

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Evaluarea particularităților interacțiunii
patogen-gază în infecția cu virusurile gripale**

REZUMAT

**Conducător de doctorat
PROF. UNIV. DR. STREINU-CERCEL ADRIAN**

**Student-doctorand
MIRON VICTOR DANIEL**

2023

Cuprinsul tezei de doctorat

Cuprins	2
Listă cu lucrările științifice publicate	6
Listă cu abrevieri și simboluri	10
PARTEA GENERALĂ.....	12
Introducere.....	12
1. Particularități ale agentului patogen – virusurile gripale	15
1.1. Particularități structurale și genetice ale virusurilor gripale	15
1.2. Particularități epidemiologice ale virusurilor gripale	21
2. Particularități ale gazdei umane	24
2.1. Femeia gravidă.....	25
2.2. Nou-născutul, copilul mic și preșcolarul	25
2.3. Adultul vârstnic.....	26
2.4. Prezența comorbidităților.....	26
2.5. Obezitatea	27
2.6. Imunosupresia	28
2.7. Factorii genetici	29
3. Expresia clinică a infecției cu virusurile gripale la om	30
3.1. Diagnosticul pozitiv de gripă.....	30
3.2. Gripa necomplicată	32
3.3. Complicații ale gripei.....	33
3.3.1. Complicații datorate acțiunii directe a virusurilor gripale.....	33
3.3.2. Complicații asociate răspunsului inflamator sistemic al gazdei.....	34
3.3.3. Complicații prin decompensarea patologiilor cronice.....	35
3.3.4. Suprainfecții virale/bacteriene.....	36
3.3.5. Complicații la distanță, în perioada de convalescență post-gripală.....	36
4. Patogenia interacțiunii cu virusurile gripale.....	37
4.1. Generalități ale interacțiunii virusuri gripale – gazdă umană	37
4.2. Interacțiuni specifice cu virusurile gripale în raport cu particularitățile gazdei	39
4.2.1. Femeia gravidă	39
4.2.2. Nou-născutul, copilul mic și preșcolarul	40
4.2.3. Adultul vârstnic	41
4.2.4. Obezitatea	43
CONTRIBUȚII PERSONALE	47
5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale	47

6.	Metodologia generală a studiilor doctorale.....	49
6.1.	Prezentarea direcțiilor de cercetare.....	49
6.2.	Aprobările de realizare a studiilor.....	50
6.3.	Analiza statistică.....	50
7.	Caracteristici epidemiologice ale virusurilor gripale și particularități ale pacienților spitalizați cu gripă în sezoanele 2018-2023.....	52
7.1.	Introducere.....	52
7.2.	Metode.....	53
7.2.1.	Tipul de studiu.....	53
7.2.2.	Perioada de studiu.....	53
7.2.3.	Definiții de caz.....	53
7.2.4.	Populația de studiu – criteriile de includere și excludere.....	54
7.2.5.	Proceduri de studiu.....	55
7.3.	Rezultate.....	59
7.3.1.	Caracteristici epidemiologice ale virusurilor gripale aflate în circulație în perioada 2018-2023.....	59
7.3.1.1.	Caracteristici generale (2018-2023).....	59
7.3.1.2.	Caracteristicile epidemiologice ale sezonului gripal 2018/19.....	65
7.3.1.3.	Caracteristicile epidemiologice ale sezonului gripal 2019/20.....	66
7.3.1.4.	Caracteristicile epidemiologice ale sezonului gripal 2020/21.....	70
7.3.1.5.	Caracteristicile epidemiologice ale sezonului gripal 2021/22.....	70
7.3.1.6.	Caracteristicile epidemiologice ale sezonului gripal 2022/23.....	73
7.3.2.	Particularități clinico-evolutive ale pacienților spitalizați cu gripă.....	75
7.3.2.1.	Comparații clinico-evolutive între cazurile pozitive și negative.....	75
7.3.2.2.	Particularități clinico-evolutive ale gazdei cu gripă.....	85
7.4.	Discuții și concluzii.....	95
8.	Particularități genetice ale virusurilor gripale în raport cu particularitățile gazdei (sezoanele 2019-2023).....	105
8.1.	Introducere.....	105
8.2.	Metode.....	107
8.2.1.	Tipul și perioada de studiu.....	107
8.2.2.	Selecția probelor pentru secvențiere.....	107
8.2.3.	Pregătirea probelor pentru secvențierea întregului genom viral.....	107
8.2.4.	Secvențierea de nouă generație – tehnologia Illumina.....	108
8.2.5.	Prelucrarea bioinformatică a secvențelor nucleotidice.....	109
8.2.6.	Analiza filogenetică în segmentul codificator al hemaglutininei.....	109

8.2.7.	Analiza mutațiilor asociate cu rezistența la oseltamivir în gena NA.....	110
8.2.8.	Estimarea matematică a eficacității vaccinale	110
8.3.	Rezultate	111
8.3.1.	Caracteristici moleculare ale virusurilor gripale A/H1 și particularitățile gazdei 112	
8.3.2.	Caracteristici moleculare ale virusurilor gripale A/H3 și particularitățile gazdei 118	
8.3.3.	Caracteristici moleculare ale virusurilor gripale B și particularitățile gazdei ...	125
8.3.4.	Analiza moleculară a genei neuraminidazei și incidența mutațiilor de rezistență la oseltamivir	129
8.4.	Discuții și concluzii	131
9.	Impactul pandemiei de COVID-19 asupra epidemiologiei virusurilor gripale.....	138
9.1.	Introducere	138
9.2.	Metode	139
9.2.1.	Materiale și metode sub-studiul 1.....	139
9.2.2.	Materiale și metode sub-studiul 2.....	139
9.3.	Rezultate	140
9.3.1.	Impactul pandemiei de COVID-19 asupra circulației virusurilor respiratorii în rândul pacienților spitalizați	140
9.3.2.	Re-emergența gripei în sezonul 2021-2022 - analiza datelor din practica reală	145
9.4.	Discuții și concluzii	147
10.	Înțelegerea intervențiilor de modulare a interacțiunii patogen-gazdă prin vaccinare ..	151
10.1.	Introducere	151
10.2.	Metode.....	152
10.3.	Rezultate.....	153
10.4.	Discuții și concluzii.....	157
	Concluzii generale și contribuții personale	160
	Listă figuri	172
	Listă tabele.....	174
	Bibliografie.....	176
	Anexa 1. Afecțiuni clinice compatibile cu gripa	196
	Anexa 2. Caracteristicile cazurilor pozitive cu gripă pentru fiecare sezon	198
	Anexa 3. Evoluția genetică a virusurilor gripale A/H1, A/H3, B/Victoria	200
	Anexa 4. Coduri GISAID ale virusurilor gripale secvențiate.....	202
	Anexa 5. Detalii ale arborelui filogenetic A/H1 (secvențe HA) sezon 2022/23.....	204
	Anexa 6. Detalii ale arborelui filogenetic A/H3 (secvențe HA) sezon 2021/22.....	207

