

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ**

Cu titlu de manuscris  
C.Z.U: 578.82/.83 (043.2)

**EDER VERONICA**

**STUDIAREA ȘI EVALUAREA VIRUSURILOR GRIPALE ÎN  
PERIOADELE PANDEMICĂ ȘI INTEREPIDEMICĂ**

**163.04 – MICROBIOLOGIE**

**Teza de doctor în științe biologice**

**Conducător științific:**



**Spînu Constantin**

**dr. hab. în medicină, profesor universitar,  
Om Emerit, Laureat al Premiului Național,  
Centrul Național de Sănătate Publică**

**Autor:**



**Eder Veronica**

**CHIȘINĂU, 2015**

**© Eder Veronica, 2015**

## CUPRINS

<b>ADNOTARE (în română, rusă și engleză).....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA ABREVIERILOR.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>9</b>
<b>1. EVOLUȚIA CAPACITĂȚILOR DE DIAGNOSTIC PRIVIND STUDIAREA ȘI EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR ETIOLOGICE ALE INFECȚIILOR GRIPALE .....</b>	<b>18</b>
1.1 Aspecte etiologice ale infecțiilor gripale și caracteristicile morfostructurale ale virusurilor gripale .....	18
1.2 Caracteristica fenotipică și genotipică a virusurilor gripale.....	25
1.3 Diagnosticul de laborator: tehnici clasice și de biologie moleculară de ultimă generație.....	35
1.4 Concluzii la capitolul 1.....	42
<b>2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....</b>	<b>44</b>
2.1 Liniaritatea cercetărilor și obiectul de studiu .....	44
2.2 Metodele de cercetare aplicate și volumul investigațiilor.....	44
2.3 Concluzii la capitolul 2.....	54
<b>3. STUDIAREA ȘI EVALUAREA TULPINILOR DE VIRUSURI GRIPALE IZOLATE ȘI IDENTIFICATE ÎN PERIOADA PANDEMICĂ .....</b>	<b>55</b>
3.1 Particularitățile virusurilor gripale în perioada pre-pandemică.....	55
3.2 Rezultatele determinării caracteristicilor tulpinilor de virusuri gripale în perioada pandemică.....	62
3.3 Studiarea particularităților tulpinilor de virusuri gripale în perioada post-pandemică.....	70
3.4 Concluzii la capitolul 3.....	80
<b>4. EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR VIRUSURILOR GRIPALE ÎN PERIOADA INTEREPIDEMICĂ ÎNTRU OPTIMIZAREA SUPRAVEGHERII EPIDEMIOLOGICE ȘI VIRUSOLOGICE A GRIPEI .....</b>	<b>83</b>
4.1 Rezultatele evaluării particularităților virusurilor gripale în sezonul 2011- 2012.....	83
4.2 Rezultatele evaluării particularităților virusurilor gripale în sezonul 2012- 2013.....	88
4.3 Studiarea și evaluarea particularităților virusurilor gripale în sezonul 2013-2014....	101

4.4 Valorificarea rezultatelor obținute întru optimizarea supravegherii epidemiologice și virusologice a gripei.....	109
4.5 Concluzii la capitolul 4.....	114
<b>CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....</b>	<b>116</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXE.....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXA 1</b> Acte de implementare .....	<b>141</b>
<b>ANEXA 2</b> Accreditarea laboratorului CNSP de către OMS .....	<b>145</b>
<b>ANEXA 3</b> Chestionarul privind acreditarea de către OMS .....	<b>146</b>
<b>ANEXA 4</b> Certificate de realizare a Programelor de Control Extern de Calitate .....	<b>147</b>
<b>ANEXA 5</b> Brevet de invenție .....	<b>154</b>
<b>ANEXA 6</b> Diploma „Cupa Marele Premiu” .....	<b>156</b>
<b>ANEXA 7</b> Diploma „Medalia de aur” .....	<b>157</b>
<b>ANEXA 8</b> Diploma de decernare .....	<b>158</b>
<b>ANEXA 9</b> Diploma de Excelență și „Medalia de aur” .....	<b>159</b>
<b>ANEXA 10</b> Diploma „Gala Premiilor în Sănătate” .....	<b>160</b>
<b>DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII .....</b>	<b>161</b>
<b>CV-ul AUTORULUI .....</b>	<b>162</b>

## ADNOTARE

**Eder Veronica:** „Studierea și evaluarea virusurilor gripale în perioadele pandemică și interepidemică”, teza de doctor în științe biologice, Chișinău, 2015. Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii și recomandări, bibliografie (191 surse), 118 pagini de text de bază, 22 tabele, 47 figuri și 10 anexe. Rezultatele sunt publicate în 28 lucrări științifice. **Cuvinte cheie:** virusuri gripale, HA, NA, grup genetic, sensibilitate la antivirale. **Domeniu de studiu:** 163.04 - Microbiologie. **Scopul lucrării:** Studierea și evaluarea particularităților antigenice, fenotipice și genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în perioadele pandemică și interepidemică în Republica Moldova întru argumentarea măsurilor de sănătate cu optimizarea sistemului național de supraveghere epidemiologică și virusologică a gripei. **Obiectivele studiului:** Determinarea și evaluarea tipurilor și subtipurilor de virusuri gripale evidențiate în perioada de studiu; studiarea și evaluarea particularităților antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale în perioadele pandemică și interepidemică; studiarea și evaluarea particularităților genetice ale tulpinilor de virusuri gripale A și B în baza genelor HA și NA în perioadele precăutate în studiu; analiza caracteristicilor fenotipice cu evaluarea sensibilității tulpinilor de virusuri gripale la remediile antivirale de ultimă generație (oseltamivir, zanamivir) în perioadele evidențiate; valorificarea rezultatelor obținute și optimizarea supravegherii epidemiologice și virusologice a gripei. **Noutatea și originalitatea științifică:** În premieră au fost obținute rezultate originale privind particularitățile antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale circulante în perioadele pandemică și interepidemică. **Problema științifică:** Evidențierea și evaluarea particularităților antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale circulante în Republica Moldova, care au servit ca argumente și suport metodic întru perfecționarea continuă a sistemului de supraveghere epidemiologică, clinică și virusologică la gripă, IACRS și SARI implementat, racordat la exigențele OMS, ECDC și CDC. **Semnificația teoretică.** Acest studiu a evidențiat particularitățile virusurilor gripale circulante în Republica Moldova, ceea ce a permis de a identifica și evalua locul tulpinilor izolate în arborele filogenetic global, circumstanțe extrem de importante pentru argumentarea formulei vaccinului gripal. **Valoarea aplicativă a lucrării.** Rezultatele au permis de a evidenția particularitățile virusologice evolutive ale procesului epidemic prin gripă în perioadele nominalizate elemente semnificative utilizate în perfecționarea sistemului național de supraveghere la gripă, IACRS și SARI ajustat la exigențele OMS, ECDC, CDC. **Implementarea rezultatelor științifice:** Rezultatele obținute au servit la valorificarea de noi metode standardizate de diagnostic al gripei, optimizarea monitorizării infecțiilor gripale, IACRS și SARI pentru realizarea în timp real a măsurilor adecvate de control și răspuns în contextul integrării în rețelele de supraveghere regionale (EuroFlu/TESSy) și globale (FluNet) ale OMS.

## РЕЗЮМЕ

**Едер Вероника:** „Изучение и оценка вирусов гриппа в пандемический и межэпидемический периоды”. Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук, Кишинев, 2015. Диссертация содержит: введение, 4 главы, выводы и рекомендации, библиография (191 источник), 118 страниц основного текста, 22 таблицы, 47 рисунков и 10 приложений. Результаты исследований изложены в 28 научных работах.

**Ключевые слова:** вирусы гриппа, ГА, НА, генетическая группа, чувствительность к противовирусным препаратам. **Область исследования:** 163.04 - Микробиология. **Цель исследования:** Изучение и оценка антигенных, фенотипических и генотипических характеристик штаммов вирусов гриппа в пандемический и межэпидемический периоды в Молдове. **Задачи исследования:** Определение типов и подтипов вирусов гриппа в указанных периодах; исследование и оценка антигенных свойств вирусов гриппа в пандемическом и межэпидемическом периодах; исследование и оценка генетических особенностей вирусов гриппа А и В на основе ген ГА и НА в данных периодах; анализ фенотипических характеристик с оценкой чувствительности вирусов гриппа к противовирусным средствам последнего поколения в указанных периодах; использование полученных результатов и оптимизация системы эпидемиологического и вирусологического надзора за гриппом. **Научная новизна:** Впервые были получены оригинальные результаты по антигенным, генотипическим и фенотипическим особенностям вирусов гриппа циркулирующих в пандемическом и межэпидемическом периодах. **Научная задача:** Определение и оценка особенностей вирусов гриппа циркулирующих в Республике Молдова послужили научными обоснованиями для непрерывного совершенствования внедрённой системы эпидемиологического, клинического и вирусологического надзора за гриппом, ОРВИ и ТОРИ, в связи с требованиями ВОЗ, ECDC и CDC. **Прикладная и теоретическая значимость:** Работа вносит свой вклад в исследовании свойств вирусов гриппа циркулирующих в Молдове, что позволило идентифицировать и оценить положение выделенных штаммов в филогенетическом древе на глобальном уровне – чрезвычайно важные обстоятельства для определения формулы гриппозной вакцины. **Внедрение результатов исследования:** Результаты исследований использованы для оптимизации национальной системы надзора за гриппом, ОРВИ и ТОРИ путём внедрения новых стандартизованных методов диагностики гриппа и оптимизации мониторинга за гриппозными инфекциями, ОРВИ и ТОРИ в контексте интеграции в региональную (EuroFlu/TESSy) и глобальную (FluNet) сети ВОЗ.

## SUMMARY

**Eder Veronica:** “The study and evaluation of influenza viruses in the pandemic and interepidemic periods”, PhD thesis in biological sciences, Chisinau, Republic of Moldova, 2015. Thesis structure: introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, bibliography (191 sources), 118 pages of basic text, 22 tables, 47 figures, and 10 annexes. The results have been published in 28 scientific papers. **Keywords:** influenza viruses, HA, NA, genetic group, antiviral susceptibility. **Field of research:** 163.04 - Microbiology. **The purpose of study:** Study and evaluation of antigenic, phenotypic and genotypic characteristics of influenza strains isolated and identified in pandemic and inter-epidemic periods in Moldova. **Research objectives:** The determination and evaluation of the types/subtypes of influenza viruses in the period of the study; study and evaluation of antigenic specificities of influenza viruses strains in pandemic and interepidemică periods; study and evaluation of genetic peculiarities of A and B influenza viruses strains based on HA and NA genes in the mentioned periods; sensitivity analysis evaluating phenotypic characteristics of influenza viruses strains to antiviral remedies of latest generation (oseltamivir, zanamivir) in the highlighted periods; results achieved and optimize epidemiological and virological influenza surveillance system. **The scientific novelty and originality:** For the first time were obtained the original results on antigenic, genotypic and phenotypic characteristics of circulating influenza viruses during pandemic and inter-epidemic periods. **Scientific problem:** Highlighting and evaluation of features of influenza viruses circulating in Republic of Moldova served as arguments and methodical support to continuous improvement of implemented influenza, ARI and SARI epidemiological, clinical and virological surveillance system, connected to the requirements of WHO, ECDC and CDC. **The scientific and practical value:** The results allowed to highlight the virological peculiarities of influenza epidemic evolution in mentioned periods significant items used in improving the national influenza, ARI and SARI surveillance adjusted to the WHO, ECDC, CDC requirements. Obtained results allowed to identify and evaluate the place of isolated strains in the phylogenetic tree globally – extremely important circumstances to argue influenza vaccine formulation. **The implementation of scientific results:** The results of this research are used for clinical, epidemiological and virological influenza, ARI and SARI surveillance system improving through the implementation of new standardized methods of influenza diagnostics by approving a series of documents in order to strengthen epidemiological surveillance, systematic monitoring of influenza, ARI and SARI for achieving in real time the appropriate preventive and control measures in the context of integration in regional (EuroFlu/TESSy) and global (FluNet) surveillance networks of the WHO.

## LISTA ABREVIERILOR

<b>ADN</b> – acid dezoxiribonucleic	<b>IRVA</b> – infecții respiratorii virale acute
<b>Ag</b> – antigen	<b>M, M1, M2</b> – proteine matrice
<b>ARI</b> – Acute Respiratory Infections	<b>NA</b> – neuraminidază
<b>ARN</b> – acid ribonucleic	<b>NAI</b> – inhibitor al neuraminidazei
<b>CDC</b> – Centers for Disease Control and Prevention	<b>NEP</b> – nuclear export protein
<b>CNSP</b> – Centrul Național de Sănătate Publică	<b>NP</b> – nucleoproteină
<b>CSP</b> – Centru de Sănătate Publică	<b>NS1, NS2</b> – proteine nestructurale
<b>ECDC</b> – European Centre for Disease Prevention and Control	<b>OMS</b> – Organizația Mondială a Sănătății
<b>FITC</b> – izotiocianat de fluoresceină	<b>ORF</b> – open reading frame
<b>GIHSN</b> – Global Influenza Hospital Surveillance Network	<b>PA</b> – proteaza acidă
<b>GISN</b> – Global Influenza Surveillance Network	<b>PB1, PB2</b> – proteaze bazice
<b>GISRS</b> – Global Influenza Surveillance and Response System	<b>PBS</b> – soluție-tampon fosfat salin
<b>HA</b> – hemaglutinină	<b>PCR</b> – reacție de polimerizare în lanț (Polymerase Chain Reaction)
<b>HAU</b> – unități de hemaglutinare	<b>RHA</b> – reacție de hemaglutinare
<b>IACRS</b> – infecții acute ale căilor respiratorii superioare	<b>RHAI</b> – reacție de inhibare a hemaglutinării
<b>IMSP</b> – Instituție Medico - Sanitară Publică	<b>rRT-PCR</b> – Real Time Revers Transcription Polimerase Chain Reaction
	<b>SARI</b> – severe acute respiratory infections
	<b>SUA</b> – Statele Unite ale Americii
	<b>WHO</b> – World Health Organization



## INTRODUCERE

Gripa și IACRS sunt maladii infecțioase cu impact global, ce evoluează în epidemii sau/și pandemii soldate cu mortalitate crescută.

Virusurile gripale reprezintă o problemă permanentă de sănătate publică pentru toate țările, iar eforturile de a preveni îmbolnăvirile și răspândirea acestora sunt constante, dar și considerabile.

Larg răspândite în întreaga lume, virusurile gripale infectează nu numai omul, ci și numeroase specii de animale domestice (cai, porci) și sălbatice (nurcă, focă, balenă etc.) sau păsări (rațe, pescăruși, curcani, găini etc.) [1-4].

Variația antigenică și circulația virusurilor gripale între specii sunt cauza izbucnirilor epidemice care au loc anual, îmbolnăvirile fiind favorizate de răspunsul imun neadecvat, chiar în acele segmente de populație care au fost anterior expuse infecției gripale [1-4].

Epidemiile de gripă se înregistrează în fiecare an datorită variației antigenice minore (antigenic drift). Acestea sunt mutații nesemnificative în genele care codifică HA și NA. Ele constau în apariția lentă de mutații punctiforme în HA și NA în rezultatul circulației continue a virusurilor gripale în populațiile parțial imunizate. Structurile antigenice existente suferă modificări de conformație spațială și/sau modificări în compoziția unor aminoacizi. Protecția imună față de contactele anterioare cu virusul gripal se menține, dar este insuficientă. Astfel, față de subtipurile existente ale virusurilor gripale, la om se reinstalează o susceptibilitate la reinfectări multiple. De regulă, astfel de succesiuni se produc în fiecare an [4-7].

De obicei, epidemiile de gripă apar în perioada rece a anului: în Emisfera de Nord în lunile noiembrie – martie, în Emisfera de Sud – lunile mai – august. În regiunile tropice gripa nu se manifestă sezonier, ci se înregistrează pe tot parcursul anului, fiind dependentă, totuși, de schimbările climei [3-5].

În Republica Moldova cea mai înaltă morbiditate prin gripă se înregistrează, de obicei, în luna februarie, însă au fost cazuri când cel mai înalt nivel de morbiditate prin gripă s-a înregistrat în lunile decembrie, ianuarie și martie [2, 3, 6, 8].

Durata epidemiei este de regulă 1-2 luni (4-8 săptămâni), după care virusurile dispar. Una din enigmele principale ale virusului gripal este faptul că în cea mai mare parte a anului ele lipsesc în circulația populației umane și nu se cunoaște unde circulă în perioada interepidemică, cum și unde se produc modificările antigenice (*drift* antigen). Se presupune că virusurile ar circula și s-ar modifica în regiunile ecuatoriale, pe motiv că îmbolnăvirile prin gripă aici se înregistrează pe toată perioada anului [1, 3-5].

