultatele studiului dat denotă prezența riscului de emergență a encefalitei acariene în unele teritorii ale Republicii Moldova.

Condițiile climaterice favorabile pentru creșterea numărului de populație a speciei de căpușe *I. ricinus*, prezența și circulația intensă a agenților cauzali ai encefalitei acariene determină necesitatea continuării studiului ecologic al ixodidelor cu elaborarea unui sistem comprehensiv de monitorizare și optimizare a supravegherii maladiilor infecțioase, transmise prin vectori.

Unul din criteriile de bază pentru elaborarea măsurilor adecvate de prevenție este clasificarea teritoriilor în dependență de riscul potențial epidemiologic.

Raționalizarea sistemului de supraveghere epidemiologică și control al encefalitei acariene rezidă în elaborarea și implementarea definiției de caz pentru raportare în baza criteriilor clinice, de laborator și legăturii epidemiologice, precum și studierea pentru obținerea datelor standardizate și comparabile.

References

1. Tarasov VV. Meditsinskaya entomologiya [Medical entomology]. Moskva, 1996;352.
2. ECDC Technical report. Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries. Stockholm: ECDC. Sep 2012:59. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/tbe-in-eu-efat.pdf>
3. Zilber LA. Vesennyi (vesenne-letniy) endemicheskiy kleshchevoy entsefalit. [Spring (spring-summer) endemic tick-borne encephalitis]. *Arkh. biol. nauk.* 1939;56(2):9-37.
4. Alekseev AN, Dubinina EV. Virus kleshchevogo entsefalita vo vnutrenney srede kleshcha-perenoschika, ekologicheskie aspekty [Tick-borne encephalitis virus in the internal environment of a tick vector, ecological aspects]. *Byulleten SO RAMN.* 2007;126(4):100-104.
5. Palmer SR, Lord Soulsby, Simpson DI. Zoonoze [Zoonoses]. Trad. R. Ionescu, M. Mazanet, A-V. Popa, S. Petrescu. București: Editura științelor medicale, 2005;860.
6. European Centre for Disease Prevention (ECDC). Tick-borne encephalitis. Fact sheet for health professionals. Stockholm: ECDC. 16 Jun 2010. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/tick_borne_diseases/tick_borne_encephalitis/basic_facts/Pages/factsheet_health_professionals.aspx
7. ECDC TBE situation in individual European countries. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/spotlight/spotlight_tick_borne/Pages/situation_in_european_countries.aspx
8. Kovalev SY, Kokorev VS, Belyaeva IV. Distribution of Far Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 12):2941-6.
9. Gratz N. Transmissivnye infektsionnye zabolevaniya v Evrope ikh rasprostraneniye i vliyaniye na obshchestvennoye zdravookhraneniye [Vector-borne infectious diseases in Europe, their spread and impact on public health]. Vsemirnaya Organizatsiya Zdravookhraneniya, Evropa. 2005;158.
10. Coipan Elena Claudia. *Ixodidae (Acari)* vectori pentru speciile de *Borrelia* care sunt agenți etiologici pentru maladia Lyme în România. [Ixodidae (Acari) vectors for *Borrelia* species that are the etiological agents of Lyme disease in Romania]. Rezumate teze de doctor. România, 2010;45.
11. Potential Health Effects of Climatic Change. Report of a WHO Task Group. Geneva, 1990.
12. Mehlhorn H. Encyclopedic reference of parasitology. Heidelberg: Springer-Berlin, 2001.
13. Walke DH. Tick-transmitted infectious diseases in the United States. *Ann. Rev Public Health.* 1998;19:237-269.
14. Walker DH. Ehrlichia under our noses and no one notices. *Arch Virol.* 2005;19:147-156.
15. Amato-Gauci AJ, Zeller H. Tick-borne encephalitis joins the diseases under surveillance in the European Union. *Eurosurveillance. Europe's journal on infectious disease epidemiology, prevention and control.* 2012;17(42):2-3. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N42/V17N42.pdf>
16. Gheorghita S, Chicu V, Fyodorova M, et al. Vector-borne diseases in the Republic of Moldova. Updates and perspectives. Materialele Sesiunii științifice internaționale "Muzeul și Cercetarea Științifică". Craiova, România, 16-18 septembrie 2010. Studii și comunicări. Științele naturii [Materials of International Scientific Session "Museum and Scientific Research." Craiova, Romania, 16-18 September, 2010. Education and Communication. Natural science]. Tom. XXVI. 2010;95-99.
17. Gheorghita S, Burlacu V, Caraman N. Diversitatea și rolul vectorilor (căpușe ixodide, țânțari hematofagi) în răspândirea maladiilor transmisibile pe teritoriul Republicii Moldova. Materialele simpozionului științific internațional Rezervația „Codrii” 40 de ani. Chișinău, Știința 29-30 septembrie [Diversity and role of vectors (Ixodidae tick, mosquito hematophagous) in the spread of communicable diseases in the Republic of Moldova. Reserve Materials of International Scientific Symposium "Codrii" 40 years old. Chisinau, Science, September 29-30]. 2011;176-179.
18. Uspenskaya IG. Iksodovye kleshchi Dnestropetrovsko-Prutskogo mejdureciya [Ticks of Dniester-Prut interfluve]. Kishinev: „Știința”, 1987;144.
19. Iarovoi PI, Scofertza PG, Coricimaru ND. Rezultaty obsledovaniya naselenii nekotorykh rayonov MSSR na nalichie antitel k kleshchevomu entsefalitu [The results of surveys of the population of some areas of MSSR for the presence of antibodies to tick encephalitis]. *Zdravookhraneniye.* 1978;2:39-40.
20. Filippova NA. Iksodovye kleshchi podsemeystva *Ixodidae* [Ticks belonging to *Ixodidae* subfamily]. Fauna SSSR, Paukoobraznie. Tom IV. Sankt Peterburg: Nauka, 1977;393.
21. European Commission. Decisions Commission implementing decision of 8 August 2012, amending Decision 2002/253/EC, laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council, (2012/506/EU), Official Journal of the European Union L 262/1. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:262:0001:0057:EN:PDF>