Anexa 7. Detalii ale arborelui filogenetic A/H3 (secvențe HA) sezon 2022/23.....	210
Anexa 8. Detalii ale arborelui filogenetic B/Victoria (secvențe HA) sezon 2022/23.....	212
Anexa 9. Articole in extenso publicate din studiile tezei de doctorat	215

Rezumatul tezei de doctorat

”Evaluarea particularităților interacțiunii patogen-gază în infecția cu virusurile gripale”

Teza de doctorat este structurată în 2 părți: partea generală, formată din 4 capitole, în care este prezentat stadiul actual al cunoașterii printr-o sinteză a celor mai recente studii publicate pe teme abordate în teza de doctorat; și o parte de contribuții personale în care sunt prezentate rezultatele celor 4 studii efectuate de-a lungul studiilor doctorale.

PARTEA GENERALĂ

Capitolul 1. Particularități ale agentului patogen – virusurile gripale

În acest capitol sunt abordate noțiuni privind structura virusurilor gripale, cu accent pe virusurile gripale A și B. Am evidențiat structura ARN fragmentată în 8 segmente, fiecare dintre ele codificând proteine structurale și non-structurale [1, 2]. De asemenea, am rezumat cele mai recente studii cu privire la rolurile pe care le au glicoproteinele de suprafață, hemaglutinina (HA) și neuraminidaza (NA), în replicarea și reasortarea virală [3, 4]. În subcapitolul 1.2. am evidențiat particularitățile epidemiologice ale virusurilor gripale, cu accent pe povara bolii, sezonabilitate, rezervoare naturale, variabilitatea genetică și epidemiologia moleculară.

Capitolul 2. Particularități ale gazdei umane

În acest capitol am evidențiat faptul că răspunsul gazdei umane la infecția cu virusurile gripale nu este întotdeauna cel mai eficient, fiind dependent de anumite caracteristici, precum vârsta, comorbiditățile asociate, particularitățile genetice sau memoria imună determinată de o expunere anterioară la antigen, vaccinală sau prin infecție. Am identificat grupele de risc pentru gripă conform Centrul European pentru Prevenția și Controlul Bolilor (ECDC) [5], Organizația Mondială a Sănătății (OMS) [6] și Centrul pentru Controlul și Prevenirea Bolilor (CDC) [7] din SUA. În mod special am abordat particularități ale femeii gravide, nou-născutului, copilului mic, preșcolarului și ale adultului vârstnic, ale pacientului cu obezitate, ale pacientului cu imunosupresie și ale pacientului cu multiple boli cronice. În final am discutat susceptibilitatea și evoluția către gripă severă prin implicarea factorilor genetici [8].

Capitolul 3. Expresia clinică a infecției cu virusurile gripale la om

Capitolul 3 evidențiază algoritmul stabilirii diagnosticului de gripă pe criterii clinice, anamnestice și epidemiologice, precum și utilizarea diferitelor tehnici de laborator pentru identificarea virusurilor gripale. Cel de-al treilea subcapitol (3.3) rezumă complicațiile care pot să apară în gripă prin acțiunea directă a virusurilor gripale la nivelul organului/țesutului afectat sau prin răspunsul inflamator sistemic disproporționat al gazdei, ori prin decompensări ale bolilor cronice ale pacientului și prin suprainfecții virale/bacteriene. Totodată, am evidențiat complicații care pot apărea în perioada de convalescență.

Capitolul 4. Patogenia interacțiunii cu virusurile gripale

În acest capitol am abordat într-o manieră originală interacțiunea dintre virusurile gripale și gazda umană. Am arătat că în timpul infecției gripale, oamenii dezvoltă răspunsuri imune înnăscute și adaptative care au ca scop eliminarea infecției, dar care sunt particulare fiecăruia dintre noi. Scopul final este eliminarea agentului patogen sau reducerea impactului negativ al infecției cu acesta [9]. Însă o gazdă care nu este capabilă să reducă impactul determinat de virusul gripal sau nu poate tolera consecințele răspunsului imun la infecție, devine predispusă către o evoluție nefavorabilă [9]. Mecanismele răspunsului imun nespecific, dar și specific au fost rezumate într-o figură originală creată cu licență de publicare cu softul BioRender.com. În sub-capitolul 4.2 am evidențiat interacțiunile specifice la nivel molecular ale virusurilor gripale cu femeia gravidă, sugarii și copiii mici, adulții vârstnici și pacienții cu obezitate. De asemenea, toate datele au fost rezumate în figuri originale create cu licență de publicare utilizând softul BioRender.com.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Scopurile principale ale prezentei lucrări de doctorat au fost de a evalua în dinamică epidemiologia locală a virusurilor gripale și de a caracteriza particularitățile interacțiunii cu gazda umană în timpul infecției cu acestea.

Obiectivele lucrării de doctorat derivate din scopurile enunțate au fost:

- O1. Caracterizarea circulației sezoniere a gripei în funcție de tipuri și subtipuri/linii virale și particularitățile gazdei în rândul pacienților care necesită spitalizare;

- O2. Caracterizarea tabloului clinic al infecției gripale în funcție de tipuri și subtipuri/linii virale și particularitățile pacientului;
- O3. Monitorizarea evoluției clinice a pacienților spitalizați cu gripă, în funcție de vârstă, comorbidități și co-infecții;
- O4. Identificarea, caracterizarea și stratificarea factorilor de risc pentru evoluție nefavorabilă la pacienții spitalizați cu gripă;
- O5. Caracterizarea epidemiologiei moleculare a virusurilor gripale;
- O6. Identificarea asocierilor între evoluția genetică a virusurilor gripale și particularitățile gazdei;
- O7. Evaluarea impactului pandemiei de COVID-19 asupra epidemiologiei virusurilor gripale și modificări în epidemiologia virusurilor respiratorii;
- O8. Evaluarea acceptabilității vaccinării antigripale ca măsură de modulare a interacțiunii patogen-gazdă.

Capitolul 6. Metodologia generală a studiilor doctorale

În acest capitol am arătat că îndeplinirea obiectivelor este realizată prin 4 studii: primul, prezentat în capitolul 7, răspunde obiectivelor 1, 2, 3 și 4; al doilea, prezentat în capitolul 8, răspunde obiectivelor 5 și 6; al treilea, prezentat în capitolul 9, răspunde obiectivului 7; și cel de-al patrulea, prezentat în capitolul 10, răspunde obiectivului 8.