Totodată, pe lângă variația antigenică minoră, există și variație antigenică majoră (antigenic shift), ce se întâlnește doar la virusul gripal de tip A. Mutațiile de tip *shift* reprezintă o formă mult mai brutală de schimbări în virusul gripal A, ceea ce duce la apariția unui nou virus gripal cu o nouă combinație a proteinelor HA și NA, care anterior nu a existat mult timp sau niciodată în populația umană. Dacă acest virus apare în populația umană, unde majoritatea este lipsită de protecție sau există o protecție nesemnificativă față de această variantă, virusul obținând abilitatea de a se transmite de la om la om, atunci aceste circumstanțe pot conduce la apariția de pandemii de proporții. Important este faptul, că modificările în structura antigenică nu pot fi previzibile. Virusurile cu deosebiri genotipice și fenotipice semnificative față de cele anterioare apar la intervale neregulate de timp (10-40 de ani). Aceste modificări sunt responsabile de apariția marilor pandemii de gripă [1, 3-5].

Pe parcursul a ultimii 300 de ani s-au înregistrat 10 pandemii de gripă, din care 4 au avut loc în secolul XX [3-5, 9, 10]. **Pandemia „spaniolă” din 1918** – a fost una din cea mai severă dintre pandemiile cunoscute și descrise vreodată. Gripa „spaniolă” a afectat peste 20,0% din populația globului având o evoluție foarte rapidă. Timp de 10 luni gripa s-a răspândit în întreaga lume. În această perioadă au fost afectate peste 400 milioane de persoane. Valuri repetate de îmbolnăviri prin gripă s-au înregistrat și în anii 1918-1919 și 1919-1920 cu o intensitate mai mică. Atunci s-au îmbolnăvit cei care nu au suferit în primul val. Pandemia „spaniolă” a fost cauzată de un nou virus gripal A(H1N1), genomul căruia conținea porțiuni de gene ale virusurilor gripale aviare și porcine. Cei mai afectați au fost tinerii, bătrânii și persoanele imunocompromise. Într-un singur an gripa „spaniolă” a făcut mai multe victime decât ciuma bubonică în patru ani (1347-1351) și decât Primul Război Mondial, numărând de la 50 la 100 milioane de decese. Cea mai înaltă mortalitate s-a înregistrat la persoanele cu vârsta cuprinsă între 20 și 40 ani, rata mortalității fiind de 259 ori mai mare decât în cazul unei gripe obișnuite. Referitor la locul și debutul pandemiei sunt două ipoteze: prima – pandemia a debutat în februarie-martie 1918 în SUA cu transmiterea ulterioară de către trupele americane în Europa, a doua ipoteză – pandemia a debutat în ianuarie 1918 în China cu răspândirea ulterioară la Apus [3-5, 9, 10]. **Gripa „asiatică”** – a avut loc în 1957-1958 și a fost cauzată de virusul gripal A(H2N2), pandemia fiind de intensitate mai mică decât cea din 1918. Pandemia a început în februarie 1957 în Orientul Îndepărtat și s-a răspândit rapid în întreaga lume înregistrând 2 miliarde de bolnavi și 1 milion de decese [3-5, 9, 10]. **Gripa „Hong Kong”** – în 1968-1969 a apărut gripa de tip „Hong Kong” cauzată de virusul gripal A(H3N2). Pandemia având severitate medie, a afectat, în special, persoanele cu vârsta de 65 de ani, înregistrându-se peste 1 milion de decese [3-5, 9, 10]. **Gripa „Rusească”** – în 1977-1978 a avut loc o pandemie relativ ușoară

cauzată de virusul gripal A(H1N1) – agent etiologic implicat în epidemia din 1950, astfel au avut de suferit în primul rând persoanele născute după acest an [3, 4, 10].

Apariția virusului gripal A(H5N1) în 1997 în Hong Kong, care a cauzat o epizootie masivă printre păsările domestice afectând concomitent 18 persoane cu moartea a 6 dintre ele, a servit ca un semnal de apariție a unei noi pandemii de gripă. Distrugerea la acel moment a cca 1,5 milioane de păsări a stopat răspândirea virusului A(H5N1) printre păsările domestice și populația umană. Virusul gripal aviar A(H5N1) a reapărut printre păsările domestice în anul 2003 într-un șir de țări asiatice: Cambodia, China, Indonezia, Japonia, Laos, Thailanda, Vietnam, Coreea. În 2004 din nou s-au înregistrat îmbolnăviri printre oameni. Distrugerea a peste 160 milioane de păsări a contribuit la reducerea răspândirii infecției cu virusul gripal A(H5N1). În pofida faptului că acest virus a trecut bariera de specie cu afectarea nu numai a păsărilor, dar și a unor specii de mamifere (tigri, câini, pisici), totuși transmiterea lui de la om la om a fost limitată. Persoanele care s-au îmbolnăvit de gripă cauzată de virusul A(H5N1) au avut contact direct și nemijlocit cu păsările bolnave [3-5, 9, 10].

Cu apariția virusului gripal aviar A(H5N1) în 2003 a persistat pericolul declanșării unei noi pandemii de gripă. Dacă la începutul anului 2004 se credea, că noua pandemie va fi cauzată de virusul gripal A(H5N1), atunci evenimentele din 2009 au demonstrat, că îngrijorările specialiștilor în domeniu nu au fost în zădar [3-5, 9, 10].

Noua pandemie de gripă, prima din secolul XXI, a debutat în aprilie 2009 în SUA (California de Sud și Texas), fiind cauzată de virusul gripal de tip nou A(H1N1) numit "triplu reasortant", deoarece genomul său conține gene ale virusurilor gripale porcine, umane și aviare. Virusul de tip nou a apărut brusc, fiind detectat concomitent în alte 2 țări: Mexic și Canada. Procesul epidemic prin infecția cu virusul gripal de tip nou A(H1N1) a evoluat foarte repede, afectând într-un timp scurt un număr mare de oameni de pe toate continentele. Aceste evenimente au impus OMS să ridice la 11 iunie 2009 nivelul de alertă pandemică de la faza 5 la faza 6, ceea ce a însemnat începutul primei pandemii de gripă din secolul XXI. Totodată OMS a subliniat, că severitatea pandemiei date a fost moderată. Majoritatea persoanelor infectate s-au recuperat și s-au însănătoșit fără a necesita spitalizare sau tratament medical specific, iar numărul cazurilor cu complicații și decese a fost similar epidemiilor gripale sezoniere [3-6, 8-12].

În Republica Moldova, gripa și IACRS se înregistrează în fiecare an, numărul cazurilor de îmbolnăviri variind de la an la an și reprezintă 2/3 din numărul total de maladii infecțioase înregistrate pe parcursul anului. Apariția în anul 2009 a unui nou subtip de virus gripal A(H1N1) a cauzat pandemia de gripă la nivel global, resimțită și în Republica Moldova. Acest fapt a impus fortificarea sistemului de supraveghere epidemiologică a gripei prin crearea strategiilor de

prevenire și control permanent, inclusiv prin sisteme speciale de monitorizare a gripei, IACRS și SARI [3, 6, 8].

Monitorizarea circulației virusurilor gripale umane face parte din sistemul complex de supraveghere a gripei. Anual, OMS monitorizează circulația și profilul antigenic al virusurilor gripale în vederea descifrării în timp real a variantelor cu potențial epidemic și pandemic, precum și a sensibilității lor la produsele medicamentoase cu acțiune antivirală, în special, a celor de ultimă generație (oseltamivir, zanamivir) și profilul imunității antigripale a populației cu scopul preparării vaccinului antigripal potrivit sezonului curent.

Luând în considerație potențialul epidemic (pandemic) ale anumitor tipuri/subtipuri de virusuri gripale, inclusiv impactul socio-economic al acestora asupra sănătății publice se impune necesitatea studierii și evaluării virusologice a tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate, inclusiv și în Republica Moldova.

**Scopul lucrării:** Studierea și evaluarea caracteristicilor antigenice, fenotipice și genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în perioadele pandemică și interepidemică în Republica Moldova întru argumentarea măsurilor de sănătate cu optimizarea sistemului național de supraveghere epidemiologică și virusologică a gripei.

**Obiectivele lucrării:**

1. Determinarea și evaluarea tipurilor și subtipurilor de virusuri gripale evidențiate în perioadele de studiu.
2. Studierea și evaluarea particularităților antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale în perioadele pandemică și interepidemică.
3. Studierea și evaluarea particularităților genetice ale tulpinilor de virusuri gripale A și B în baza genelor HA și NA în perioadele precăutate în studiu.
4. Analiza caracteristicilor fenotipice cu evaluarea sensibilității tulpinilor de virusuri gripale la remediile antivirale de ultimă generație (oseltamivir, zanamivir) în perioadele evidențiate.
5. Valorificarea rezultatelor obținute întru optimizarea supravegherii epidemiologice și virusologice a gripei.

**Noutatea și originalitatea științifică:** În premieră pentru Republica Moldova, au fost obținute rezultate originale privind particularitățile antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale circulante în perioadele pandemică și interepidemică. Utilizarea, de rând cu metodele clasice, a tehnicilor de performanță de biologie moleculară (rRT-PCR, genotipare, secvențiere) în studierea tulpinilor de virusuri gripale a permis aprecierea și evaluarea poziției acestor virusuri în arborii filogenetici globali pentru fiecare genă în parte – circumstanțe extrem de importante pentru formularea coctailului vaccinal. Analiza și evaluarea susceptibilității

tulpinilor de virusuri gripale circulante a demonstrat sensibilitatea lor la remediile antivirale de ultimă generație, abordare extrem de importantă pentru perfecționarea măsurilor de control și răspuns.

**Problema științifică soluționată importantă** constă în evidențierea și evaluarea particularităților antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale circulante în Republica Moldova, care au servit ca argumente și suport metodic întru perfecționarea continuă a sistemului de supraveghere epidemiologică, clinică și virusologică la gripă, IACRS și SARI implementat, racordat la exigențele OMS, ECDC și CDC.

**Semnificația teoretică:** Acest studiu a evidențiat particularitățile antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale circulante în Republica Moldova, ceea ce a permis de a identifica și evalua locul tulpinilor identificate în arborele filogenetic global, circumstanțe extrem de importante pentru argumentarea formulei vaccinului gripal.

**Valoarea aplicativă a lucrării:** Rezultatele obținute pe parcursul realizării acestui studiu au permis de a evidenția particularitățile virusologice de evoluție a procesului epidemic prin gripă în perioadele pandemică și interepidemică – elemente semnificative utilizate ulterior în perfecționarea sistemului național de supraveghere la gripă, IACRS și SARI ajustat la exigențele OMS, CDC și ECDC. Grație perfecționării, în corespundere cu strategiile organismelor internaționale nominalizate, sistemul de supraveghere autohton a fost integrat în rețelele de supraveghere european EuroFlu/TESSy și global FluNet.

Sistemul de supraveghere nominalizat permite de a evalua în timp real particularitățile tulpinilor de virusuri gripale circulante, potențialul lor epidemic/pandemic, sensibilitatea la antivirale, pronosticul situației epidemiologice și volumul de investigații cu măsuri specifice și nespecifice de profilaxie în situații de urgență.

**Implementarea rezultatelor științifice:** Rezultatele obținute la realizarea cercetărilor științifice în cadrul acestui studiu au servit la perfecționarea sistemului de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI prin implementarea de noi metode standardizate de diagnostic al gripei, recunoașterea de către organismele internaționale nominalizate a subdiviziunii de profil a CNSP ca Centru Național de Gripă și prin aprobarea unui șir de acte normative, în special, a Planului-cadru intersectorial gradual pentru combaterea efectelor pandemiei cu virusul gripal nou A(H1N1) în Republica Moldova, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 824 din 15.12.2009 și a Ordinului Ministerului Sănătății nr. 824 din 31.10.2011 „Cu privire la perfectarea sistemului de supraveghere la gripă și infecțiile acute ale căilor respiratorii în Republica Moldova” – în scopul fortificării supravegherii epidemiologice, monitorizării sistematice a circulației infecțiilor gripale, IACRS și SARI pentru realizarea în

timp real a măsurilor adecvate de prevenire și control și în contextul integrării în rețelele de supraveghere regionale (EuroFlu/TESSy) și globale (FluNet) ale Organizației Mondiale a Sănătății.

**Aprobarea rezultatelor științifice:** Direcțiile studiate și rezultatele obținute la realizarea acestui studiu au fost prezentate și discutate în cadrul forurilor științifice naționale și internaționale: Conferința Științifico-Practică cu Participare Internațională „CMP Chișinău trecut, prezent și viitor”, Chișinău, 23 octombrie 2009; A doua Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, Sinaia, România, 14-16 octombrie 2010; Congresul Național de Microbiologie și Conferința Națională de Epidemiologie, Iași, România, 10-12 noiembrie 2011; International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, Georgia, USA, March 11-14, 2012; Conferința a VII-a a medicilor-infecționiști din Republica Moldova, Chișinău, 2012; 3rd International Influenza Meeting, Muenster, Germany, September 2<sup>nd</sup> – 4<sup>th</sup>, 2012; Науково-практична конференція «СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПРОБЛЕМИ ІНФЕКЦІЙНОЇ ЗАХВОРЮВАНОСТІ В УКРАЇНІ», Київ, Україна, 10 жовтня 2012; European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), Edinburgh, UK, 24-26 October 2012; The second isirv-Antiviral Group Conference in conjunction with NIHE. Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, Hanoi, Viet Nam, 29th – 31st October 2012; 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel, Germany, 6-9 March 2013; Options for the Control of Influenza, Cape Town, South Africa, 5-10 September 2013; The XIX-th Session of the Balkan Medical Days and the Second Congress of Emergency Medicine of the Republic of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova, 22-24 September 2013; Научно-Практическая Конференция с Международным Участием, Посвященная 90-летию Института НИИ Эпидемиологии, Вирусологии и Медицинской Паразитологии им. А.Б. Алексаняна, Ереван, 2013; Congresul specialiștilor din domeniul Sănătății Publice și Management Sanitar din Republica Moldova, Chișinău 25-26 octombrie 2013; A XII-a Ediție a Salonului Internațional al Cercetării, Inovării și Inventicii „PRO INVENT 2014”, Cluj-Napoca, România, 19-21 martie 2014; Third ISIRV-AVG Conference Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management 4th-6th June 2014, Tokyo, Japan; The XVIII-th International Exhibition of Research, Innovation and Technological Transfer „INVENTICA 2014”, Iasi, Romania, 2-4 July 2014; 4th International Influenza Meeting, Muenster, Germany, September 21-23, 2014; Conferința Centrul de Sănătate Publică din municipiul Chișinău – 70 de ani la Straja Sănătății, Chișinău, Republica Moldova, 22 octombrie 2014; A VII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, București, România, 12-14 Noiembrie 2014;

Salonul Internațional de Inventică PRO INVENT, Ediția a XIII-a, Cluj-Napoca, România, 25-27 martie 2015.

Rezultatele cercetărilor au fost discutate și aprobate la ședința Centrului Controlul Bolilor virale al Centrului Național de Sănătate Publică (Proces verbal nr. 3 din 16.12.2014), la ședința Consiliului științific al CNSP (Proces verbal nr. 1 din 20.01.2015), și la ședința Seminarului Științific de profil, specialitatea 163.04 – Microbiologie, din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM (Proces verbal nr. 2 din 02.04.2015),

**Publicații la tema tezei:** Rezultatele cercetărilor sunt reflectate în 28 lucrări științifice (2 din ele fără coautori), inclusiv: 6 articole în reviste științifice naționale, 2 articole în reviste științifice internaționale (cotate ISI IF = 4.659 și SCOPUS), 1 teză a comunicării la nivel național, 17 teze ale comunicărilor internaționale, 1 brevet de invenție MD 782 Z publicat în „Buletinul Oficial de Proprietate Industrială” (BOPI) nr. 6, 30 iunie 2014.

**Volumul și structura tezei:** Teza este scrisă în limba română, tehnoredactată la calculator, compartimentată tradițional și include: foaia de titlu, foaia privind dreptul de autor, rezumate în limbile română, engleză și rusă, lista abrevierilor, cuprins, introducere, cuvinte-cheie, 4 capitole, concluzii și recomandări practice, referințe bibliografice, anexe, declarația privind asumarea răspunderii, CV-ul autorului. Teza este expusă pe 118 pagini de text cules la calculator în editorul Word, este ilustrată cu 22 tabele, 47 figuri, 10 anexe. Teza este fundamentată pe 191 referințe bibliografice.

#### **Sumarul compartimentelor tezei**

În **Introducere** sunt argumentate actualitatea, importanța și necesitatea cercetării științifice efectuate, este reflectată situația actuală în domeniu, sunt formulate scopul și obiectivele studiului. Descrierea și expunerea inovației științifice și a rezultatelor obținute confirmă aspectul științific al studiului efectuat și importanța lui pentru medicină, în special pentru sănătatea publică.