De asemenea, am prezentat granturile internaționale câștigate prin competiție anuală, în cadrul cărora au fost efectuate studiile prezentate la capitolele 7 și 8, și anume: Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN) prospective epidemiological active surveillance study. și Development of Robust and Innovative Vaccine Effectiveness (DRIVE).

Tot în acest capitol am detaliat testele statistice pe care le-am utilizat în analiza datelor din această teză de doctorat.

Capitolul 7. Caracteristici epidemiologice ale virusurilor gripale și particularități ale pacienților spitalizați cu gripă în sezoanele 2018-2023

Acest capitol prezintă rezultatele primului studiu, fiind structurat în: introducere, metode, rezultate, discuții și concluzii.

Metode

Am efectuat un studiu epidemiologic observațional de supraveghere prospectivă activă a gripei spitalizate timp de 5 sezoane consecutive (2018/19 - 2022/23), prin participarea Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” în proiecte anuale finanțate de două mari consorții internaționale: GIHSN [10] și DRIVE [11].

Studiul prezent s-a derulat anual timp de 5 sezoane consecutive în perioada noiembrie – aprilie, interval inclus în cel de supraveghere oficială la nivel național a infecțiilor respiratorii acute: infecții respiratorii acute compatibile cu gripa (ILI) și infecții respiratorii acute severe (SARI).

Au fost incluși în studiu pacienții care îndeplineau simultan toate criteriile de includere definite mai jos: pacient spitalizat în Institutul Național de Boli Infecțioase “Prof. Dr. Matei Balș” pentru ILI/SARI, cu debut al simptomatologiei în ultimele 7 zile, care a semnat consimțământul informat și pentru care a existat posibilitatea prelevării unei probe respiratorii în primele 48 de ore de la momentul internării.

Au fost descrise procedurile de studiu: identificarea cazurilor, semnarea consimțământului informat și verificarea eligibilității, completarea unui chestionar medical standardizat, recoltarea unei probe respiratorii, identificarea virusurilor gripale prin RT-PCR și monitorizarea evoluției pacientului.

Rezultate - Caracteristici epidemiologice ale virusurilor gripale aflate în circulație în perioada 2018-2023

În rândul pacienților spitalizați pentru ILI/SARI de-a lungul celor cinci sezoane am identificat o rată globală de pozitivitate la gripă de 41.9%. Circulația virusurilor gripale a fost neuniformă în cele 5 sezoane analizate, cu rate de pozitivitate pentru gripă diferite: 41.2% în sezonul 2018/19, 49.5% în sezonul 2019/20, 0% în sezonul 2020/21, 31.7% în sezonul 2021/22 și 50.6% în sezonul 2022/23 (Figura 7.1).

Virusurile gripale A au predominat în 79.3% din cazuri. În funcție de subtipuri/linii virale am identificat următoarea distribuție a cazurilor de gripă: 38.2% A/H1, 33.6% A/H3, 7.3% A netipat, 20.5% B/Victoria și 0.4% B netipat. Mediana vârstei pacienților pozitivi pentru gripă a fost semnificativ mai mică comparativ cu cea a pacienților negativi (7.6 ani vs. 13.9 ani, $p < 0.001$). Virusurile gripale B au fost mai frecvent izolate la copii ($p < 0.001$, OR=3.2), în special școlari și adolescenți ($p < 0.001$).

Rezultate - Comparații clinico-evolutive între cazurile pozitive și negative

Din punct de vedere al tabloului clinic, am identificat faptul că cele mai frecvente simptome la pacienții cu gripă au fost febra (96.1%) și tusea (91.0%). În plus, am stratificat riscul simptomelor astfel: pacienții cu gripă au avut un risc de 4.4 ori mai mare de a prezenta febră ($p<0.001$), de 2.5 ori mai mare de a avea congestie nazală ($p<0.001$), de 1.8 ori mai mare de a prezenta tuse ($p<0.001$), de 1.5 ori mai mare de a avea mialgii ($p<0.001$), de 1.3 ori mai mare de a prezenta odinofagie ($p=0.002$) și de 1.2 ori mai mare de a acuza cefalee ($p=0.005$). În contrast, prezența dispneei ($OR=0.6$, $p<0.001$), a scaunelor diareice ($OR=0.5$, $p<0.001$), a anosmiei ($OR=0.2$, $p=0.001$) și a junghiului toracic ($OR=0.2$, $p=0.001$) au fost asociate negativ cu gripa (Figura 7.2).

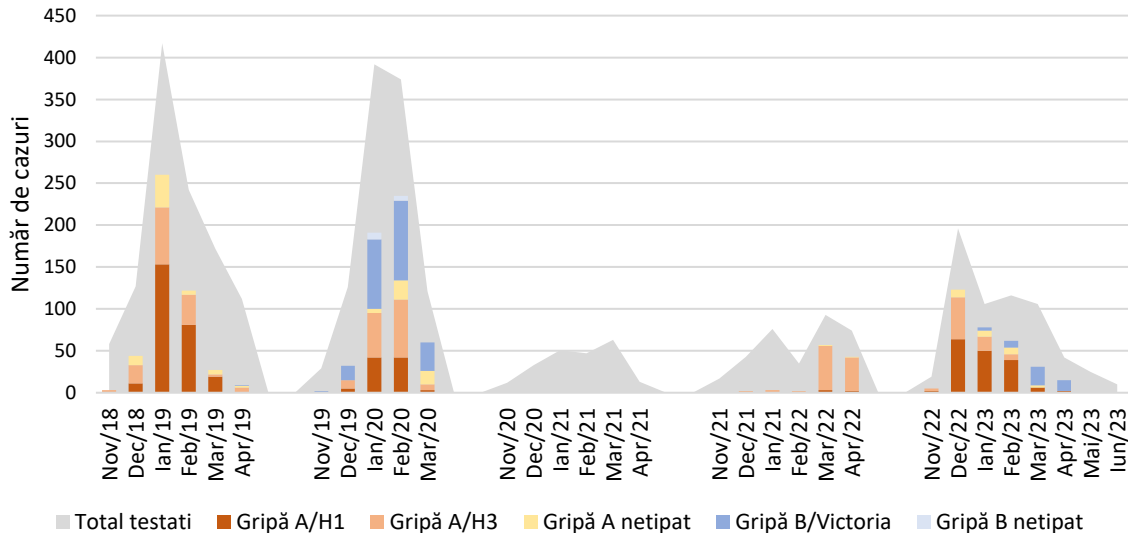


Figura 7.1. Distribuția lunară a cazurilor pozitive de gripă în funcție de subtip în cele 5 sezoane

Analiza multivariată a combinațiilor de simptome a arătat că febra ($OR=4.4$) rămâne cel mai bun predictor al gripei în timpul sezonului rece, urmată de combinația de febră și tuse ($OR=2.7$, $p<0.001$), febră și congestie nazală ($OR=2.2$, $p<0.001$), respectiv febră, tuse și congestie nazală ($OR=2.2$, $p<0.001$).