**Capitolul 1. „EVOLUȚIA CAPACITĂȚILOR DE DIAGNOSTIC PRIVIND STUDIAREA ȘI EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR ETIOLOGICE ALE INFECȚIILOR GRIPALE”** cuprinde o sinteză a bazelor teoretice, inclusiv rezultatele cercetărilor științifice privind etiologia, caracteristicile antigenice, fenotipice și genotipice ale virusurilor gripale efectuate de către cercetătorii și specialiștii din acest domeniu. Sunt expuse principalele repere existente în domeniul de cercetare la nivel național, european și mondial. Sunt descrise studii științifice importante, efectuate în ultimul deceniu, privind evaluarea particularităților etiologice, inclusiv particularitățile antigenice, fenotipice și genotipice ale virusurilor gripale circulante la nivel de mapamond. Sunt argumentate scopul și obiectivele tezei

prin analiza profundă a referințelor bibliografice recente ale savanților contemporani cu renume internațional. În concluzii sunt nominalizate premisele care au stat la baza inițierii acestui studiu.

**Capitolul 2. „Materiale și metode”** include reflectarea detaliată a metodologiei, metodelor și materialelor de cercetare folosite în cadrul studiului științific efectuat. Acesta include metode descriptive, virusologice, imunologice, de biologie moleculară, analitice și statistice.

În calitate de materiale de studiu au fost folosite 9799 de probe codificate cu material biologic colectat de la pacienții cu diagnosticul prezumtiv „Gripă”, „IRVA” și „SARI”, 127 tulpini de virusuri gripale izolate din probele pozitive la prezența ARN virusurilor gripale circulante, 78 tulpini cercetate pentru evaluarea particularităților genotipice ale virusurilor gripale la nivelul genei HA și 71 tulpini evaluate genetic pentru gena NA.

**Capitolul 3. „Studierea și evaluarea tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în perioada pandemică”** elucidează rezultatele unei cercetări moderne, cu aplicarea în premieră pentru Republica Moldova a tehnicilor de biologie moleculară în diagnosticarea gripei. Sunt prezentate rezultatele evidențierii particularităților antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale circulante în perioadele evidențiate, caracterizate prin similaritate antigenică cu tulpinile vaccinale, apartenența la grupurile genetice în baza arborilor filogenetici globali, sensibilitatea la remediile antivirale de ultimă generație. Rezultatele obținute au permis de a confirma procesul evolutiv al virusurilor gripale de la o perioadă la alta (pre-pandemică – pandemică – post-pandemică) prin variații antigenice majore, manifestat prin apariția în circulație a unei tulpini noi de virus gripal A(H1N1)pdm și substituția din circulație a virusului gripal sezonier A(H1N1) cu virusul gripal A(H1N1)pdm.

**Capitolul 4. „Evaluarea particularităților virusurilor gripale în perioada interepidemică întru optimizarea supravegherii epidemiologice și virusologice a gripei”** include evidențierea particularităților care influențează în timp evoluția virusurilor gripale, fapt ce a permis de a extrapola concordanța rezultatelor obținute în acest studiu la datele selectate din literatura internațională, și anume prin confirmarea procesului evolutiv al virusurilor gripale de la un sezon la altul prin variații antigenice minore.

Rezultatele studiului au permis valorificarea sistemului de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI de tip sentinelă racordat la exigențele OMS, ECDC și CDC prin implementarea și valorificarea algoritmului de investigații ce țin de evaluarea particularităților antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale, ceea ce contribuie la studiarea tulpinilor de virusuri gripale în cadrul Rețelei Globale de Supraveghere și



Răspuns la Gripă (GISRS) din cadrul Rețelei Globale de Supraveghere la Gripă al OMS (WHO GISN).

Rezultatele lucrării sunt utilizate în cadrul rețelei WHO GISN, fapt ce contribuie la: aprecierea formulei cocktailului vaccinal antigripal pentru fiecare sezon; depistarea cât mai precoce a noilor substituții de aminoacizi care ar putea influența patogenitatea, tropismul și capacitatea de transmisie a virusurilor gripale de la o specie la alta; evidențierea factorilor determinanți ai reasortării virusurilor, în special în apariția de noi virusuri cu potențial pandemic, inclusiv rezistente la remediile antivirale aflate în uz, pentru evaluarea remediilor antivirale noi orientate spre ajustarea unui tratament antiviral adecvat.

Rezultatele studiului efectuat în laboratorul Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale din cadrul CNSP cu valorificarea lor în practică, au permis de a fortifica sistemele de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI național și sentinelă cu realizarea măsurilor de control și răspuns. De asemenea, rezultatele expuse au fost utilizate în procesul de acreditare a laboratorului nominalizat de către OMS, care a fost recunoscut ca Centru Național de Gripă inclus în Rețeaua Globală de Supraveghere la Gripă (GISN) prin intermediul Sistemului Global de Supraveghere și Răspuns la Gripă al OMS (WHO GISRS).

# 1. EVOLUȚIA CAPACITĂȚILOR DE DIAGNOSTIC PRIVIND STUDIAREA ȘI EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR ETIOLOGICE ALE INFECȚIILOR GRIPALE

## 1.1. Aspecte etiologice ale infecțiilor gripale și caracteristicile morfostructurale ale virusurilor gripale

Infecțiile gripale, ce se declanșează regulat și sezonier prin epidemii și periodic (la diferit interval de timp: 10-40 ani) prin pandemii, au un impact negativ atât asupra sănătății publice, sistemului de sănătate, cât și asupra economiei naționale, și astfel, impun eforturi considerabile de control și răspuns.

Gripa este provocată de virusurile gripale din *familia Orthomyxoviridae*, *genul Influenza virus*, care include virusurile gripale de tip A, B și C cu genom ARN, monocatenar, segmentat, de sens negativ.

Virusul gripal A pentru prima dată a fost izolat în 1930 de la porci, de către virusologul american Richard Shope, însă primul caz de infectare a omului cu gripă porcină a fost atestat cu trei ani mai înainte [1-3]. De la oameni, virusul a fost izolat în 1933, de un grup de cercetători englezi Wilson Smith, Cristofer Andrews și Patrick Laidlow. Virusul gripal A este unul din cele mai cunoscute și mai înfricoșătoare dintre virusurile gripale, cauzând cele mai serioase epidemii și pandemii în istoria omenirii cu o rată extrem de înaltă de spitalizări și decese [6, 15-18].

Virusul gripal B, a fost descoperit în 1940 de către virusologul american Thomas Francis-Junior. După gradul de virulență, contagiozitate și semnificație epidemică, virusul gripal B, mereu a cedat în fața virusului gripal A. Acest virus nu cauzează pandemii, însă este un agent patogen al focarelor epidemice moderate, soldate uneori cu spitalizări și cazuri de deces [6, 15-18].

Virusul gripal C a fost izolat pentru prima dată în 1947 de către virusologul american Richard Taylor. Spre deosebire de virusurile gripale A și B, virusul gripal C cauzează infecții respiratorii ușoare, similare răcelilor banale, însă la copiii mici poate evolua destul de grav. Pentru virusul gripal C este caracteristică o stabilitate majoră a proprietăților antigenice și biologice comparativ cu virusurile A și B. De obicei nu cauzează epidemii, poate doar să însoțească epidemiile de gripă A și B și nu are impact sever asupra sănătății publice [6, 15-18].

Genomul virusurilor gripale este de tip ARN monocatenar, de sens negativ, segmentat. Numărul de segmente diferă în funcție de tipul viral: virusurile gripale A și B au genomul constituit din 8 segmente, iar virusul gripal C – din 7 segmente. De asemenea, aranjarea anumitor fragmente/segmente de ARN în virion pentru fiecare tulpină de virus gripal în parte, poartă un caracter individual [1, 5]. Cercetările din mijlocul sec. XX au stabilit că ARN virusurilor gripale

este segmentat datorită proprietăților lor deosebite: rata înaltă de recombinare; participarea la reactivări multiple și încrucișate; reasortarea care are loc în natură, ceea ce sporește diversitatea genetică a virusului; precum și inactivarea diverselor funcții ale virusului gripal cu anumiți agenți chimici și raze UV [5, 6, 16, 18].

Din cele 8 fragmente ale ARN viral – 7 codifică proteinele structurale și doar un singur fragment (segmentul 8) – proteinele nestructurale (NS1 și NS2), funcțiile cărora sunt legate de reproducerea virusului gripal. În general, genomul virusului gripal codifică cel puțin 12 (cunoscute în prezent) proteine virale, majoritatea dintre ele sunt necesare pentru replicarea eficientă a virusului în celula-gazdă și la structurarea virionilor [5, 6, 18, 19].

Genomul viral împreună cu proteinele virale: proteaza acidă (PA), proteazele bazice (PB1 și PB2) și nucleoproteina (NP) formează nucleocapsida. Cea din urmă fiind protejată de către învelișul viral, derivat, de facto, din membrana celulei-gazdă în timpul exocitozei (figura 1.1).

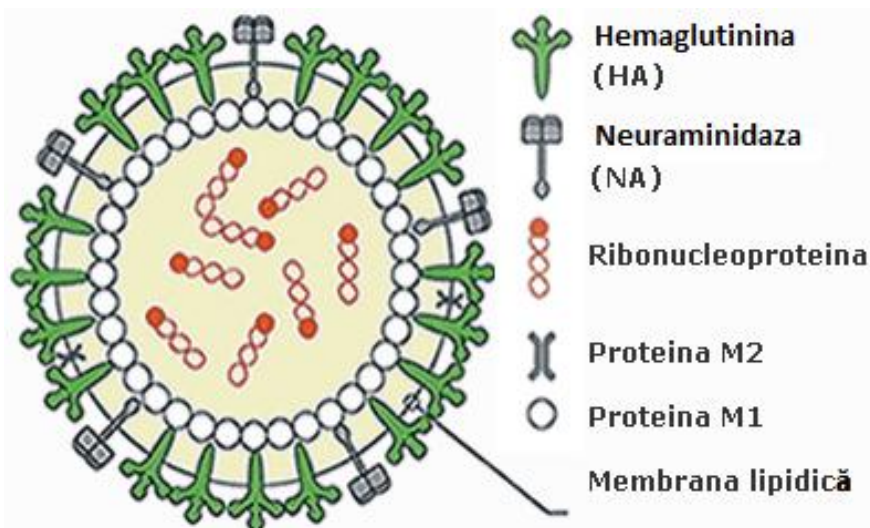


Fig. 1.1. Structura virusului gripal [19].

Învelișul viral este compus predominant din proteinele de suprafață hemaglutinina (HA), neuraminidaza (NA) și proteinele matriță (M: M1 și M2). HA este responsabilă de atașarea particulei virale la receptorii celulei-gazdă (acidul sialic) și de pătrunderea virusului în celulă, în special, în procesul contopirii membranei virale cu cea celulară. NA înlătură acidul sialic de la HA pentru a-i facilita pătrunderea în celulă și participarea în următoarele etape de reproducere a virusului. Totodată, NA conduce la eliberarea particulelor virale de pe suprafața celulei și răspândirea virusului în tractusul respirator [5, 6, 19, 20].

Proteinele matriță (M: M1 și M2) sunt componente ale stratului lipidic intern al învelișului viral, fapt ce rezultă în interacțiunea proteinei M cu HA și NA. Proteina M1 – este mediatorul aranjamentului dintre nucleocapsida helicoidală și învelișul viral, astfel participând la structurarea virionului. Pe când, proteina M2 (prezentă doar în virusurile gripale de tip A)

reprezintă, de fapt, un canal ionic, care reglează pH în procesul "dezbrăcării" virusului în endosomi și în aparatul Golgi, unde și are loc sinteza HA. În acest caz, crearea unui pH acid este o condiție absolut necesară în procesul de eliberare a virusului și stabilizare a conformării HA în timpul transportului lui intracelular, asigurând astfel, existența mecanismului de interacțiune cooperativă a structurilor interne cu glicoproteinele externe și canalele ionice ale membranei lipidice a virusului gripal (figura 1.1) [5, 6, 11, 19-22].

Dat fiind faptul, că principalii determinanți antigenici ai virusurilor gripale A și B sunt HA și NA – glicoproteine transmembranare, ele sunt capabile să inducă răspunsuri subtip-specifice și imun, care sunt pe deplin protective în cadrul subtipului și numai parțial protective între diferite subtipuri. În baza antigenicității acestor glicoproteine, virusurile gripale A, la momentul actual, sunt grupate în 16 subtipuri de HA (H1-H16) și 9 subtipuri de NA (N1-N9). Anume combinația dintre diferitele subtipuri de HA cu diferitele subtipuri de NA și se numește subtip viral: din 144 (16 x 9) subtipuri teoretic posibile, în prezent se cunosc 115, dintre care la om au fost identificate subtipurile H1, H2, H3 de HA și N1, N2 de NA (și anume virusurile gripale A(H1N1), A(H2N2), A(H3N2)). Aceste grupări devin considerabile când se efectuează analiza filogenetică a nucleotidelor și sunt deduse secvențele de aminoacizi ale genelor de HA și NA respectiv [5, 6, 16-19].

Nomenclatura convențională a tulpinilor de virusuri gripale este folosită pentru codarea lor și necesită conotarea tipului de virus gripal, specia gazdei (omisă în cazul originii umane a virusului), originea geografică, numărul de serie și anul izolării, și numai pentru virusul gripal A în paranteze se indică subtipurile de HA și NA – ex. A/HongKong/156/97 (H5N1) – tulpină de virus gripal de tip A, izolată de la om, originea geografică – Hong Kong, din proba nr. 156, în anul 1997, cu subtipul H5N1 [5, 6, 15-18].

Variația antigenică și circulația virusurilor gripale între specii sunt cauza izbucnirilor epidemice care au loc anual, îmbolnăvirile fiind favorizate de răspunsul imun neadecvat, chiar în acele segmente de populație care au fost anterior expuse infecției gripale. Variația antigenică este particularitatea fundamentală a virusurilor gripale A și B, care are loc la nivelul antigenelor de suprafață HA și NA, reprezentând astfel, un mecanism evolutiv de adaptare a virusurilor pentru asigurarea supraviețuirii lor ca specie [5, 6, 9, 15-18, 20, 22, 23].

Se cunosc două mecanisme ale variației antigenice: minoră (antigenic drift) și majoră (antigenic shift). Variația antigenică minoră se întâlnește la toate tipurile de virusuri gripale, însă totuși, se presupune că virusul gripal C nu se supune drift-ului antigenic, deoarece mutațiile în gena HA nu poartă caracter consecvent. Totodată, atât variația antigenică minoră – drift-ul antigenic, cât și cea majoră – shift-ul antigenic se întâlnesc la virusul gripal de tip A. Acest fapt

poate fi explicat prin numeroasele epidemii, care au loc în fiecare sezon rece, cât și prin cunoscutele pandemii de gripă descrise în baza investigațiilor efectuate de către numeroși cercetători virusologi [5, 6, 9, 15, 18, 24]. Drift-ul antigenic apare în rezultatul mutațiilor punctiforme în genomul viral, ceea ce conduce, la rândul său, la modificarea proteinelor determinanților antigenici până la pierderea capacității de recunoaștere de către sistemul imun al gazdei. Anume mutațiile, inclusiv înlocuirile, delețiile și inserțiile sunt responsabile de apariția variantelor antigenice noi. Sub acțiunea imunității colective are loc selecția virusurilor, ce se deosebesc după caracteristicile antigenelor de suprafață de tulpina paternă inițială. Cu toate acestea, gene aparte ale virusurilor gripale umane acumulează mutații cu o viteză aproximativ constantă, ceea ce permite de a menționa despre "timpul molecular" al virusului gripal. Variațiile antigenice (drift) ale virusurilor gripale A și B apar și domină timp de 2-5 ani și numai după aceasta sunt înlocuite cu o altă diversitate antigenică [6, 16, 18, 20].

Până la sfârșitul anilor 70 ai sec. XX era recunoscută ideea că subtipurile virusului gripal A se schimbă reciproc în mod consecutiv. În aceeași perioadă savantul virusolog E. Kilbourn a atestat faptul, că "fiecare serotip al virusurilor gripale A umane imediat îl înlocuiește pe predecesorul său și singur va fi înlocuit de următorul". Însă, cercetările și studiile ulterioare ale agenților patogeni ai sezoanelor epidemice au demonstrat că lucrurile nu stau așa după cum se menționase. Astfel, particularitățile etiologice ale gripei contemporane sunt prezentate de cocirculația a două subtipuri de virus gripal A: A(H1N1) și A(H3N2), precum și a virusului gripal de tip B, având, însă, fiecare din ele semnificație epidemică diferită [15, 18, 25, 26].

În contrast, shift-ul antigenic, denotă o schimbare momentană și profundă în determinanții antigenici, cu alte cuvinte, o înlocuire a ambilor sau a unuia din subtipurile de HA și NA, într-un singur ciclu de replicare. Aceasta are loc în celula care este infectată simultan cu două sau mai multe virusuri gripale de tip A de diferite subtipuri. Odată ce distribuția segmentelor replicate ai genomului viral în interiorul virionului nou format are loc independent de originea subtipurii fiecărui segment, atunci poate să apară un așa virion, capabil deja de replicare, care va purta informația genetică a diferitor virusuri parentale (așa-numiții reasortanți) [5, 6, 9, 15-18, 23, 26].