În plus, am calculat sensibilitatea asocierilor de simptome în identificarea cazurilor pozitive de gripă și am arătat că asocierea febră, tuse, congestie nazală și mialgii are cea mai bună sensibilitate, de 80.9% ($p<0.001$).

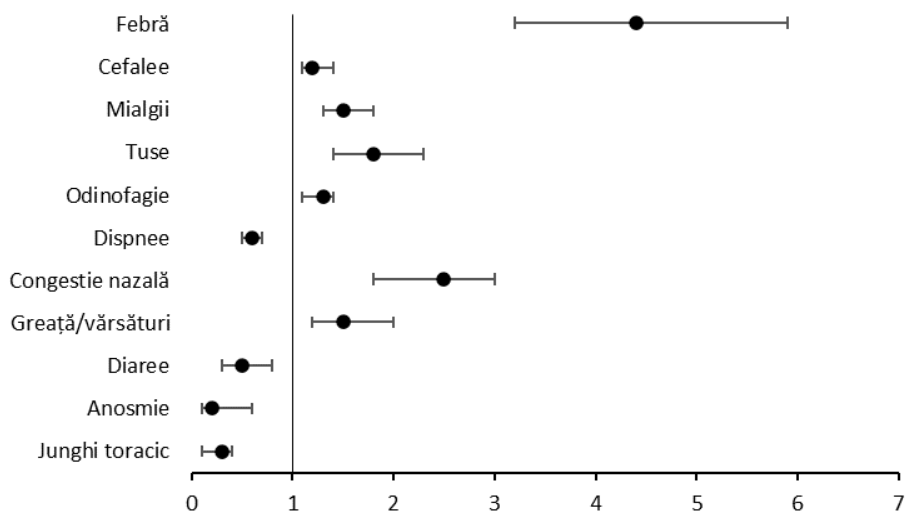


Figura 7.2. Manifestări clinice asociate cu gripa

Rezultate - Particularități clinico-evolutive ale gazdei cu gripă

Mediana duratei de spitalizare pentru toți pacienții cu gripă din studiu a fost de 4 zile, fiind semnificativ mai mare la sugari (5 zile, $p < 0.001$) și vârstnici (8 zile, $p < 0.001$). După excluderea tuturor factorilor de risc legați de vârstă, boli cronice, co-infecții și a tuturor cazurilor care au asociat complicații, mediana duratei de spitalizare a pacienților cu gripă necomplicată s-a redus la 2 zile ($p < 0.001$) (Figura 7.3).

Am identificat impactul factorilor de risc asupra duratei de spitalizare a pacienților cu gripă. Astfel, mediana duratei de spitalizare a fost de 6 zile pentru pacienții cu cel puțin o boală cronică ($p < 0.001$) și de 8 zile la pacienții cu cel puțin 3 boli cronice ($p < 0.001$). În mod specific, pacienții cu obezitate au avut o mediană a duratei de spitalizare de 6 zile ($p < 0.001$), cei cu boli cardiovasculare, diabet și boli neoplazice de 7 zile ($p < 0.001$, pentru fiecare). Pacienții cu pneumonie au necesitat 5.5 zile de spitalizare ($p < 0.001$), iar dezvoltarea insuficienței respiratorii și internarea în terapie intensivă au prelungit spitalizarea până la 8 zile ($p < 0.001$, pentru fiecare).

Incidența insuficienței respiratorii la pacienții cu gripă a fost de 9.9%. Pacienții vârstnici (risc de 8.9 ori mai mare, $p < 0.001$) și prezența bolilor cronice (risc de 7.0 ori mai mare în cazul prezenței a cel puțin unei boli cronice și de 11.5 ori mai mare în cazul existenței a cel puțin 3 boli cronice, $p < 0.001$ pentru fiecare) au fost cei mai buni predictorii de evoluție spre insuficiență respiratorie. Dintre bolile cronice, pacienții pozitivi pentru gripă și BPOC (OR=13.4, $p < 0.001$), boli cardiovasculare (OR=9.2, $p < 0.001$), obezitate (OR=6.4, $p < 0.001$), boli neoplazice

(OR=6.3, $p<0.001$) sau boală cronică renală (OR=7.9, $p<0.001$) au fost cei mai predispuși riscului de dezvoltare a insuficienței respiratorii (Figura 7.4).

Am identificat faptul că prezentarea tardivă la spital, la mai mult de 4 zile de la debutul simptomelor, crește de 2.4 ori riscul de insuficiență respiratorie ($p<0.001$), evidențiind necesitatea inițierii precoce a tratamentului antiviral pentru a reduce riscul de evoluție nefavorabilă.