În general, numeroasele teorii despre apariția variantelor pandemice a virusurilor gripale pot fi divizate în ipotezele antropozică și zooantropozică. Se presupune, că una din modalitățile de menținere a virusului gripal A în populația umană este persistența lui în organismul uman. Asemenea presupunere a fost bazată pe cercetările care au stabilit, că după încheierea ciclului pandemic virusul gripal foarte repede dispărea din circulație. Conform ipotezei date, virusul gripal în organismul uman trecea într-o formă inactivă, care, însă, peste mai

multe luni sau chiar ani, el putea să se reactiveze. Reiese, că prezența infecției latente și persistente poate explica mecanismul shift-ului antigenic și includerile repetate în circulație a principalelor subtipuri ai virusului gripal de tip A [5, 6, 15, 26].

Urmărind istoria ciclurilor pandemice ale virusului gripal A, a putut fi confirmată ipoteza persistenței virusurilor gripale prin reapariții repetate la diferit interval de timp, fapt ce nu exclude posibilitatea persistenței lui în rezervorul animal. Pe de altă parte, există date veridice, că virusurile de origine aviară, umană și porcină clasică au un strămoș comun – și anume virusul gripal de origine aviară. Unii cercetători presupun, că anume virusul gripal aviar trece bariera de specie, infectând la început porcii, apoi după o anumită adaptare, alte mamifere, și ulterior, nimereste în populația umană. Acest fapt, a putut fi urmărit în 1918, când a apărut pandemia de gripă "spaniolă", determinată de virusurile gripale ale mamiferelor, HA căroră era strâns legată de varianta HA aviare [4-7, 9, 15-18, 20, 22, 23, 25, 27-29].

Modalitatea cu care virusul gripal este capabil să treacă periodic bariera de specie poate explica ipoteza despre prezența în una din genele polimerazice a mutației care duce la sporirea gradului de variabilitate a agentului, la apariția a unui număr considerabil de variante și la crearea unor condiții mai bune pentru adaptarea în organismul diferitor specii de animale și păsări. Întru confirmarea ipotezei date au fost aduse dovezi, care au demonstrat că HA virusurilor gripale A(H1N1) izolate de la porcinele bolnave din Europa de Nord a fost înrudită antigenic și genetic cu HA aviară. Apoi, aceste virusuri porcine noi au putut din nou să treacă bariera de specie și să provoace o epizootie la curcani fără producerea de variații genetice. Acești agenți se caracterizau printr-o instabilitate extremă, variabilitate și viteză de evoluție înalte. Faptul dat ar putea explica fenomenul istoric de trecere a barierei de specie a virusului gripal aviar, astfel făcând posibilă apariția unei linii clasice stabile de virus gripal porcine în SUA [5, 18, 24, 30].

Un alt mecanism posibil al shift-ului antigenic, în rezultatul căruia au apărut două tulpini pandemice de virusuri gripale – este reasortarea genelor virale. În prezent sunt dovezi convingătoare asupra faptului, că tulpinile pandemice – asiatică A(H2N2) (1957) și de Hong Kong A(H3N2) (1968) – au apărut în rezultatul reasortării virusurilor umane și aviare; genele HA, NA și a unei proteine din complexul polimerazic având origine aviară. Alte gene ale acestor tulpini pandemice sunt similare cu genele analoage ale virusurilor gripale umane anterioare A(H1N1) și A(H3N2). Cu toate acestea, porcinele fiind sensibile atât față de virusurile gripale umane, cât și față de cele aviare, au putut fi gazde intermediare pentru formarea variantelor shift (figura 1.2) [5, 18, 21, 24].

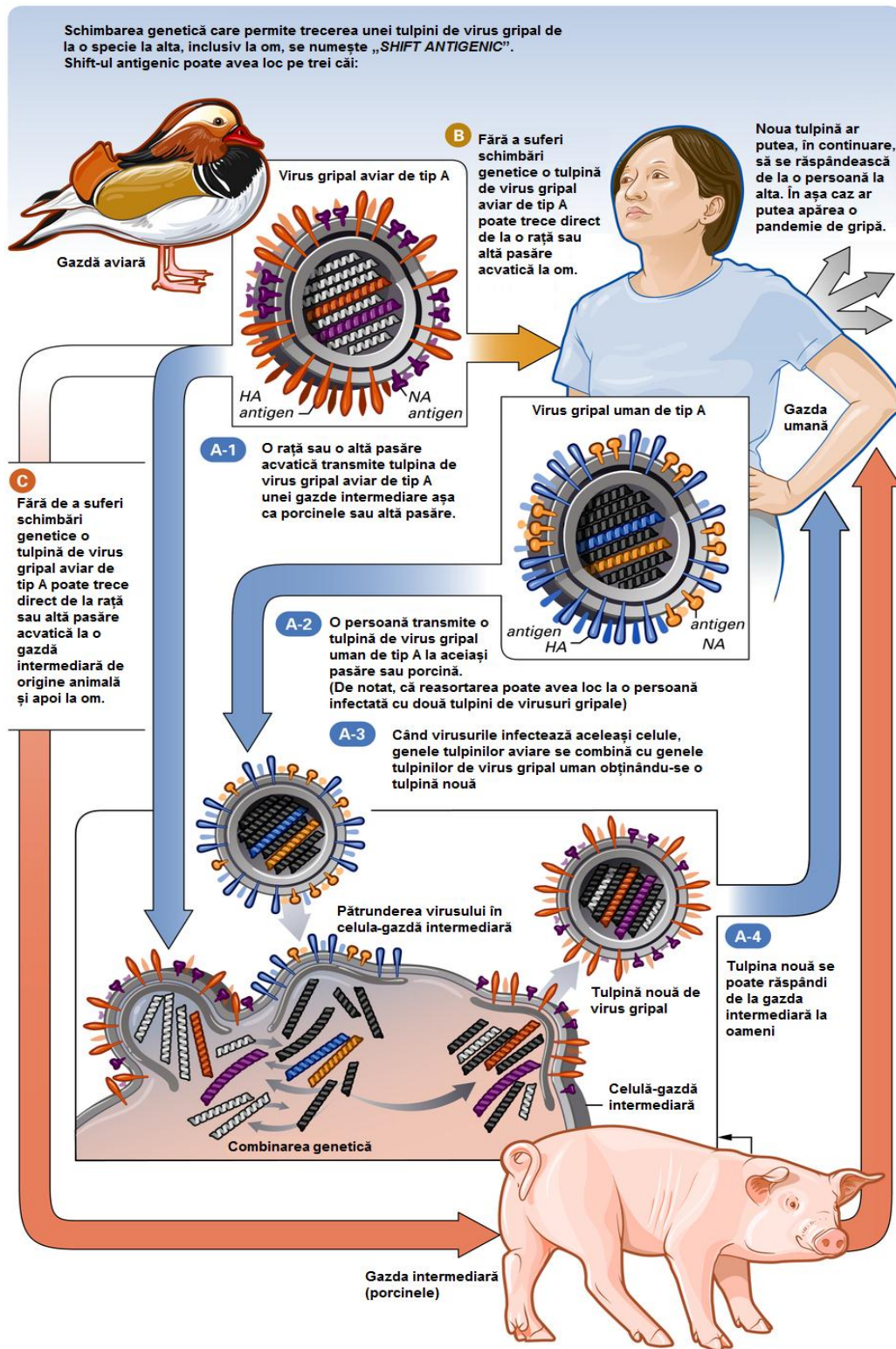


Fig. 1.2. Mecanismul shift-ului antigenic [6].

Astfel, similaritatea genofondului virusurilor gripale de tip A umane și ale altor specii de mamifere în biosferă acordă o actualitate deosebită fenomenului de participare a virusurilor gripale animale și aviare în formarea variantelor pandemice. Totodată, trebuie de menționat, că

semnificație epidemică considerabilă pentru umanitate, pe parcursul studierii virusurilor gripale au avut doar 3 subtipuri de virusuri gripale A: A(H1N1), A(H2N2) și A(H3N2) [18, 23].

Așa dar, pandemiile de gripă au loc atunci, când își face apariția un nou virus gripal, la care marea majoritate a populației umane de pe glob nu are protecție imună sau aceasta este foarte slabă, care are un potențial înalt de infectare a oamenilor provocând cazuri clinice de boală și cu o transmisibilitate înaltă de la persoană la persoană. Aceste particularități rezultă într-un impact de talie globală a infecției gripale ce afectează un procent considerabil de persoane și cauzează o sporire a nivelului de mortalitate [1, 4, 6, 9, 16-18, 20, 23-36].

Practic, întru confirmarea celor expuse mai sus poate fi adus exemplul ultimei pandemii din șirul istoric care și a avut loc în 2009-2010 – prima pandemie a sec. XXI. Această pandemie, de o severitate moderată, a fost provocată de un nou virus gripal reasortant A(H1N1)pdm09. Analiza genetică a acestui virus pandemic a dezvăluit o nouă combinație a genelor virusurilor umane, porcine și aviare eurasiatice. Virusul conține genele HA, NP și NS ale virusului clasic de origine porcină, genele PB2 și PA ale virusurilor aviare nord americane, gena PB1 a virusurilor H3N2 de origine umană și genele NA și M ale virusurilor porcine eurasiatice similare celor aviare. Nu se exclude probabilitatea, că acest virus provine de la virusurile porcine triplu reasortante circulante la porcine în perioada anilor 1997-1998 conținând genele HA, NA și PB1 similare virusurilor umane și genele interne PB2 și PA de origine aviară [4, 7, 15, 16, 20, 23, 30, 37, 38]. Cercetările, însă, au demonstrat că aceste virusuri sunt sărace în determinanți moleculari specifici pentru adaptarea la gazda umană, astfel sugerând un rol încă necunoscut/nedocumentat a markerilor moleculari asociați transmisiei umane [7, 11, 20, 28, 30, 38-51]. Aceste virusuri, în consecință, nu posedă markeri asociați cu virulența înaltă sau patogenitatea care au fost observate la virusul H1N1 din 1918 sau patogenitatea înaltă a virusurilor H5N1 [12, 21, 30, 42].

Totodată, analiza filogenetică a demonstrat că secvența de HA a tulpinii de virus gripal A(H1N1)pdm 09 cel mai mult se aseamănă cu cea a tulpinii din 1918 și a fost antigenic distinctă de virusurile H1N1 umane recente, precum și de componentii vaccinurilor. Antigenic, însă, virusurile A(H1N1)pdm09 sunt omogene și printre tulpinile istorice de virusuri gripale, sunt cele mai similare cu virusurile gripale porcine A(H1N1) clasice (triplu reasortant) [20, 21, 23, 28, 30, 42, 52].

Printre virusurile A(H1N1)pdm09 analizate au existat doar câteva substituții de aminoacizi la nivel de HA, și nici una din ele nu au avut efect antigenic. Deci, variația antigenică printre virusurile A(H1N1)pdm09 circulante în populația umană este la moment mai mică față de cea observată în timpul unui sezon gripal tipic [15, 20, 23].



Cu toate acestea, s-a atestat că virusul A(H1N1)pdm09 posedă o transmisibilitate înaltă și are un avantaj biologic distinct în replicare, transmisie, tropism și patogeneză în comparație cu ambele virusuri sezoniere reprezentative A(H1N1) și A(H3N2). Similaritatea în manifestările epidemiologice ale acestei tulpini de virus gripal a fost observată în populație atât în emisfera nordică, cât și în cea sudică [15, 21, 30, 42, 48, 53-55].

Astfel, pe măsură ce cunoaștem mai mult despre virusurile gripale, un efort considerabil este necesar pentru a răspunde la întrebările: care sunt factorii determinanți în transmisia virusului de la o specie la alta; care sunt factorii ce determină reasortarea virusurilor, - factori critici în apariția unor noi virusuri pandemice. La nivel global, însă, există posibilitatea de a urmări evoluția virusurilor gripale, practic în timp real, ceea ce ne poate asigura cu informații inestimabile întru stabilirea factorilor ce determină patogenitatea și/sau transmisibilitatea lor.

## **1.2. Caracteristica fenotipică și genotipică a virusurilor gripale**

Virusurile gripale se caracterizează printr-o structură unică a genomului, dar și prin instabilitate genetică, fapt datorat mutațiilor punctiforme și evenimentelor de reasortare, ceea ce contribuie la apariția noilor variante sau tulpini de virusuri gripale cu potențial epidemic sau pandemic. Atât epidemiile, cât și pandemiile au un impact economic substanțial datorită costurilor profilaxiei și tratamentului, absenteismului, vizitelor la medic, precum și excesul de spitalizări. Prin urmare, este necesară o înțelegere detaliată a mecanismelor ce determină patogenitatea și transmisia virusurilor gripale între specii, combinată cu disponibilitatea măsurilor efective de prevenție și tratament întru realizarea măsurilor de control și răspuns al infecțiilor gripale [23].

În timp ce persoanele dezvoltă imunitate de lungă durată la o anumită tulpină de virus gripal, mutațiile antigenice față de genomul virusului gripal rezultă în proteine ce sunt recunoscute într-o măsură mai mică de către sistemul imun uman, lăsând persoanele susceptibile în viitor la infectare. Evoluția fenotipului antigenic apare punctiform cu episoade de înnoire intercalate de perioade de stază, în timp ce evoluția genetică pare mai continuă, ceea ce sugerează că un număr relativ mic de modificări genetice sau combinații de modificări genetice pot conduce la apariția modificărilor la nivelul fenotipului antigenic. Populația de virusuri gripale evoluează continuu în fenotip antigenic în așa-numitul proces de drift antigenic care se realizează prin intermediul antigenelor de suprafață HA și NA. Aceste două proteine sunt codate de segmentele 4 și 6 ale genomului viral (constituit în general din 8 segmente), localizate pe suprafața virionului, ele sunt prima țintă pentru răspunsul imun al gazdei. Celelalte șase segmente sunt codificate de către proteinele: PB2 (segmentul 1), PB1 (segmentul 2), PA (segmentul 3), NP (segmentul 5), M1 și M2 (segmentul 7), NS1 și NS2/NEP (nuclear export

protein) (segmentul 8). O proteină-accesoriu, suplimentară, PB1-F2 poate fi codată de segmentul 2 și ea poate conferi proprietăți de virulență virusurilor care o expresează prin faptul, că ea se asociază cu proteinele mitocondriale inducând procesul de apoptoză în celulele imune. Acest factor de virulență a fost identificat printre virusurile gripale de tip A, stabilindu-se, totodată, asocierea lui cu patogenitatea sporită a virusului gripal înalt patogen A(H5N1), precum și a virusului gripal pandemic din 1918. Proteina fragmentată PB1-F2 cu fragment deschis pentru citire (PB1-F2 ORF – open reading frame) s-a dovedit a fi legată de replicarea virală continuă, inclusiv și de răspunsul proinflamator sporit. Totodată, proteina nestructurală NS1 suprimă expresia genelor antivirale în celulele-gazdă. Marcherii virulenței precum și factorii ce contribuie la transmisia între specii au fost identificați în proteina PB2, pe când determinanții rezistenței antivirale au fost depistați în proteinele NA și M [56-61].

Din momentul izolării pentru prima dată în 1930 a virusului gripal A(H1N1) de la porcine - antigenic foarte asemănător virusului gripal uman reconstruit A(H1N1) din 1918, ele împărtășesc, probabil, un strămoș comun și până la sfârșitul anilor '90 ai secolului XX acest virus gripal "clasic porcine" a circulat în populația porcinelor și a fost antigenic relativ stabil. În anul 1998, sau mai înainte, acest virus gripal clasic porcine a reasortat cu virusul gripal uman contemporan A(H3N2) și cu un virus aviar de linie americană cu subtip necunoscut, rezultând în apariția în populația porcine nord-americană și mai târziu în populația porcine asiatică a virusului gripal porcine triplu reasortant H3N2 (rH3N2). Cercetările au demonstrat că acest virus rH3N2 posedă genele HA, NA și PB1 de la virusurile gripale umane, genele PA și PB2 de la virusurile gripale aviare și genele interne NP, M și NS de la virusurile gripale porcine [36, 42, 56, 58]. Datorită diferențelor intrinsece dintre gazde (ex. receptorii celulari) și ale apărării selective (sistemele umoral și celular de apărare înnăscute și dobândite), diferite modificări în structura antigenică a virusurilor gripale sunt provocate mai mult în populația porcine decât în cea umană. Drept consecință, drift-ul antigenic al virusurilor gripale urmează căi diferite la porcine comparativ cu populația umană. Precum drift-ul antigenic în virusurile gripale umane A(H3N2) este, de obicei, atribuit apărării imune stabilite în populația umană ca urmare a infecțiilor precedente cu variantele anterioare de virusuri gripale, tot așa potențialul comun al mutațiilor de diferențiere a cluster-elor pot sugera că modificările antigenice în virusurile gripale porcine, de asemenea, sunt urmare ale apărării imune. Periodic, aceste mutații ar putea fi selectate în ambele gazde în baza avantajelor diferite față de evaziunea imună sau ar putea fi sporadic cuplate cu alte mutații cu același efect [36, 42, 62-65].

Totodată, virusul gripal A(H1N1) din 1918 a circulat în populația umană până la declanșarea în 1957 a pandemiei de gripă provocată de virusul gripal A(H2N2) ("gripa asiatică").