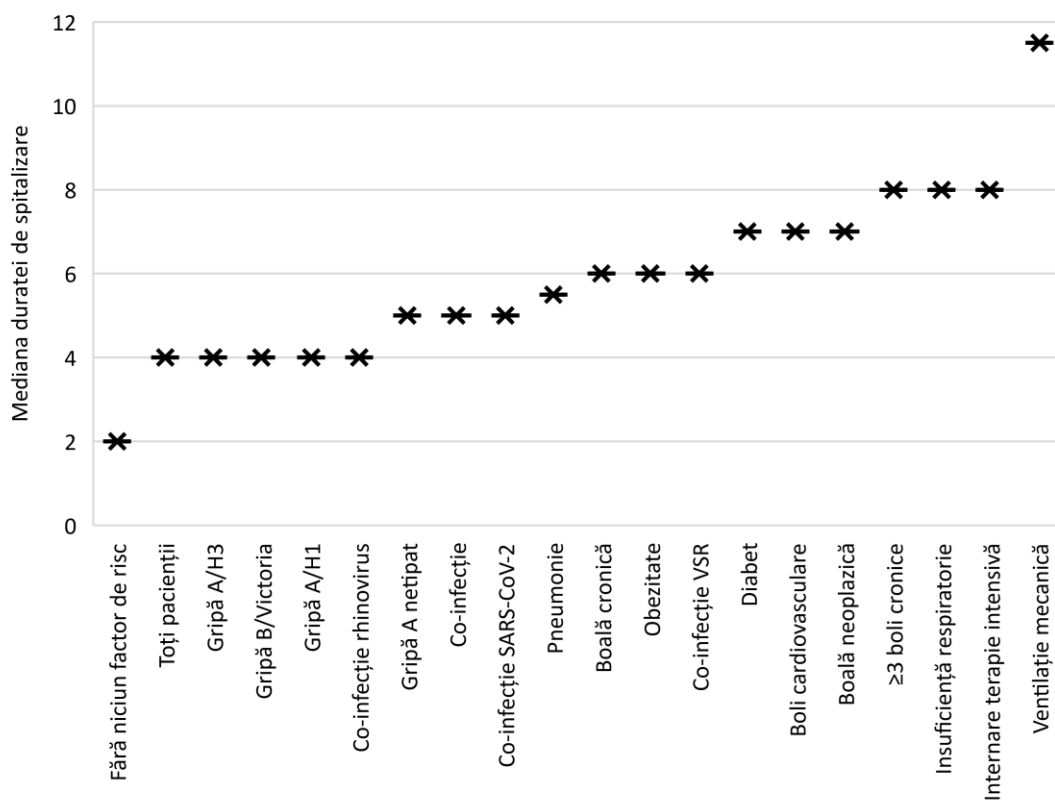


Figura 7.3. Mediana duratei de spitalizare în raport cu factorii de risc

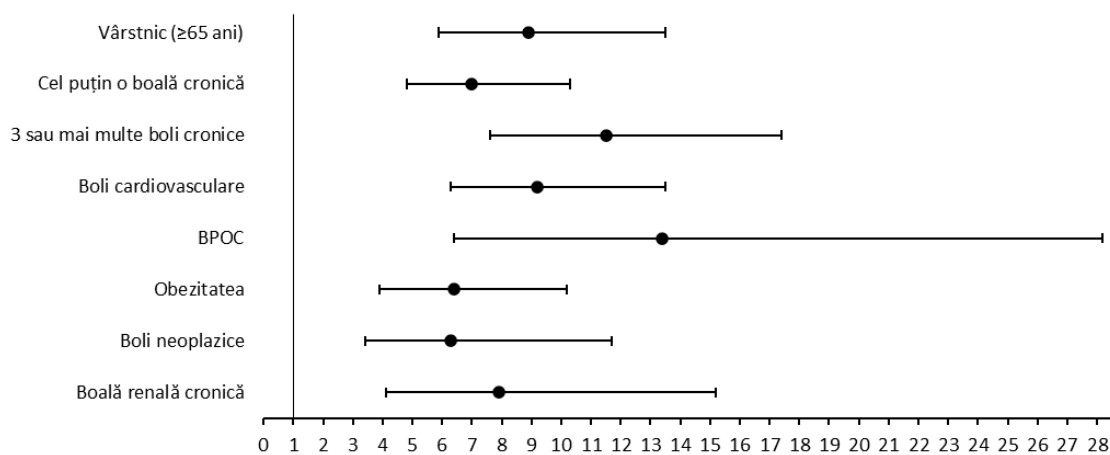


Figura 7.4. Riscul de insuficiență respiratorie asociat particularităților gazdei

Capitolul 8. Particularități genetice ale virusurilor gripale în raport cu particularitățile gazdei (sezoanele 2019-2023)

Acest capitol prezintă rezultatele celui de-al doilea studiu, fiind structurat în introducere, metode, rezultate, discuții și concluzii.

Metode

Am efectuat un studiu de secvențiere genetică a virusurilor gripale izolate la pacienții spitalizați în cadrul INBI. Această analiză se bazează pe probele pozitive pentru gripă identificate în cadrul studiului epidemiologic observațional de supraveghere prospectivă activă prezentat la capitolul 7. Perioada analizată cuprinde sezoanele 2019/20, 2021/22 și 2022/23. Toate particularitățile pacienților au fost preluate din chestionarele aplicate și monitorizarea efectuată, așa cum s-a prezentat în capitolul 7.

După selecția probelor, acestea au fost pregătite pentru secvențiere prin purificarea acizilor nucleici. S-a efectuat secvențiere de nouă generație folosind tehnologia Illumina (San Diego, California, SUA). Secvențele nucleotidice rezultate au fost prelucrate folosind BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) și Geneious Prime.

S-a efectuat analiza filogenetică în segmentul codificator al HA, folosind Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (MAFFT) [12] și programele FastTree implementat în Mega 6.4 [13] și FigTree v.1.4.4.

Analiza mutațiilor asociate cu rezistența la oseltamivir în gena NA s-a făcut utilizând FluServer implementat în platforma GISAID.

Eficacitatea vaccinală (E) a fost estimată pe baza modelului P_{epitope} .

Rezultate - Caracteristici moleculare ale virusurilor gripale A/H1 și particularitățile gazdei

În sezonul 2019/20 au fost secvențiate 18 izolate A/H1, toate aparținând clade-ului 6b1.A. O medie de 9 mutații de aminoacizi per secvență HA a fost găsită în tulpinile din studiu, inclusiv în situsurile antigenice Sa, Sb și Ca2. Eficacitatea vaccinală a fost redusă la $E=44\%$.

În sezonul 2021/22 doar 3 probe A/H1 au fost secvențiate, toate încadrate în clade-ul 6B.1A.5a.1. Două din cele 3 secvențe au fost identice, având și legătură epidemiologică între ele. În raport cu tulpina inclusă în vaccinul sezonier am identificat o serie de mutații, una dintre aceste mutații fiind localizată în situsul antigenic Sa (N130K) și alte două în situsul antigenic Sb (D187A și A189E); acestea din urmă au redus eficacitatea vaccinului sezonier la $E=33\%$.

În sezonul 2022/23 un total de 121 de probe A/H1 au fost secvențiate, aparținând cladeurilor 6B.1A.5a.2a și 6B.1A.5a.2a.1. Am identificat mutații în situsurile antigenice care ar putea afecta eficacitatea vaccinului sezonier. Toate secvențele au prezentat 2 mutații în situsul antigenic Sb (A186T și Q189E), care ar putea reduce eficacitatea vaccinului sezonier la E=33%. Patru dintre virusurile secvențiate au prezentat și 2 mutații în situsul antigenic Ca2 (P137S, K142R); acestea din urmă au avut potențialul de a reduce eficacitatea vaccinală la E=23%; toate aceste patru secvențe au aparținut clade-ului 6B.1A.5a.2a.1.

Rezultate - Caracteristici moleculare ale virusurilor gripale A/H3 și particularitățile gazdei

În sezonul 2019/20 au fost secvențiate 20 de probe A/H3, care s-au grupat în 2 clade-uri, 3C.3a și 3C.2a1b, cel din urmă clade fiind caracteristic tulpinilor din emisfera sudică. În secvențele din clade-ul 3C.2a1b (4/20) am identificat substituția T135K, asociată cu pierderea unui situs de N-glicozilare în situsul antigenic A, cu impact asupra răspunsului imun, făcând acest situs antigenic mai accesibil anticorpilor neutralizanți. Secvențele din clade-ul 3C.3a au prezentat puține mutații, în schimb secvențele din clade-ul 3C.2a1b au prezentat un număr crescut de mutații în comparație cu tulpina vaccinală, reducând eficacitatea vaccinală la E=12%.

În sezonul 2021/22 au fost secvențiate 61 de probe A/H3 cu o distribuție eterogenă în 6 clade-uri, arătând o evoluție importantă a virusurilor A/H3 în acest sezon: 3C.2a1b.2a.1, 3C.2a1b.2a.2, 3C.2a1b.2a.3, 3C.2a1b.2a.3a, 3C.2a1b.2a.3b, 3C.2a1b.2a.2c, 3C.2a1b.2a.2. Situsul antigenic B a fost cel dominant, toate virusurile secvențiate au prezentat 6 mutații comparativ cu secvența virusului inclus în vaccinul sezonier, care au condus la pierderea completă a eficacității vaccinale.

În sezonul 2022/23 au fost secvențiate 63 de probe A/H3 grupate în 3 clade-uri 3C.2a1b.2a.2b, 3C.2a1b.2a.2a.3a.1 și 3C.2a1b.2a.2a.1b, diferite față de sezonul anterior. Au fost identificate între 6 și 10 mutații non-sinonime per secvență, și mutații în toate situsurile antigenice (A-E) cu o reducere a eficacității vaccinale între E=18.5% și 43%. Am identificat cazuri cu mutații particulare, determinând o reducere până la E=8% a eficacității vaccinale în cazul izolatelor care au aparținut unor pacienților cu obezitate și boli cardiovasculare.

Rezultate - Caracteristici moleculare ale virusurilor gripale B și particularitățile gazdei

În sezonul 2019/20, toate cele 29 de probe de virus gripal B secvențiate au aparținut clade-ului V1A.3. Majoritatea mutațiilor identificate au provenit de la probe ale pacienților

aduți, cele mai numeroase fiind localizate în situs-ul antigenic al 120loop, determinând o scădere a eficacității vaccinale la E=77%.

În sezonul 2022/23 au fost secvențiate 37 de probe de virus gripal B, toate aparținând clade-ului V1A.3a.2, dar cu numeroase mutații în situsurile antigenice și non-antigenice, ceea ce a determinat o distribuție în numeroase sub-clade-uri. Mutațiile identificate în situs-ul antigenic 190helix au redus eficacitatea vaccinală la E=58.64%, iar cele identificate în situs-ul antigenic 120loop au redus cu un impact mai mic eficacitatea vaccinală la E=64%.

Rezultate - Analiza moleculară a genei neuraminidazei și incidența mutațiilor de rezistență la oseltamivir

Am identificat 4 cazuri cu mutații de rezistență la oseltamivir: 3 la virusurile gripale A/H1N1 (2.4% rată de rezistență, 2 mutații H275Y, 1 mutație I223V), și 1 caz la virusurile gripale A/H3N2 (0.8% rată de rezistență, mutație I222V). Toate au fost izolate la pacienți cu factori de risc.

Capitolul 9. Impactul pandemiei de COVID-19 asupra epidemiologiei virusurilor gripale

Acest capitol prezintă rezultatele celui de-al treilea studiu, fiind structurat în introducere, metode, rezultate, discuții și concluzii. Acest studiu a fost împărțit în două sub-studii.

Metode sub-studiu 1

Am efectuat o analiză a datelor obținute prin RT-PCR multiplex cu privire la epidemiologia virusurilor respiratorii, altele decât virusurile gripale, în rândul pacienților spitalizați cu simptomatologie ILI/SARI. Acest studiu se bazează pe date obținute prospectiv și respectă aceeași metodologie descrisă anterior la capitolul 7.

Metode sub-studiu 2

Am efectuat un studiu transversal bazat pe datele din practica clinică cu privire la re-emergența gripei în rândul copiilor evaluați în Compartimentul de Primiri Urgențe (CPU).

Perioada studiului a fost 1-28 martie 2022, iar populația de studiu a fost reprezentată de copiii (pacienți cu vârsta până la 18 ani) care s-au prezentat la CPU cu simptomatologie ILI. Au fost incluși în studiu consecutiv toți pacienții pediatrici cu cel puțin un simptom ILI, care au fost testați pentru gripă sau infecție cu SARS-CoV-2.

Rezultate - Impactul pandemiei de COVID-19 asupra circulației virusurilor respiratorii în rândul pacienților spitalizați

După gripă, circulația VSR a fost cel mai puternic influențată de pandemia de COVID-19; după debutul pandemiei nivelurile de circulație au fost semnificativ mai reduse comparativ cu perioada pre-pandemică (Figura 9.1). VSR și coronavirusurile umane au fost izolate la populația adultă și vârstnică spitalizată cu ILI/SARI în proporții semnificativ mai mari față de celelalte virusuri respiratorii ($p < 0.001$). Circulația rinovirusului a fost cel mai puțin influențată de pandemia de COVID-19. După SARS-CoV-2 (OR=14.6), VSR (OR=1.1) s-a asociat cu riscul de dezvoltare a insuficienței respiratorii acute la pacienții spitalizați cu ILI/SARI, în timp ce infecția cu adenovirus a asociat cel mai mic risc (OR=0.09).