În această perioadă s-a constatat un drift antigenic substanțial al virusului gripal A(H1N1) departe de virusul din 1918. De la începutul anilor 1950 virusul gripal A(H1N1) a reapărut în populația umană în 1977, iar din 1977 până în 2009 a fost o evoluție antigenică substanțială, fapt ce a determinat reînnoirea de 8 ori a componentului H1 al vaccinului antigripal [36, 42, 56-64].

Staza antigenică relativă a virusului gripal clasic H1N1 în populația porcine s-a estimat până în 1998, în același timp, observându-se drift-ul antigenic substanțial al virusului gripal H1N1 în populația umană, în cele din urmă, acestea au condus la crearea unui decalaj antigenic esențial între virusurile gripale clasice porcine A(H1N1) și virusurile gripale umane A(H1N1). De asemenea, cercetările au demonstrat, că din 2005, izolatele virusurilor gripale umane H1N1 de origine porcine au manifestat cel mai înalt grad de similaritate cu virusurile porcine H1 circulante în Asia și SUA și că proteina N1 are legătură cu virusurile porcine circulante în Europa [41]. Se consideră că porcinele joacă un rol vital în transmisia între specii a virusurilor gripale prin faptul că ele poartă receptori atât pentru tulpinile de virus gripal aviar, cât și pentru tulpinile de virus gripal uman. Aceasta a pus în evidență porcinele drept "vas de amestec" în care materialul genetic poate fi schimbat cu un potențial de a rezulta într-un nou progenitor viral la care populația umană este înalt susceptibilă și nu posedă imunitate. Astfel, populația porcine a devenit un rezervor pentru virusurile gripale H1N1 cu potențial de cauzare a unor epidemii majore sau posibile pandemii în populația umană [36, 42, 58-64].

Caracteristica unui șir de virusuri gripale A(H1N1)pdm pentru determinarea proprietăților antigenice, în prima jumătate a anului 2009, a pus în evidență faptul că antigenic aceste virusuri sunt omogene și printre virusurile istorice, ele sunt antigenic similare cu virusurile clasice porcine A(H1N1), precum și virusurile triplu reasortate A(H1N1) ale liniei nord-americane care au circulat în populația porcine în ultimii 10 ani în SUA, și care ocazional au infectat populația umană în aceeași perioadă. Analiza antigenică a virusurilor A(H1N1)pdm izolate în perioada nominalizată a demonstrat prezența doar a câteva substituții ale aminoacizilor în gena HA, însă niciuna nu s-a dovedit a avea vre-un efect antigenic. Variația antigenică printre aceste virusuri s-a constatat a fi, la acel moment, mai mică decât variația antigenică observată în populația umană în timpul unui sezon tipic/epidemic de gripă [42].

Cu toate acestea, sezonul epidemic 2008-2009 s-a caracterizat prin circulația atât a virusurilor sezoniere clasice cunoscute A(H1N1), A(H3N2) și B, cât și a virusurilor A(H1N1)pdm. Caracteristica antigenică a acestor virusuri gripale a demonstrat că virusurile gripale A(H1N1) au fost asociate cu tulpina A/Brisbane/59/2007-like; virusurile A(H3N2) au fost similare tulpinii A/Brisbane/10/2007-like, ambele tulpini fiind componente ale vaccinului antigripal recomandat de OMS pentru sezonul epidemic 2008-2009. Virusurile gripale de tip B

circulante în sezonul respectiv s-au divizat în două linii distincte reprezentate de tulpinile B/Yamagata/16/88 și B/Victoria/02/87. Virusurile gripale de tip B care au corespuns liniei B/Yamagata au fost analoage tulpinii B/Florida/04/2006, de asemenea, component al vaccinului antigripal din sezonul nominalizat. Însă, paralel cu virusurile enumerate, au fost izolate și tulpini de virusuri gripale de tip B care aparțineau liniei B/Victoria, care la acel moment nu au fost componente ale vaccinului antigripal recomandat pentru sezonul epidemic 2008-2009. În acest context, este necesar de interpretat cu precauție rezultatele caracterizării antigenice, deoarece aceste rezultate s-au bazat, de facto, pe reacția de hemaglutinoinhibare (RHAI) folosind un panel de seruri de referință existente în acea perioadă, și care puteau să nu corespundă protecției clinice împotriva virusurilor circulante asigurate de vaccinul antigripal [66-68].

Vaccinarea antigripală anuală presupune asigurarea unei protecții maxime împotriva acelor tulpini de virusuri gripale care coincid cu virusurile vaccinale, însă o protecție limitată sau, în general, lipsa ei poate fi observată atunci, când tulpinile de virus gripal vaccinal și cele circulante sunt așa de diferite, încât să fie din linii diferite așa cum a putut fi observat cu liniile de virus gripal de tip B (linia B/Yamagata și linia B/Victoria - una fiind component al vaccinului nu poate asigura protecție împotriva celeilalte). Așadar, caracteristica antigenică a tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm a demonstrat că aceste virusuri au fost și sunt antigenic și genetic diferite de tulpinile A(H1N1), fapt ce a sugerat lipsa protecției în urma vaccinării cu vaccinul trivalent recomandat pentru sezonul epidemic 2008-2009 față de virusul gripal nou A(H1N1)pdm [66].

Apariția recentă a virusului pandemic (H1N1) 2009, cunoscut anterior ca virus gripal de tip A de origine porcină, a condus la infectarea până la mijlocul anului 2009 peste 296 mii de persoane pe întreg globul pământesc cauzând în perioada menționată cca 3486 cazuri de deces. Analiza mutațiilor de adaptare a virusului gripal de tip nou A(H1N1) 2009 a devenit o prioritate pentru cercetători care au putut evalua probabilitatea că virusurile de la alte specii non-umane se vor adapta la populația umană. Virusul gripal pandemic constă din mai multe gene virale reasortate de diferită origine. Două gene polimerazice din cele 8 ale ARN genomic segmentat, și anume PB2 și PA, au fost de origine aviară aparținând liniei nord americane și au fost introduse în populația porcină aproximativ în anul 1998. Altă genă polimerazică, PB1, de asemenea, a evoluat recent din virusul gripal uman sezonier A(H3N2) practic în același an. În particular, această genă PB1 a virusului A(H3N2), este cunoscut că, ar fi provenit de la virusul gripal aviar care a intrat în populația umană în anul 1968. Totuși, genele proteice HA, NP și NS ale virusului gripal pandemic (H1N1) 2009 se trag direct de la virusul gripal A clasic porcine al liniei nord americane care poate fi urmărit pornind de la virusul gripal din anul 1918. Alte două gene NA și

M, având originea de la virusul gripal porcin eurasiatic, au fost introduse de la păsări aproximativ în anul 1979. Cu toate că a fost determinată originea segmentelor genelor virusului gripal pandemic (H1N1) 2009, nu este clar mecanismul de transformare a semnelor aminoacizilor gazdă-specifice, deoarece genele virusului gripal de tip nou au evoluat după introducerea lor în circulație în populația porcină câțiva ani în urmă [30, 31]. Totodată, interesant este faptul, că în populația porcină au fost observate aceleași substituții care au avut loc la nivelul genelor HA1 (substituția S203T) și NA (substituțiile V106I și N248D) ale virusurilor gripale A(H1N1)pdm circulante în populația umană. Sistemul imun de apărare al gazdei este considerat a fi principala forță motrice selectivă a substituțiilor de aminoacizi, care pot conduce la apariția drift-ului antigenic, iar HA este ținta principală a anticorpilor neutralizanți. Diversitatea genetică a HA este mult mai înaltă față de gena NA atât în populația porcină, cât și în populația umană. Genele HA și NA ale izolatelor virusurilor gripale A(H1N1)pdm din părți distincte ale lumii sunt legate unele de altele cu o distanță relativ mică și au o singură origine comună, cum era de așteptat pentru un focar pandemic. Remarcarea faptului că majoritatea izolatelor derivate din populațiile umană și porcină par să fi provenit din izolatele derivate din populația umană, și este, de asemenea, în concordanță cu o frecvență mai mare de transmisie de la om la om și de la om la porcine în comparație cu transmisia zoonotică de la porcine la om. Într-adevăr, rapoarte cu privire la izbucnirea gripei sugerează că virusul a evoluat în tăcere la porcine până la introducerea sa în populația umană, după care s-a răspândit rapid printre oameni și frecvent s-a retransmis de la oameni la porci. S-a demonstrat că virusul gripal A(H1N1)pdm a evoluat și s-a transferat (shift antigenic) de la o cladă prototip inițial amestecată la clada prototip 7 predominantă. Selecția și evoluția ulterioară a cladei 7 a rezultat în apariția în circulație a variantelor cu mutațiile genetice D222G/N sau E. Mutația D222G în proteina genei HA ce conduce la lărgirea specificității receptorilor s-a demonstrat a corela cu debutul clinic al bolii și frecvent detectată în cazurile severe/fatale ale gripei pandemice la oameni [32-34]. De asemenea, s-a atestat că substituția D222N este mai frecventă în cazurile fatale ale bolii la oameni, pe când aceleași substituții observate în izolatele virusurilor gripale A(H1N1)pdm de la porcine nu provoacă semne clinice severe de boală [58-64, 69-73].

Caracteristica genotipică a virusurilor gripale A(H1N1)pdm a atestat că în cadrul fiecărui segment de gene există o congruență înaltă printre virusurile gripale pandemice secvențiate până la mijlocul anului 2009, fapt ce a sugerat că introducerea cross-specifică în populația umană a fost un singur eveniment sau mai multe evenimente ale virusurilor genetic similare. Analiza genoamelor virusurilor A(H1N1)pdm din Mexic și SUA, la acel moment, a evidențiat 5 variante genomice mici: secvența consensus; mutația T373I în gena NP pereche cu mutația M582L în

gena PA; substituțiile aminoacizilor V106I și N247D în gena NA pereche cu substituția V100I în gena NP; substituțiile aminoacizilor S206T în gena HA1 grupându-se cu ambele substituții V106I și N247D din gena NA, substituțiile V100I din gena NP și cu substituția I123V din gena NS1; substituțiile aminoacizilor S91P, V323I împreună cu substituția S224P din gena PA [42-44]. Incluziunea izolatelor din Mexic sau alte state vecine printre aceste 5 variante genomice reflectă probabilitatea că aceste variante genomice timpurii au reprezentat introducerea inițială independentă în SUA din Mexic. Datorită intervalului scurt de timp de la detecția pentru prima dată a virusului gripal A(H1N1)pdm, nu era clar ce efect, dacă era în general, au putut avea aceste variații genomice asupra caracteristicilor virale, precum transmisibilitate sau patogeneza. Analiza de secvențiere, însă, nu a identificat caracteristici moleculare deosebite anterior, în cercetări ai altor virusuri gripale de tip A, presupuse că ar conferi transmisibilitate sporită sau virulență [38, 42, 45-46]. Cunoscutul receptor al locusului de legare a proteinei hemaglutinina H1 s-a dovedit a fi tipic multor altor virusuri gripale clasice porcine H1N1 izolate în SUA în perioada nominalizată. Totuși, au fost atestate unele mutații detectate în gena HA a virusurilor gripale A(H1N1) 2009 ce se deosebeau de secvența consensus a virusurilor clasice porcine, niciuna însă, nu a fost identificată în locusul funcțional semnificativ al receptorului de legare cunoscut. După cum a fost de așteptat, multe din virusurile A(H1N1) 2009 conțineau substituții de aminoacizi la locusul antigenic presupus în comparație cu gena HA a virusurilor gripale H1 sezoniere [38-42, 58, 61].

Analiza de secvențiere, de asemenea, a pus în evidență prezența substituțiilor de aminoacizi în gena HA a virusurilor gripale A(H1N1)pdm în pozițiile S220T, D239G/N/S, Y247H, E252K, M247V, Q310H și E391K. S-a observat o predominanță a mutației D239G în unele țări în cazurile soldate cu deces, similar cu substituția D222G, dar care, probabil a fost în concordanță cu vârsta pacienților, factorii de risc, manifestarea și progresarea bolii [73, 77, 78].

Un interes aparte prezintă particularitățile specifice, individuale ale structurii locusului de legare a HA virusului gripal A(H1N1)pdm, și anume, mutațiile D94N, N125D și V250A. Substituțiile perechi în pozițiile 94 și 250 (D94N și V250A) sunt similare în baza structurii situsului de legare cu acizii sialici cu tipul receptorului caracteristic pentru țesuturile umane. Cu toate acestea, substituția V30A, identificată în structura virusului gripal A(H1N1)pdm, poate compensa acțiunea substituției N125D, fapt care poate fi urmărit la prezența concomitentă a substituțiilor D94N și V250A, când schimbul Valinei în poziția 250 cu Alanina influențează semnificativ manifestarea substituției D94N. În special, este stabilit, că substituțiile 30A și 125N sporesc afinitatea HA față de receptorii sialici de tip uman. Mai mult ca atât, combinația 94D, 125N și 250V este caracteristică pentru izolatele de virus A(H1N1) din 1918, iar combinația

94N, 125D și 250A conduce la creșterea afinității HA către receptorii virusurilor gripale aviare. Pentru virusul gripal A(H1N1)pdm este caracteristică combinația 94D, 125N și 250V care completamente corespunde cu reziduurile aminoacidice în pozițiile respective ale virusului gripal care a cauzat pandemia „spaniolă” din 1918. Este necesar de subliniat, că combinația de substituții E190D, Q226L și G228S în hemaglutininele H1, H2 și H3 conduce la trecerea ambiguă a HA de pe receptorii de tip aviar spre receptorii celulelor umane, fapt ce se realizează parțial [50, 73, 77, 78].

Secvențierea unor tulpini de virusuri gripale A(H3N2) a atestat că în toate secvențele genei M1 a fost detectată substituția K174R, la nivel de gena HA a fost caracteristică substituția K29R, iar pentru gena NA au fost caracteristice două substituții sinonimice 351 A>G (în codonul T117) și 408 G>A (în codonul Q136). Acestea, posibil, au indicat la faptul că tulpinile de virusuri gripale A(H3N2) din sezonul 2008-2009 au prezentat o continuitate evoluționistă a tulpinilor de virusuri gripale A(H3N2) din sezonul 2007-2008 [74-76]. Este necesar de menționat, că în secvențele genelor NA ale virusurilor gripale A(H3N2) din sezonul 2008-2009 a fost detectată substituția D147N în locusul de glicozilare. Se cunoaște, însă, că glicozilarea în locusul 130 N1 (ce corespunde locusului 146 în N2) a tulpinii A/Wisconsin/33 (H1N1) dereglează interacțiunea dintre NA și plasminogenul, ceea ce conduce la diminuarea patogenității virusului [73, 74-76].

Marea majoritate din tulpinile gripale A(H3N2) cercetate în perioada nominalizată au purtat în secvența domeniului cu terminația C a proteinei M1 substituția K174R, care sporește tendința sectorului dat al lanțului proteic spre formarea  $\alpha$ -spiralei. Proteina M2 s-a dovedit a conține substituția S31N care este caracteristică rezistenței la remantadină. Cea mai importantă consecință a substituțiilor de aminoacizi ce rezultă în descreșterea afinității pentru receptori este efectul lor asupra eficienței infecției și transmisiei [73, 79]. A fost remarcat faptul, că în sezonul 2009-2010 virusurile gripale A(H3N2) practic nu au participat în procesul epidemic, iar în sezonul 2010-2011 aceste virusuri nu au avut semnificație epidemică [73, 79, 80].

Comparația hărților genetice și antigenice ale virusului gripal A(H3N2) a atestat că impactul antigenic a modificărilor genetice variază în dependență de natura substituțiilor de aminoacizi, poziționarea lor structurală și interacțiunea epistatică cu alte situsuri [75].

Sezoanele epidemice 2008-2009, 2009-2010 și 2010-2011 s-au caracterizat prin reapariția în circulație a virusurilor gripale de tip B aparținente liniei B/Victoria în care au avut loc schimbări semnificative ai proprietăților antigenice – izolatele au fost similare unei tulpini etalon noi, și anume B/Brisbane/60/2008. Analiza genetică a tulpinilor de virusuri gripale de tip B, izolate în perioada anilor 2009-2011, a demonstrat că aceste tulpini au aparținut liniei B/Victoria,

în special cladei 111-ii, sau tulpinii similare B/Brisbane/60/2008 cu substituții caracteristice de aminoacizi (V146I, N165K) în gena HA, afectând regiunile antigenice (buclele 150 și 160). Indiferent de faptul că timp de două sezoane epidemice (2009-2010 și 2010-2011) în lume a circulat și a dominat virusul gripal pandemic A/H1N1/pdm09, virusurile gripale de tip B nu au fost eliminate din circulație, însă rata lor în sezonul 2009-2010 a fost foarte joasă, iar în sezonul 2010-2011 – moderată [81-83].

În acest context, spre deosebire de sezonul 2008-2009, în sezonul epidemic 2009-2010 s-a intensificat circulația tulpinilor de virusuri gripale de tip B aparținente liniei B/Victoria, iar circulația virusurilor gripale B/Yamagata a diminuat. Astfel, componenta ce ține de tulpina virusului gripal B din vaccinul antigripal pentru sezonul nominalizat s-a schimbat, tulpina B/Florida/04/2006-like linia B/Yamagata a fost înlocuită cu tulpina B/Brisbane/60/2008-like linia B/Victoria [66, 67, 81-84].