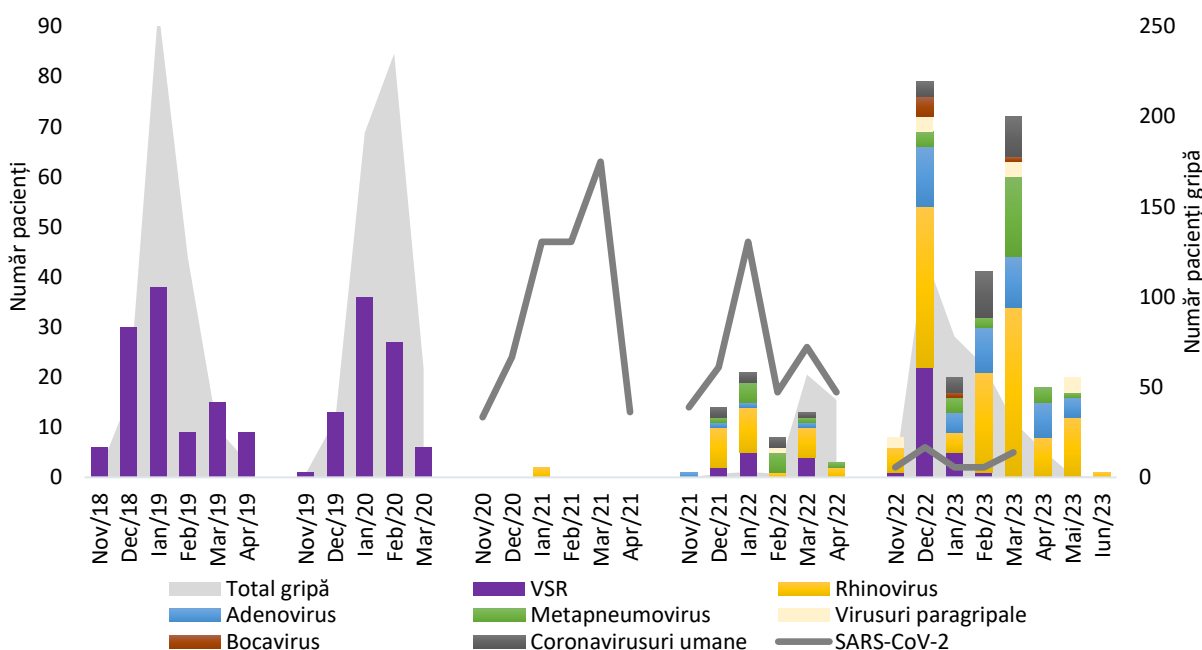


Figura 9.1. Distribuția cazurilor pe sezoane și luni în funcție de tipul virusului

Rezultate - Re-emergența gripei în sezonul 2021-2022 - analiza datelor din practica reală

Ridicarea măsurilor restrictive asociate pandemiei și apariția variantei Omicron a determinat re-emergența virusurilor gripale cu o rată de pozitivitate de 33.5% în rândul pacienților pediatrici evaluați în Compartimentul de Primiri Urgențe. Virusurile gripale re-emergente au circulat în paralel cu menținerea unei activități relativ reduse a SARS-CoV-2,

pentru care am identificat în aceeași perioadă o rată de pozitivitate de 7.5%. Doar 10 (2.4%) dintre copiii cu gripă evaluați în Compartimentul de Primiri Urgențe au necesitat spitalizare.

Capitolul 10. Înțelegerea intervențiilor de modulare a interacțiunii patogen-gază prin vaccinare

Acest capitol prezintă rezultatele celui de-al patrulea studiu, fiind structurat în introducere, metode, rezultate, discuții și concluzii.

Metode

Am realizat un studiu transversal de evaluare a cunoștințelor, percepțiilor și atitudinilor părinților cu privire la vaccinarea copiilor și la bolile prevenibile prin vaccinare.

Chestionarul a fost aplicat online în luna august 2021. Pentru analiza integrată a datelor, am aplicat o formulă de calcul pentru evaluarea unui scor de cunoștințe și a unui nivel de cunoștințe pe seama întrebărilor din chestionar. În analiza prezentă ne-am concentrat asupra datelor direct relevante patologiei de interes, și anume cunoștințele, percepțiile și atitudinile părinților cu privire la gripă și vaccinarea antigripală.

Rezultate

Am identificat o rată de vaccinare antigripală în rândul copiilor părinților respondenți de 17.7%. Am arătat că există o asociere pozitivă între rata de vaccinare antigripală și scorul și respectiv nivelul de cunoștințe cu privire la vaccinare și bolile prevenibile prin vaccinare ($p < 0.001$).

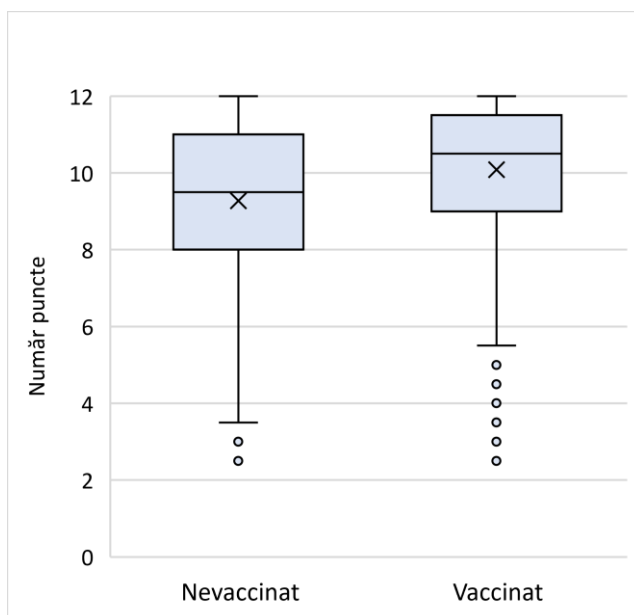


Figura 10.1. Scorul de cunoștințe în raport cu opțiunea de vaccinare antigripală

Am cuantificat motivele refuzului/ezitării la vaccinarea antigripală: 18.4% teama de efecte adverse, 8.5% costurile ridicate, 8.4% subaprecierea impactului infecției gripale, 3.6% recomandare de nevaccinare din partea medicului pediatru. Am identificat faptul că 38.8% dintre părinți ar dori includerea vaccinului antigripal în schema gratuită. Totodată, am arătat faptul că teama de o posibilă evoluție severă a gripei a crescut de 2.8 ori probabilitatea de vaccinare antigripală.

Concluzii finale

Virusurile gripale cunosc o diversitate genetică impresionantă, ca urmare a rezervoarelor naturale identificate la păsări și mamifere, având capacitatea de a trece bariera de specie și de a se adapta la om, putând duce la declanșarea unei pandemii. Monitorizarea circulației virusurilor gripale a devenit o regulă, sau mai bine zis o obișnuință, având rolul de preveni izbucnirile epidemice, dar și de a selecta cele mai potrivite tulpini pentru compoziția vaccinurilor antigripale, care să asigure o eficacitate ridicată a acestora. Deoarece evoluția virusurilor gripale este în strânsă legătură cu factori care țin de gazdă și de mediu, se pune accent pe o monitorizare care să acopere cât mai multe zone geografice și pe identificarea tendințelor locale de evoluție a virusurilor. Interacțiunea cu gazda umană este esențială în înțelegerea modificărilor genomice ale virusurilor gripale, deoarece sistemul imun pune o presiune de selecție asupra acestora, care la rândul lor găsesc mecanisme de evadare imună, prin reasortare genetică, apariție de mutații de rezistență la antivirale, sau mutații care duc la scăderea eficacității vaccinale.

Prin rezultatele obținute am caracterizat pe larg circulația virusurilor gripale în raport cu caracteristicile demografice ale pacienților și am identificat pattern-uri specifice subtipurilor/liniilor virale.

Am cuantificat pentru prima dată probabilitatea și sensibilitatea semnelor și simptomelor din definițiile ILI/SARI de a prezice diagnosticul pozitiv de gripă în rândul pacienților spitalizați.