Comparația filogenetică a tulpinilor de virusuri gripale de tip B linia B/Victoria a demonstrat că substituțiile de aminoacizi N75K, N165K, și S172P în regiunea de codificare HA1 a genei HA definesc clada genetică B/Brisbane/60/2008. Toate virusurile gripale de tip B aparținente liniei B/Victoria circulante în sezonul 2010-2011 au făcut parte din clada menționată. De asemenea, s-a atestat că majoritatea acestor virusuri au purtat substituția de aminoacizi I146V în gena HA comparativ cu virusul vaccinal B/Brisbane/60/2008 și multe virusuri au purtat și substituția L58P, însă nici-una din ele nu s-a dovedit a avea efect antigenic [84].

Arborele filogenetic construit în baza regiunii de codificare HA1 a genei HA a tulpinilor de virusuri gripale de tip B aparținente liniei B/Yamagata, care a reapărut în circulație în sezonul 2012-2013, a pus în evidența prezența substituțiilor de aminoacizi S150I, N165Y, G229D care definesc grupul genetic B/Bangladesh/3333/2007. Însă o parte din virusuri (grupul de virusuri din Suedia, Finlanda și Estonia) s-au plasat în grupul genetic distinct reprezentat de tulpina B/Brisbane/3/2007 – virus prototip al acestui grup. Gena HA a tulpinii de virus gripal B/Athens/9784/2011, ce a prezentat un model distinct în reacția HAI, s-a plasat în grupul genetic B/Bangladesh/3333/2007 codificând, însă, substituțiile V29A, L172Q și M251V comparativ cu virusurile de referință [84].

Este cunoscut faptul că reasortarea – rearanjarea segmentelor genelor virale în celulele-gazdă infectate cu două sau mai multe virusuri gripale – reprezintă un mecanism important în evoluția virusurilor gripale. Infecțiile mixte cu multiple tipuri/subtipuri de virusuri gripale pot conduce la apariția de reasortări. Un aspect substanțial al reasortării este generarea unor noi tulpini de virusuri gripale cu potențial pandemic, unde virusurile gripale umane obțin un subtip



nou de HA și/sau NA de la virusurile gripale aviare și/sau porcine. Reasortarea, de asemenea, facilitează apariția de fenotipuri mai virulente prin permiterea virusurilor de a căpăta segmente cu markeri pentru virulență. Prin reasortare virusurile gripale au obținut gene cu mutații ce țin de rezistența la remediile antivirale și aceste virusuri rezistente se pot replica tot așa de eficient ca și cele sensibile și, de asemenea, pot avea o capacitate de transmisie înaltă [85].

Vaccinurile curente contra gripei sezoniere sunt destinate pentru asigurarea protecției specifice în dependență de tulpină contra două subtipuri ai virusului gripal de tip A circulante (H1N1 și H3N2) și contra unui virus gripal de tip B. Ținta principală a acestor vaccinuri este HA care deține rolul de mediere a pătrunderii în celula-gazdă. Astfel, anticorpilor neutralizanți induși de vaccin blochează pătrunderea virusului în celulă sau prin prevenirea atașării virusului de receptorii ce conțin acid sialic de pe suprafața celulei-gazdă sau prin interferența cu fuziunea virală mediată de HA [85].

Substituțiile de aminoacizi S31N, V27A, A30V, G34E și L26F reprezintă mutațiile ce induc rezistența la adamantane (amantadina și remantadina) în virusurile gripale [73, 85, 86]. Ținta adamantanelor este proteina M2 a virusurilor gripale, care funcționează drept canal ionic activat de acizi și este necesară pentru eliberarea nucleoproteinei după fuziunea cu membrana endosomală. Adamantanele inhibă replicarea virală prin prevenirea deschiderii canalului ionic M2, interferând astfel cu „dezbrăcarea” virusului în timpul endocitozei [87-90]. Cea mai frecventă substituție ce caracterizează rezistența față de adamantane este substituția S31N, care predomină în 98-100% din tulpinile transmisibile rezistente la amantadină H1N1, H5N1 și H3N2 izolate de la oameni, păsări și porcine în ultimii zece ani, pe când mutațiile V27A și L26F sunt mai puțin frecvente [87-89]. Fiecare mutație rezultă sau în legarea redusă a remediului antiviral de ligandul M2 sau în extensia canalului ionic M2 și ambele permit canalului să-și exercite funcția în prezența antiviralelor [87-89, 91-93]. Cercetarea mutațiilor punctiforme la nivelul reziduurilor căptușelii porilor canalului M2 a estimat numărul mic de variante naturale [87, 90, 91]. Astfel, numeroși mutanți în capătul N-terminal apos al porului rețin abilitatea de a conduce selectiv protonii asupra altor ioni, deși dependența de magnitudine și pH ai conductibilității lor variază. Totuși, doar câteva mutații V27A, S31N și L26F au proprietăți similare cu canalul ionic M2 la cele mai distale locusuri [87-89, 91-93].

Rezistența la amantadină a evoluat rapid *in vivo* din momentul administrării ei pacienților cu infecție gripală. Baza genetică a rezistenței față de amantadină este asociată cu substituțiile de aminoacizi, după cum s-a menționat, în regiunea transmembranară a genei M2. Cercetătorii au atestat o incidență înaltă de izolate de virus gripal A(H3N2) rezistente la amantadină, care în gena M2 posedă mutația Ser-31-Asn și o schimbare dublă în gena HA la reziduurile din pozițiile

193 și 225 (clada liniei N). Totuși, puțin se cunoaște despre faptul, dacă modificările la nivelul genei HA au fost sinergice cu modificările care au avut loc în gena M2 ca răspuns la presiunea selectivă a medicamentului sau au avut loc separat și s-au asociat randomizat cu mutațiile de îmbunătățire a afinității [87-89, 91-93].

O altă clasă de remedii antivirale este reprezentată de inhibitorii neuraminidazei (NAI): oseltamivir (Tamiflu) și zanamivir (Relenza) [94]. Ținta NAI este proteina NA a virusurilor gripale care este responsabilă de clivajul reziduurilor acidului sialic al celulelor-gazdă permițând, prin aceasta, eliberarea virionilor aflați în maturizare. NA, de asemenea, are importanță în stabilirea infecțiilor respiratorii la nivelul căilor respiratorii superioare, deoarece clivarea acidului sialic pe suprafața mucoasei expune celulele epiteliale la acțiunea virusului. NAI previn eliberarea virionilor din celulele infectate și, astfel, reduce atât infecțiile căilor respiratorii superioare, cât și durata simptomelor [87, 95, 96]. La nivelul genei NA au fost observate substituțiile de aminoacizi H274Y, E119V, N294S și R292K, substituții care s-a dovedit a conferi virusurilor gripale rezistență la NAI. Mutația H274Y s-a estimat ca cea mai frecventă și pare a fi exclusiv limitată la gena N1 atât în virusurile gripale sezoniere, cât și în cele pandemice în populația umană și pot avea loc spontan fără presiunea aparentă a antiviralelor sau reasortare [87, 95-100]. Totuși, un număr foarte mic de mutații N294S au fost detectate în virusurile A(H1N1)pdm, mai general, însă, toate cele patru mutații s-a stabilit că există în gena N1. În plus la aceasta, deși virusurile gripale A(H3N2) sunt dominate de substituțiile E119V și R292K, substituția H274Y nu a fost niciodată identificată în gena N2 [87, 97]. S-a stabilit că o nouă substituție I223R cauzează o rezistență modestă la NAI, însă, în combinație cu substituția H274Y rezistența la oseltamivir crește semnificativ, pe când rezistența la zanamivir rămâne la nivel scăzut. O altă combinație a două mutații în gena NA, Q313R și I427T, de asemenea cauzează rezistență la ambele remedii NAI: oseltamivir și zanamivir [101, 102-104].

Evoluția rezistenței la oseltamivir în virusurile gripale A(H1N1) pandemice se poate datora mutațiilor punctiforme în orice regiune a genelor NA sau evenimentului de reasortare. Rezistența la oseltamivir în tulpinile de virusuri gripale A(H1N1) pandemice pot apărea în diverse forme: o evoluție sporadică la un pacient infectat drept răspuns la tratament; evoluția rezistenței la oseltamivir la un pacient infectat și transmisia tulpinii date contactilor; menținerea genotipului ce conferă rezistență la oseltamivir într-o linie virală datorită presiunii de selecție și/sau evenimentului de reasortare dintre tulpinile A(H1N1) sezoniere rezistente la oseltamivir și tulpinile A(H1N1) pandemice. Acest eveniment poate oferi un segment al NA posesor a unui genotip ce conferă rezistență la oseltamivir virusurilor A(H1N1) pandemice [105-112].

Analiza de secvențiere a genelor NA și HA virusurilor gripale rezistente a permis de a identifica mutațiile asociate cu rezistența. Așa mutații deseori conduc la substituții în reziduurile conservate în locusurile enzimatic-active ale NA cu sau fără mutații compensatorii în glicoproteinele genelor HA. Acest tip de mutație reduce afinitatea de legare a oseltamivirului de locusul activ cu un efect de reducere semnificativă a sensibilității remediului antiviral [35, 114].

Evaluarea riscurilor de sănătate publică ale virusurilor gripale cu o susceptibilitate redusă față de NAI necesită identificarea lor exactă în baza markerilor rezistenței în genomul viral (la nivel de NA) și/sau investigații funcționale. Analiza virusurilor izolate din populația cu risc sporit, așa ca copiii mici și pacienții imunocompromiși care elimină virusul o perioadă îndelungată de timp, oferă o oportunitate întru îmbunătățirea înțelegerii mecanismelor rezistenței față de NAI și întru a perfecționa criteriile de diagnosticare a rezistenței [103].

Supravegherea virusurilor gripale aflate în circulație reprezintă veriga esențială în monitorizarea infecțiilor gripale, în special în populația umană. Caracteristica antigenică și genotipică a tulpinilor de virusuri gripale, prin posibilitatea detectării diferitor mutații genetice cu diverse efecte antigenice, cu efecte asupra proprietăților de transmisie inter- și intraspecifice, cu efecte asupra sensibilității la antivirale - prezintă mecanismele de bază ale evoluției virusurilor gripale. Astfel, monitorizarea variațiilor antigenice și genetice acumulate în virusurile gripale circulante aduce un aport semnificativ în prognozarea epidemiilor, severității lor, în utilizarea remediilor antivirale specifice sau necesitatea formulării unor remedii noi în dependență de creșterea numărului de tulpini rezistente la preparatele antivirale antigripale aflate în uz, precum și în formularea cocktailurilor de vaccinuri antigripale, care și ele în dependență de variațiile antigenice și genetice necesită a fi periodic reînnoite.

### **1.3. Diagnosticul de laborator: tehnici clasice și de biologie moleculară de ultimă generație**

Gripa este o infecție respiratorie contagioasă responsabilă de apariția periodică a pandemiilor, precum și a epidemiilor sezoniere și prin aceasta impune o povară economică considerabilă prin pierderi de productivitate și costuri esențiale asociate cu tratamentele medicale [2, 4, 5, 18, 23, 25, 26, 28, 35, 38, 53, 54, 73, 115].

Virusurile gripale sunt foarte dinamice și datorită naturii genomului lor ele își pot schimba segmente de gene în celulele coinfectate generând, astfel, progenitori cu noi genotipuri. Aceste evenimente de reasortări genetice joacă un rol primordial în evoluția virusurilor gripale de tip A și au un impact direct asupra sănătății publice [56, 73, 79-81, 115].

Supravegherea regulată și sistematică a gripei este esențială pentru a asigura un tablou comprehensiv al virusurilor gripale prevalente. Informația despre supraveghere și investigațiile de laborator la gripă oferă clinicienilor instrumente suplimentare în determinarea deciziilor de

tratament. Precizia diagnosticului clinic de gripă doar în baza simptomelor este limitată deoarece simptomele maladiilor cauzate de alți patogeni pot interfera considerabil cu gripa. Diagnosticul timpuriu al gripei poate reduce esențial utilizarea inadecvată și irațională a antibioticilor și oferă posibilitatea utilizării tratamentului antiviral specific [53, 54, 115, 116].

Există metode clasice, rapide și tehnici de biologie moleculară pentru diagnosticul gripei și fiecare din metodele folosite depinde de resursele și contextul disponibil. Diagnosticul de laborator disponibil pentru gripă include cercetările pe culturi celulare, serologia, testul antigenic rapid, analiza imunofluorescentă și reacția de polimerizare în lanț. Sensibilitatea și specificitatea oricărui tip de testare la gripă poate varia în dependență de capacitatea de performanță a laboratorului, tipul investigației, dar și de tipul probei testate. Printre eșantioanele respiratorii pentru izolarea virusurilor gripale pe culturi celulare sau detecția rapidă, exsudatele nazofaringiene reprezintă varianta optimă, deoarece sunt mult mai efective și mai informative față de frotiurile faringiene. Indiferent de modul de investigare și testele folosite, este necesar ca rezultatele să fie evaluate în contextul datelor clinico-epidemiologice disponibile [53, 115-117].

**Testele comerciale de diagnostic rapid** al gripei disponibile permit detectarea virusurilor timp de 15 minute. Așa tip de teste rapide diferă prin tipul virusurilor ce pot fi detectate și de posibilitatea de a diferenția tipurile de virusuri gripale. Unele pot detecta doar virusul gripal de tip A, altele pot detecta separat virusul gripa A și aparte B, iar alt tip de teste de diagnostic rapid pot identifica prezența virusurilor gripale în materialul biologic cercetat, însă fără de a le diferenția. Totodată, niciunul din aceste teste nu poate detecta subtipurile virusurilor gripale A. Specificitatea acestor teste, în special, sensibilitatea testelor rapide este mai joasă comparativ cu culturile celulare și variază în dependență de test [118-123]. Datorită sensibilității joase (50-70%) a testelor de diagnostic rapid, întru a se asigura de prezența/lipsa rezultatelor fals-pozitive (în perioada unei activități gripale joase) și fals-negative (în special, când are loc o creștere a activității gripale) este necesar de a se efectua testări adăugătoare confirmatoare ale rezultatelor primare prin orice altă metodă disponibilă în laboratoare [116-123].

**Metodele serologice**, inclusiv neutralizarea virusului, RHA, fixarea complementului, analiza imuno-enzimatică, precum și analiza prin microscopiere imunofluorescentă indirectă – sunt bazate pe prezența anticorpilor specifici la acțiunea virusurilor gripale care apar întâi după două săptămâni de la îmbolnăvirea inițială și care ating apogeul la 4-6 săptămâni după infectare. După unii autori, aceste teste nu sunt disponibile pe larg și rar sunt folosite în managementul pacientului, însă pot fi indicate pentru un diagnostic retrospectiv sau/și supravegherea bolii. O creștere de 4 ori a titrului de anticorpi la virusurile gripale observată între probele de seruri colectate de la pacienți în faza acută și reconvalescentă (3-4 săptămâni după infectare) a bolii

reprezintă diagnosticul infecției. La adulții care au suportat multiple infectări cu diferite tipuri/subtipuri de virusuri gripale, creșterea titrului de anticorpi specifici unei tulpini este necesar de a fi interpretată cu precauție, deoarece răspunsul la tulpina ce a infectat poate fi acompaniat de un răspuns paralel la infecțiile anterioare cu alte tulpini de virusuri gripale. Și, în sfârșit, testele serologice permit cuantificarea răspunsului imun la vaccinarea antigripală, chiar dacă aceste răspunsuri deseori nu sunt așa de viguroase ca răspunsurile rezultate din infecțiile gripale propriu-zise. Această metodă nu asigură clinicienii cu un rezultat important în luarea deciziei de tratament și este disponibilă practic în laboratoarele de cercetare. Testarea serologică a unui specimen de ser nu este interpretativă și nu se recomandă [115, 120-123].

Alți autori, însă, susțin că testele serologice pot juca un rol important în anumite situații. Acestea pot fi: a) în absența unei vaccinări anterioare sau infectarea cu un virus particular, cum ar fi atunci când un virus nou apare, la care nu există imunitate cros-reactivă preexistentă, un singur specimen cu un titru pozitiv este diagnostic și b) testele serologice pot ajuta la stabilirea diagnosticului infecțiilor gripale cu un nou virus sau cu un virus sezonier mai înainte de a obține rezultatele pozitive pe culturi celulare și/sau în testele moleculare PCR. Astfel, la pacienții cu un istoric de maladie compatibilă cu afecțiunile gripale, dar care a încetat să elimine virusul sau la pacienții cu manifestare asimptomatică a bolii, testele serologice pot fi unica opțiune disponibilă pentru stabilirea diagnosticului [124, 125].