Am identificat impactul pe care factorii de risc îl au asupra pacienților cu gripă în ceea ce privește durata de spitalizare și riscul de evoluție spre insuficiență respiratorie acută. Aceste rezultate sunt deosebit de importante pentru a cuantifica încă de la momentul internării riscurile pacienților cu gripă și pentru a lua cele mai bune decizii terapeutice cu scopul de a îmbunătăți prognosticul.

Pentru prima dată în România am efectuat o analiză moleculară a virusurilor gripale izolate, pe care am tradus-o prin identificarea mutațiilor, evaluarea eficacității vaccinale și asocierea cu particularitățile gazdei. Înțelegerea evoluției virusurilor gripale în raport cu caracteristicile populației în care acestea circulă este absolut necesară pentru intervenții țintite în prevenția și combaterea personalizată a viitoarelor epidemii sau pandemii de gripă.

În plus am efectuat o analiză de screening a mutațiilor în gena NA asociată cu rezistența la oseltamivir pentru a cartografia situația locală.

În capitolul 9 am evaluat într-un mod original (analiză duală pacienți spitalizați, pacienți evaluați în urgențe) impactul pandemiei de COVID-19 asupra circulației virusurilor gripale, dar și a altor virusuri respiratorii, ca urmare a extinderii capacității de testare a pacienților cu ILI/SARI prin RT-PCR multiplex din probe respiratorii. Am arătat că pandemia de COVID-19 a modificat, într-un mod încă incomplet elucidat, epidemiologia virusurilor respiratorii, dar re-emergența virusurilor gripale a avut loc cu rate de atac similare sau chiar mai mari față de sezoanele pre-pandemice.

În ultimul capitol, într-un studiu populațional original am încercat să înțelegem motivele ratelor reduse de vaccinare antigripală. Rezultatele obținute pot constitui baza unor politici de sănătate publică pentru a crește rata de vaccinare, singurul și cel mai eficient mecanism de modulare pozitivă a interacțiunii dintre virusurile gripale și gazda umană.

Partea generală și discuțiile realizate în lucrarea de doctorat se bazează pe 345 de surse bibliografice, articole indexate în reviste Web of Science, din care 301 publicate în ultimii 5 ani (2019-2023).

De asemenea, teza de doctorat este ilustrată cu 53 de figuri originale, iar rezultatele sunt susținute de 8 anexe care detaliază o parte a rezultatelor.

Din studiile de doctorat au fost publicate 4 articole originale, toate indexate Web of Science, cumulând un factor de impact de 16.457. Totodată, un număr de 16 abstracte au fost publicate în urma prezentării datelor din teza de doctorat la congrese și conferințe naționale și internaționale.

Referințe din rezumat

1. Te Velthuis AJ, Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(8):479-93.
2. Einfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):28-41.
3. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(1):47-60.
4. Ryt-Hansen P, Pedersen AG, Larsen I, Kristensen CS, Krog JS, Wacheck S, et al. Substantial Antigenic Drift in the Hemagglutinin Protein of Swine Influenza A Viruses. *Viruses.* 2020;12(2).
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Risk groups for severe influenza 2023 [Accesat: 10 august 2023]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/prevention-and-control/vaccines/risk-groups>.
6. World Health Organization. Vaccines against influenza: WHO position paper, May 2022. *Weekly epidemiological record.* 2022;19:185-208.
7. Centers for Disease Control and Prevention. People at Higher Risk of Flu Complications 2023 [Accesat: 10 august 2023]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/index.htm>
8. Clohisey S, Baillie JK. Host susceptibility to severe influenza A virus infection. *Crit Care.* 2019;23(1):303.
9. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):315-28.
10. Puig-Barbera J, Tormos A, Trushakova S, Sominina A, Pisareva M, Ciblak MA, et al. The Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN): a new platform to describe the epidemiology of severe influenza. *Influenza Other Respir Viruses.* 2015;9(6):277-86.
11. Carmona A, Munoz-Quiles C, Stuurman A, Descamps A, Mira-Iglesias A, Torcel-Pagnon L, et al. Challenges and Adaptation of a European Influenza Vaccine Effectiveness Study Platform in Response to the COVID-19 Emergence: Experience from the DRIVE Project. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(3).
12. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30(4):772-80.
13. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol.* 2009;26(7):1641-50.

Articole publicate din studiile efectuate în cadrul tezei de doctorat

1. **Miron VD**, Bănică L, Săndulescu O, Paraschiv S, Surleac M, Florea D, Vlaicu O, Milu P, Streinu-Cercel A, Bilașco A, Oțelea D, Pițigoi D, Streinu-Cercel A, Drăgănescu AC. *Clinical and molecular epidemiology of influenza viruses from Romanian patients hospitalized during the 2019/20 season*. PLoS One. 2021;16(11):e0258798. PMID: 34767579; WOS:000755249300014; ISSN: 1932-6203; **IF(2021): 3.240**; original article, prim-autor.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0258798>
→ Capitol 7, capitol 8, Anexa 2, paginile: 66-70, 75-95, 112-129, 198-199
2. Drăgănescu AC, **Miron VD***, Streinu-Cercel A, Florea D, Vlaicu O, Bilașco A, Oțelea D, Luminos ML, Pițigoi D, Streinu-Cercel A, Săndulescu O. *Circulation of influenza A viruses among patients hospitalized for severe acute respiratory infection in a tertiary care hospital in Romania in the 2018/19 season: Results from an observational descriptive epidemiological study*. Medicine (Baltimore). 2021;100(52):e28460. PMID: 34967388; WOS:000736149900039; ISSN: 1536-5964; **IF(2021): 1.817**; original article, *autor corespondent.
<http://doi.org/10.1097/MD.00000000000028460>
→ Capitol 7, Anexa 2, paginile: 65-66, 75-95, 198-199
3. **Miron VD**, Bar G, Filimon C, Craiu M. *From COVID-19 to Influenza-Real-Life Clinical Practice in a Pediatric Hospital*. Diagnostics (Basel). 2022;12(5):1208. PMID: 35626363; WOS:000803645600001; ISSN: 2075-4418; **IF(2022): 3.6**; original article, prim-autor.
<http://doi.org/10.3390/diagnostics12051208>
→ Capitol 9, paginile: 139-140, 145-147
4. **Miron VD**, Toma AR, Filimon C, Bar G, Craiu M. *Optional Vaccines in Children-Knowledge, Attitudes, and Practices in Romanian Parents*. Vaccines (Basel). 2022;10(3):404. PMID: 35335036; WOS:000774394700001; doi: 10.3390/vaccines10030404; ISSN: 2076-393X; **IF(2022): 7.8**; original article, prim-autor.
<http://doi.org/10.3390/vaccines10030404>
→ Capitol 10, paginile: 152-157