Serologia, de fapt, reprezintă un instrument de valoare în realizarea studiilor seroepidemiologice, fiind esențială în estimarea erupțiilor reale ale infecțiilor cu o tulpină antigenic nouă. Unele cercetări de acest gen care au fost efectuate în perioada pandemică (sezonul 2009-2010) au permis atât de a preciza extinderea geografică și spectrul epidemiologic ale noului virus gripal după apariția lui, cât și de a elucida alte aspecte importante ale virusului, cum ar fi imunitatea cros-reactivă preexistentă la persoanele în etate. Aceste aspecte au fost relevante pentru recomandările de sănătate publică privind prioritizarea vaccinului antigripal [124-126]. Cercetările serologice au fost de o importanță majoră în evaluarea imunogenității vaccinului gripal A(H1N1)pdm2009 având un efect semnificativ în formularea recomandărilor privind dozajul pentru diferite grupe de vârstă. Investigațiile serologice au fost și continuă să fie utile în caracterizarea antigenică a virusurilor gripale circulante întru determinarea drift-urilor și shift-urilor antigenice, precum și în formularea recomandărilor privind vaccinul antigripal pe parcursul atât a epidemiilor anuale, cât și a pandemiilor. Astfel, serologia reprezintă un component de valoare în ceea ce privește pregătirea activităților de răspuns în caz de pandemie [124-126].

**Metoda imunofluorescentă** de detecție a antigenilor virali reprezintă un test cu o sensibilitate și specificitate înaltă de diagnostic calitativ și diferențiat al infecțiilor respiratorii virale. Acest tip de testare este recomandat pentru investigarea probelor colectate de la pacienți la stadiile incipiente ale infecției (primele 3 zile) cu scopul indicării la momentul oportun a terapiei specifice antivirale și desfășurarea măsurilor profilactice corespunzătoare [123, 124]. Eficacitatea acestei metode depinde, în mare măsură, de calitatea materialului biologic, respectarea regulilor de păstrare și transportare, a procesării ulterioare, precum și de calitatea reactivilor. Metoda imunofluorescentă permite de a identifica *in situ* antigenele virusurilor gripale și ale altor agenți patogeni ale infecțiilor respiratorii virale în celulele infectate în baza localizării lor caracteristice ce se detectează în rezultatul interacțiunii antigenelor virale cu anticorpii antivirali marcați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC). Unul din avantajele acestei metode este simplitatea exclusivă și posibilitatea de a analiza rapid (1-2 ore) materialul clinic cu detectarea unui șir de agenți patogeni, inclusiv virusurile gripale, paragripale, a virusului respirator sincițial, coronavirusurile, adenovirusurile, etc. Însă, dacă este vorba despre investigarea a unui număr mare de probe clinice durata investigației crește respectiv. Cu toate acestea, metoda imunofluorescentă, fiind un test de diagnostic de valoare în infecțiile gripale, deoarece asigură rezultate rapide și relativ exacte, este și o alegere excelentă în cazul confirmării rezultatelor obținute în testul de detecție rapidă a antigenelor gripale [123, 127-130].

**Izolarea virusurilor gripale pe culturi celulare** este una din metodele istorice clasice și la momentul actual rămâne un instrument important necesar de a fi menținut și disponibil în laboratoarele de referință pentru caracterizarea virusurilor gripale circulante și a tulpinilor noi. Propagarea virusurilor pe culturi celulare, de asemenea, este necesară pentru testarea sensibilității la remediile antivirale folosind analiza NAI, care, la rândul ei, are o importanță semnificativă în confirmarea fenotipică a rezistenței și în validarea noilor marcheri ai rezistenței identificați prin analiza de secvențiere [123, 124, 128, 129].

Cu toate că izolarea virusurilor gripale pe culturi celulare (cu identificarea ulterioară a virusurilor prin tehnici imunologice, serologice sau genetice) tradițional considerată drept standard de aur în diagnosticul viral, există câțiva factori necesari de a fi luați în considerație. Fiecare linie de celule de mamifere disponibilă susține replicarea a unui număr limitat de virusuri respiratorii cu valoare clinică [123, 124, 128-130]. Este necesar ca în laborator să fie menținute câteva linii celulare cu scop de a detecta diverși patogeni respiratorii. În baza informațiilor clinico-epidemiologice se selectează o linie celulară specifică pentru fiecare probă în parte. Linia celulară Madin-Darby canine kidney (MDCK), de obicei, este linia de celule preferată pentru cultivarea virusurilor gripale [83]. Izolarea virusurilor gripale pe culturi celulare este una din cele

mai sensibile metode, însă, disponibilitatea și eliberarea rezultatelor necesită câteva (4-5) zile și mai mult (14 zile), deoarece, această metodă prevede monitorizarea dezvoltării efectului citopatic (CPE), determinarea titrului hemaglutinant prin reacția de hemaglutinare (RHA) și apoi identificarea virusurilor prin reacțiile serologice (RHAI). Dezvoltarea CPE, totuși, poate fi cauzată de un șir de virusuri respiratorii și efectul citopatic caracteristic virusurilor gripale nu totdeauna poate fi observat în linia de celule infectate, însă, rezultatul poate fi confirmat sau infirmat prin RHAI folosind hematii de cobai [115, 123, 130].

Cuantificarea fenotipurilor antigenice ale virusurilor gripale se efectuează prin RHAI, care măsoară capacitatea unui antiser de a inhiba aglutinarea hematiilor de către antigenul viral. Cartografia antigenică generează ulterior o reprezentare exactă dimensională profundă a distanțelor antigenice dintre perechile antigen-antiser. În cazul detecției unui nou tip antigenic cu o pondere sporită, compoziția vaccinului, care constă din două tulpini de virus gripal de tip A (H3N2 și H1N1) și o tulpină de tip B, este revăzută pentru a include combinația antigenică respectivă [115, 123, 130].

Unii cercetători au atestat că izolarea virusurilor gripale pe culturi celulare este de o valoare înaltă în anumite situații clinice, cum ar fi: a) caracterizarea ulterioară a tulpinilor de virusuri gripale izolate de la pacienții cu evoluție atipică sau severă a bolii; b) secvențierea tulpinilor cu mutații (de ex.: cu profiluri de topire/melting deplasate) în analizele moleculare; c) confirmarea pe culturi celulare a rezultatelor fals-pozitive suspectate în PCR; d) confirmarea pe culturi celulare a rezultatelor pozitive din PCR pentru localizările neordinare (materialul cadaveric – miocardul, creierul sau alte tipuri de specimene) pentru investigarea cărora metoda moleculară nu este, de obicei, validată și e) diferențierea dintre eliminarea prelungită a acidului nucleic viral și replicarea virală propriu-zisă [124].

**Izolarea virusurilor gripale, de asemenea, poate fi realizată pe ouă embrionate** (10-11 zile) de găină, în cavitățile alantoică și amniotică, care permite obținerea de tulpini cu un titru mai înalt decât pe culturile celulare. Această metodă de izolare a virusurilor gripale având o sensibilitate și o specificitate înalte, la momentul actual, se folosește în laboratoarele de referință ale OMS, în special, pentru prepararea vaccinurilor antigripale, precum și pentru obținerea de virusuri de referință pentru caracterizarea antigenică a tulpinilor de virusuri gripale circulante [123, 124, 128-130].

**Tehnicile de biologie moleculară.** Culturile celulare tot mai mult sunt înlocuite de către tehnicile moleculare ca modalitate de alegere pentru diagnosticul de laborator al gripei în majoritatea laboratoarelor clinice [123, 124, 128-135]. Astfel, analizele moleculare tot mai mult sunt acceptate drept standard de aur ca metodă de diagnostic pentru detecția virusurilor gripale,

datorită vitezei, disponibilității, precum și a versatilității. Cu toate că există mai multe metode de amplificare, majoritatea din analizele moleculare existente, în special, analizele utilizate în laboratoarele clinice, se bazează pe formatul reacției de amplificare PCR. Avantajele reacției PCR față de mai multe metode convenționale de diagnostic pentru gripă bazate pe culturile celulare includ sensibilitatea semnificativ mai înaltă a kit-urilor și timpul de obținere a rezultatelor esențial mai scurt [123, 124, 128-139].

Dezvoltarea analizei moleculare PCR în 1985 a făcut posibil diagnosticul infecțiilor virale prin detecție sensibilă și specifică a acizilor nucleici virali [136]. Tehnicile PCR au fost dezvoltate pentru detecția și subtiparea virusurilor gripale întru obținerea rapidă a rezultatelor diagnosticului. În acest tip de analiză, ARN viral purificat din supernatantul de pe culturile celulare sau din probele clinice este, pentru început, revers transcris în cADN, atât prin intermediul revers transcriptazelor virusului mieloblastozei aviare sau a virusului leucemiei murine Moloney, folosind hexanucleotide randomizate, primeri universali complementar capătului 3' al tuturor vARN gripali sau o secvență specifică de primeri. Utilizarea hexanucleotidelor randomizate sau a primeri-lor universali, în schimbul secvențelor țintă ale primeri-lor specifici are avantajul caracterizat prin sintetizarea cADN din ambele transcripte ARN genomic viral și mARN, crescând, astfel, numărul regiunilor țintă care pot fi amplificate prin PCR. Poate fi utilizată doar o singură rundă de amplificare și specificitatea reacției poate fi confirmată prin hibridizarea cu sonde de produse specifice. Alternativ, setul nested-primer poate fi utilizat pentru amplificarea regiunii țintă [136, 140].

Alegerea genelor țintă este influențată de aplicarea prospectivă a acestei analize. Pentru diagnosticul specific tipului de infecție gripală A, B sau C se alege, de obicei, genele interne cum ar fi nucleoproteina (NP) și genele matrix (M), deoarece ele sunt înalt conservate în cadrul tipurilor de gripă. Când este necesară informația despre subtipul virusului gripal, atunci devin țintă genele ce codifică antigenele de suprafață. Utilizarea reacției PCR multisegmentate folosind primeri complementar capătului 5' terminal a 13 nucleotide conservate și capătului 3' terminal a 12 nucleotide permite detecția tuturor segmentelor într-o singură reacție. Mai mult ca atât, seturile de primeri bazat pe secvențele terminale a 15 și 21 de nucleotide permit amplificarea specifică a fiecărui segment ARN din cele 8, precum și analiza ulterioară a celor 16 subtipuri de HA și 9 subtipuri de NA ale virusului gripal A. Majoritatea testelor de diagnostic molecular existente pentru virusurilor gripale A se bazează pe detecția și tipizarea exclusiv a genelor HA cu posibilitatea efectuării doar în anumite laboratoare a analizei antigenice și genetice a genei NA [123, 124, 132-136, 140, 141].



Testele moleculare au mai multe avantaje importante față de culturile celulare. Unul din cele mai importante avantaje este viteza. Majoritatea testelor moleculare pot fi efectuate foarte rapid și clinicienii deseori pot pune diagnosticul timp de 2-24 ore de la colectarea probei biologice. Acest timp rapid de procesare al eșantionului este mult mai probabil să fie util în direcționarea terapiei aplicate pacientului față de testul pe culturile celulare în care rezultatul poate să nu fie cunoscut practic până la însănătoșire. Un alt avantaj este sensibilitatea, multe metode moleculare pot detecta fragmente de ARN/ADN ale agenților patogeni ținând de mărimea de câteva ori mai mici față de agenții patogeni ce pot fi detectați pe culturile celulare. În plus, se poate menționa faptul că o creștere semnificativă a sensibilității poate aduce după sine și anumite dezavantaje [132, 136, 137, 138].

Alte caracteristici suplimentare valoroase ale analizei moleculare bazate pe reacția PCR includ: a) posibilitatea de testare concomitentă a mai multor gene țintă și astfel asigurând cu informație ce ține de tipul și subtipul virusului gripal, detecția altor virusuri respiratorii ce se suprapun sezonului epidemic de gripă, precum și detecția coinfecțiilor cu virusuri gripale; b) posibilitatea de implementare a platformelor automate și de transfer înalt ce au un potențial de testare a unui număr mare de probe clinice și necesită mai puțin timp și c) posibilitatea de a fi adaptată pentru detecția unor noi gene țintă. Aceste caracteristici, de facto, au jucat un rol impunător în timpul declanșării pandemiei din 2009. Totuși, pandemia recentă poate servi drept o oportunitate pentru reexaminarea rezervelor față de analiza PCR și a platformelor existente la moment și pentru revizuirea schimbărilor ce necesită a fi efectuate întru implementarea acestei metode într-un număr mai mare de laboratoare, precum și un alt potențial local de utilizare cu diferit nivel de aptitudini tehnice, fapt ce poate duce ulterior la îmbunătățirea tehnologiei, fapt care va facilita sporirea utilizării analizei moleculare, în special, în epidemii și pandemii [124, 139].

Pandemia de gripă cu noul virus gripal A(H1N1)pdm09 a introdus modificări semnificative în prezentarea aspectelor atât clinice, cât și epidemiologice ale infecțiilor respiratorii virale [115, 142]. În acest context, anume aplicarea acestor tehnici de ultimă generație: PCR cu revers transcriere, PCR cu revers transcriere în timp real, precum și alte metode de amplificare bazate pe secvențierea acizilor nucleici au sporit enorm capacitatea de supraveghere și, inclusiv, de caracterizare a virusurilor gripale aflate în circulație [143-145].

Investigația de laborator are o importanță deosebită în gripă, dat fiind variabilitatea redutabilă a virusurilor gripale și implicația acesteia în severitatea infecției și mai ales în manifestările ei epidemice și pandemice.

Obiectivele diagnosticului de laborator al gripei constau în: detecția precoce a variantelor cu potențial epidemic și pandemic; intervenția eficientă în regim de urgență în focare cu potențial de dezvoltare epidemică și/sau pandemică (izolare/internare); instituirea în timp util (48 ore) a unui tratament antiviral la cazurile severe și instituirea chimioprofilaxiei la contactii acestora; selectarea tulpinilor pentru prepararea unor vaccinuri eficiente în concordanță cu evoluția virusurilor gripale la antivirale; urmărirea eficienței vaccinării antigripale și a strategiilor vaccinale populaționale, precum și dezvoltarea de noi vaccinuri și antivirale.

#### **1.4 Concluzii la capitolul I**

1. Capacitatea unică a virusurilor gripale la variabilitate prin intermediul mutațiilor, recombinărilor și reasortărilor genetice, conduce, de fapt, la modificarea proprietăților biologice ale virusurilor gripale și este cauza unei răspândiri parțial controlate a infecției gripale, datorită unei transmisibilități inestimabile. Indiferent de succesele în formularea și crearea vaccinurilor, substanțelor cu efect chimioprofilactic și de tratament, epidemiile de gripă anual se extind peste țări și periodic se pot transforma în pandemii afectând populația tuturor continentelor. Aceste particularități rezultă într-un impact de talie globală a infecției gripale ce afectează un procent considerabil de persoane, cauzând sporirea nivelului de mortalitate cu un impact negativ socio-economic considerabil.

2. Variația antigenică este particularitatea fundamentală a virusurilor gripale A și B, care are loc la nivelul antigenelor de suprafață HA și NA, reprezentând astfel, un mecanism evolutiv de adaptare a virusurilor pentru asigurarea supraviețuirii lor ca specie. O semnificație epidemică și, respectiv, pandemică considerabilă pentru umanitate, pe parcursul studierii virusurilor gripale au avut-o subtipurile de virusuri gripale A: A(H1N1), A(H2N2) și A(H3N2).

3. Drift-ul antigenic – variația antigenică minoră – se întâlnește la toate tipurile de virusuri gripale și apare în rezultatul mutațiilor punctiforme în genomul viral, ceea ce conduce la modificarea proteinelor determinanților antigenici până la pierderea capacității de recunoaștere de către sistemul imun al gazdei. Variațiile antigenice de tip drift ale virusurilor gripale A și B apar și domină timp de 2-5 ani și numai după aceasta se transformă într-o diversitate antigenică mai extinsă.

4. Shift-ul antigenic – variația antigenică majoră – produs al reasortării genelor virale este cauza apariției pandemiilor la un interval de 10-40 de ani, deoarece similaritatea genofondului virusurilor gripale de tip A umane și ale altor specii de mamifere și păsări în biosferă acordă o actualitate deosebită fenomenului de participare a virusurilor gripale animale și aviare în formarea variantelor pandemice. În rezultatul unui asemenea shift antigenic a apărut în circulație virusul gripal A(H1N1)pdm09 care a condus la declanșarea unei pandemii moderate în perioada

2009-2010 soldate doar în regiunea europeană cu 4572 cazuri de deces confirmate numai de laborator.

5. Caracteristica antigenică și genotipică a tulpinilor de virusuri gripale, prin posibilitatea detecției diferitor mutații genetice cu diverse efecte antigenice: asupra proprietăților de transmisie, asupra sensibilității la antivirale permite evidențierea mecanismelor de bază ale evoluției virusurilor gripale. Acestea, la rândul lor, aduc un aport semnificativ în prognozarea epidemiilor, severității lor, în utilizarea adecvată a remediilor antivirale, precum și în formularea cocktailurilor de vaccinuri antigripale.

6. Optimizarea diagnosticului de laborator prin implementarea tehnicilor de biologie moleculară (rRT-PCR) permite evidențierea particularităților noi de răspândire a infecțiilor gripale și de rând cu informația despre supravegherea epidemiologică oferă specialiștilor instrumente suplimentare facilitând monitorizarea circulației virusurilor gripale, gestionarea cazurilor de boală prin administrarea tratamentului antiviral adecvat, precum și implementarea strategiilor corespunzătoare de profilaxie ale acestei infecții.

Totalizând cele expuse, se poate constata că aceste probleme sunt comune și pentru Republica Moldova fiind necesar de a elabora și implementa strategii de reducere a riscului de răspândire a IRVA, inclusiv a gripei prin aplicarea unor programe de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică ale acestor infecții întru reducerea impactului atât asupra sistemului de sănătate, cât și asupra economiei naționale.

Premisele definitive au stat la baza inițierii acestui studiu și îi va permite autoarei să scoată în evidență problemele care necesită a fi de soluționate.

Analiza situației din domeniu a permis de a desemna **scopul lucrării**: studierea și evaluarea caracteristicilor antigenice, fenotipice și genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în perioadele pandemică și interepidemică în Republica Moldova întru argumentarea măsurilor de sănătate cu optimizarea sistemului național de supraveghere epidemiologică și virusologică a gripei.

Pentru realizarea scopului au fost propuse următoarele **obiective**: determinarea și evaluarea tipurilor și subtipurilor de virusuri gripale evidențiate în perioadele de studiu; studierea și evaluarea particularităților antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale în perioadele pandemică și interepidemică; studierea și evaluarea particularităților genetice ale tulpinilor de virusuri gripale A și B în baza genelor HA și NA în perioadele precăutate în studiu; analiza caracteristicilor fenotipice cu evaluarea sensibilității tulpinilor de virusuri gripale la remediile antivirale de ultimă generație (oseltamivir, zanamivir) în perioadele evidențiate; Valorificarea rezultatelor obținute întru optimizarea supravegherii epidemiologice și virusologice a gripei.

## 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările științifice prezentate în lucrare au fost efectuate de către autoare în perioada anilor 2008-2014 în laboratorul Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale, Centrul Controlul Bolilor virale al Centrului Național de Sănătate Publică în colaborare cu CSP teritoriale, IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase de Copii, IMSP Spitalul Clinic Municipal de Copii Nr. 1, IMSP Spitalul Clinic de Boli Infecțioase „T. Ciorbă”, Chișinău, Republica Moldova, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie „Cantacuzino”, București, România, Institutul Național de Cercetări în Medicină, Londra, Marea Britanie.

### 2.1. Liniaritatea cercetărilor și obiectul de studiu

Liniaritatea cercetărilor a inclus următoarele procedee: studierea surselor bibliografice naționale și internaționale la tema tezei; stabilirea obiectivelor și scoaterea în evidență a problemelor; determinarea eșantionului de studiu și a volumului investigațiilor; realizarea cercetării; evaluarea datelor; prelucrarea statistică și interpretarea rezultatelor obținute; implementarea în practică.

Drept obiect de studiu a servit materialul biologic (exsudate nazo-faringiene) din probele colectate de la persoanele cu diagnosticul prezumtiv de gripă, infecție respiratorie virală acută (IRVA) și infecție respiratorie acută severă (SARI, inclusiv pneumonie, bronhopneumonie, bronșiolită acută etc.) recepționate și **codificate** în laboratorul Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale, Centrul Controlul Bolilor virale al Centrului Național de Sănătate Publică.

În acest context, este necesar de menționat că pacienții nu au fost supuși riscurilor deoarece probele cu material biologic au fost colectate în IMSP teritoriale de către personal instruit, în baza acordului informat (Ordinul Ministerului Sănătății nr. 303 din 06.05.2010, Anexa 3), ținându-se cont de normele eticii și deontologiei medicale. De asemenea, de către autor a fost semnat Angajament de confidențialitate cu CNSP. Rezultatele investigațiilor de laborator prin utilizarea tehnicilor de biologie moleculară de ultimă generație au stat la baza confirmării diagnosticului clinic și argumentării inițierii tratamentului antiviral.

Colectarea, păstrarea, transportarea și procesarea probelor cu material biologic au fost efectuate în conformitate cu recomandările OMS privind diagnosticul de laborator la gripă, cu utilizarea manualelor, ghidurilor metodice și a instrucțiunilor în vigoare [130, 132, 146-149].

### 2.2. Metodele de cercetare aplicate și volumul investigațiilor

Metodele de cercetare utilizate în acest studiu au fost selectate în conformitate cu metodologia existentă acceptată. Întru realizarea scopului și a obiectivelor propuse în studiu au fost aplicate metode descriptive, virusologice, imunologice, de biologie moleculară, analitice și statistice.

## **Metode descriptive**

Pe parcursul efectuării cercetărilor științifice au fost studiate cca 500 surse bibliografice din care au fost selectate 191 referințe relevante de specialitate de talie națională și internațională care reflectă dezvoltarea metodelor de diagnostic la gripă, IRVA și SARI, precum și studierea aprofundată a tulpinilor de virusuri gripale aflate în circulație. Au fost evaluate, în special, caracteristicile antigenice, fenotipice și genotipice ale virusurilor gripale și metodele aplicate întru evidențierea particularităților etiologice ale lor. În studiu au fost accentuate avantajele și dezavantajele metodelor folosite la detectarea și identificarea virusurilor gripale.

## **Metode virusologice**

**Cultivarea pe culturi celulare.** În realizarea studiului au fost folosite culturile celulare MDCK (Madin-Darby canine kidney) și MDCK-SIAT1 (celule MDCK modificate prin transfecție cu cADN al 2,6-sialiltransferazei (SIAT1) umane) – linii celulare continue. MDCK a fost descrisă pentru prima dată în anii 1970, care include acidul sialic linkat atât  $\alpha$ -(2,3), cât și  $\alpha$ -(2,6) galactoză pe suprafața celulară [91]. Linia celulară MDCK-SIAT1 a fost folosită și descrisă pentru prima dată în anul 2003 [92]. Culturile celulare nominalizate au fost utilizate pentru identificarea virusurilor prin apariția și evaluarea efectului citopatic, titrarea virusurilor în reacția de hemaglutinare (RHA), determinarea apartenenței liniare și a caracteristicilor antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate în reacția RHA. Celulele au fost cultivate în medii de cultură DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) cu conținut înalt de glucoză, L-glutamină și suplimentate cu ser fetal bovin (10%), antibiotice (100 U/ml penicilină, 100  $\mu$ g/ml streptomycină), albumină bovină fracția V 7,5% (0,2%) și soluție HEPES 1M (25 mM) [130, 135, 146, 150-153].

Pasajul celulelor MDCK a fost efectuat în flacoane Flasc T-25 prin eliberarea flaconului cu monostrat confluent de celule de mediu, spălarea de 2 ori cu câte 5 ml soluție de tripsină 0,05% încălzită în prealabil până la t-37°C, adăugarea a 1 ml soluție de tripsină 0,05%, incubarea la t-37°C timp de 5-7 minute prin urmăriri frecvente a detașării celulelor de baza flaconului. După detașarea definitivă a celulelor conținutul flaconului s-a suplimentat 8 ml de mediu DMEM în prealabil încălzit până la t-37°C. Suspensia de celule s-a pipetat pentru detașarea celulelor și evitarea formării conglomeratelor celulare. În rezultat a fost pregătită suspensia celulară cu un conținut de aproximativ  $10^7$  celule. Concomitent s-a pregătit numărul necesar de eprubete sau flacoane Flasc T-25 în dependență de numărul de probe pregătite pentru izolare cu 9 ml mediu DMEM încălzit, în care s-au distribuit cca 1-1,2 ml de suspensie celulară (pentru infectarea în ziua următoare). Pentru pasajul normal al celulelor în flaconul cu 9 ml mediu s-au transferat 0,3 ml suspensie celulară nediluată, fiecare pasaj următor a fost făcut la un interval de 2-3 zile.

Flacoanele pentru pasarea celulelor, precum și pentru infectare s-au amplasat în termostat la t-37°C cu aerăție și o concentrație de CO<sub>2</sub> de 5% [130, 146].

Tehnica pasajului celulelor MDCK-SIAT1 a fost similară cu cea a celulelor MDCK, însă mediul DMEM pentru aceste celule s-a suplimentat cu soluție de geneticină (G418) 1,0 mg/ml în loc de mixul de antibiotice penicilină-streptomicină [130, 146, 151].

Infectarea liniilor celulare s-a efectuat în flacoanele cu monostrat confluent de celule prin: spălarea de 2 ori a monostratului cu mediu DMEM fără albumină și ser fetal bovin, încălzit în prealabil până la t-37°C, inocularea a 500 μl probă (pozitivă în reacția de detecție a ARN virusurilor gripale rRT-PCR) per flacon T-25, incubarea timp de 30-45 minute la temperatura camerei 22-24°C, și adăugarea, la expirarea timpului, cu 9 ml soluție DMEM cu conținut de tripsină TPCK-tratată în volum de 1 ml (concentrația 0,5 mg/ml) la 200 ml mediu, întru stimularea reproducerii virusurilor. Flacoanele marcate s-au plasat în termostat la t-34°C cu aerăție și o concentrație de CO<sub>2</sub> de 5% pentru 72 ore, cu urmărirea zilnică a apariției efectului citopatic [130, 146, 151-155].

Titurarea virusurilor s-a efectuat la 72 ore de la infectare în reacția de hemaglutinare pe plăci cu 96 godeuri (forma U) cu distribuția în godeuri, în afară de prima coloană, a 50 μl soluție-tampon fosfat salin (PBS), adăugarea în godeul 1 a 100 μl de virus cu titrarea lui prin preluarea și transferarea a 50 μl de virus din godeul 1 cu diluția dublă a lui în serie. Ulterior, în toate godeurile s-au adăugat câte 50 μl de hematii (au fost utilizate hematii de cocoș, curcan – expoziția 30 minute, hematii de cobai și hematii umane O (I) Rh<sup>+</sup> - expoziția 60 minute) (Figura 2.1). Titrurile estimate au fost 1:1, 1:2, 1:4, ..., 1:2048.

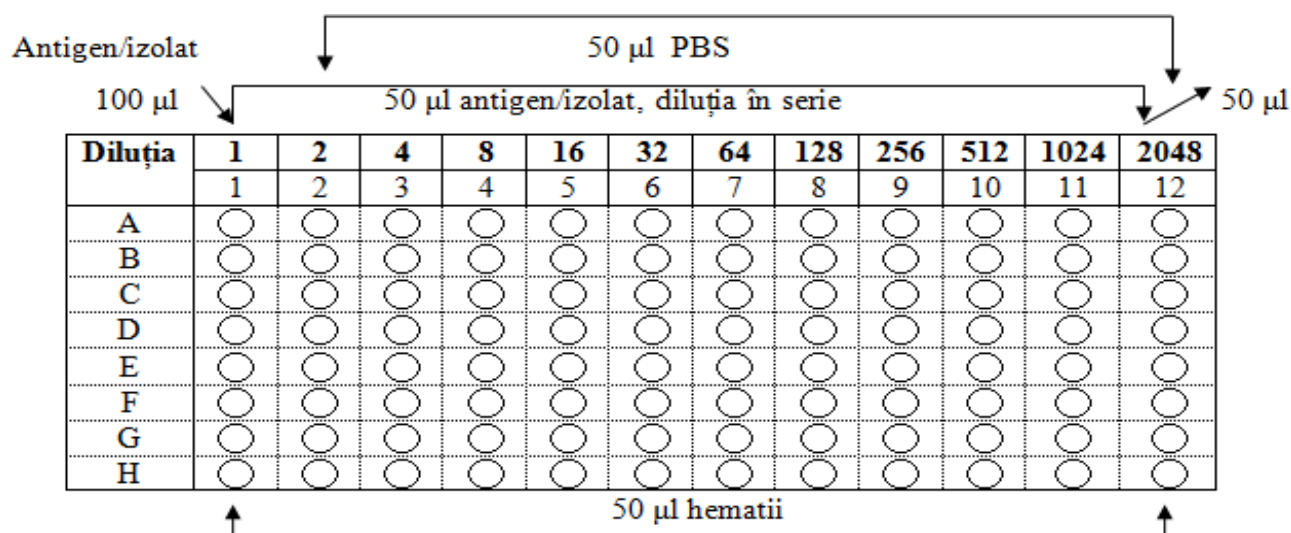










Fig. 2.1. Schema realizării reacției de hemaglutinare (titrarea virusurilor/antigenelor)

În godeurile unde a avut loc sedimentarea hematiilor – s-a citit negativ, unde nu a avut loc sedimentarea hematiilor – pozitiv cu înregistrarea titrului respectiv (ex. T8, sau T16, sau T32 etc.) (Tabelul 2.1) [130, 146, 154, 155].

Tabelul 2.1. Particularitățile hematiilor utilizate în reacțiile HA și HAI.

	Aviare		Mamifere	
	Cocoș	Curcan	Cobai	Umane O(I) Rh <sup>+</sup>
Concentrația	0,75%	0,75%	1%	1%
Tipul plăcii	godeuri V	godeuri V	godeuri U	godeuri U
Expoziția	30 min	30 min	60 min	60 min
Aspectul final	buton*	buton*	aureolă	aureolă
Aglutinare completă				
Aglutinare parțială				
Lipsa aglutinării				
Lipsa aglutinării, prelingerea hematiilor				

\*Hematiile se preling la înclinarea plăcii.

Determinarea apartenenței liniare și a caracteristicilor antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate s-a efectuat prin RHAI, cu utilizarea antigenelor virusurilor de referință și a antiserurilor lor. Identificarea și caracteristica antigenică a virusurilor gripale A(H1N1)pdm a fost posibilă cu utilizarea antigenelor virusurilor de referință A/New Jersey/8/76, A/California/4/2009, A/California/7/2009, A/England/195/2009, A/Auckland/3/2009, A/Bayern/69/2009, A/Lviv/N6/2009, A/HK/2212/2010, A/Christchurch/16/2010 și a antiserurilor respective în perioadele pandemică și post-pandemică.

Identificarea și caracteristica antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) s-a realizat cu utilizarea antigenelor virusurilor de referință A/Wisconsin/67/2005, A/Trieste/25c/2007, A/Wisconsin/3/2007, A/Brisbane/10/2007, A/Uruguay/716/2007, A/Finland/9/2008, A/Johannesburg/15/2008, A/England/394/2008, A/Brisbane/24/2008 și a antiserurilor respective

în perioada pre-pandemică, a virusurilor de referință A/Perth/16/2009, A/Victoria/208/2009, A/Alabama/5/2010, A/Stockholm/18/2011, A/Iowa/19/2010, A/Victoria/361/2011, A/Berlin/93/2011, A/Victoria/361/2011, A/Athens/112/2012, A/Texas/50/2012, A/Hawaii/22/2012, A/Samara/73/2013, A/Serbia/NS-210/2013, A/Hong Kong/146/2013, NIB-85 (A/Almaty/2958/2013) și a antiserurilor respective în perioada post-pandemică.

Identificarea și caracteristica antigenică a virusurilor gripale de tip B s-a efectuat cu utilizarea antigenelor virusurilor de referință B/Shandong/7/97, B/Brisbane/32/2002, B/HK/45/2005, B/Malaysia/2506/2004, B/Victoria/304/2006, B/England/393/2008, B/Brisbane/33/2008, B/Brisbane/60/2008, B/Paris/1762/2008, B/Hong Kong/514/2009, B/Odessa/3886/2010 – linia B/Victoria și a antiserurilor respective în perioada pre-pandemică, și a virusurilor de referință B/Florida/4/2006, B/Brisbane/3/2007, B/Wisconsin/1/2010, B/Stockholm/12/2011, B/Estonia/55669/2011, B/Novosibirsk/1/2012, B/Hong Kong/3577/2012, B/Massachusetts/02/2012 – linia B/Yamagata și a antiserurilor respective în perioada post-pandemică [154, 156, 157]. Trusele cu virusurile de referință și antiserurile lor au fost oferite de către CDC în baza Rețelei Mondiale de Supraveghere a Gripei, OMS [130].

Pentru realizarea RHAİ s-au pregătit dozele de lucru ale antigenelor și ale virusurilor izolate (doza de lucru se consideră titrul antigenelor și izolatelor de virusuri gripale T4 sau T8, adică 4 HAU sau 8 HAU în dependență de tipul/subtipul virusurilor gripale) (Tabelul 2.2) [130, 146, 154].

Tabelul 2.2. Schema pregătirii dozelor de lucru ale antigenelor și ale virusurilor gripale.

4 HAU (A(H3N2), B)			8 HAU (A(H1N1)pdm)		
Titrul HA	PBS	Virus	Titrul HA	PBS	Virus
8	2 ml	4 ml	8	-	6 ml
16	4 ml	2 ml	16	2 ml	4 ml
32	5 ml	1 ml	32	4 ml	2 ml
64	6 ml	0,5 ml	64	5 ml	1 ml
128	6 ml	0,3 ml	128	6 ml	0,6 ml
256	6 ml	0,15 ml	256	6 ml	0,3 ml
512	6 ml	0,15 ml	512	6 ml	0,15 ml

S-a pregătit numărul necesar de plăci cu 96 godeuri (forma U) în dependență de numărul de antiseruri de referință utilizate în godeurile cărora s-a distribuit a câte 50 μl PBS, apoi în godeurile coloanei H s-a adăugat 50 μl de antiser pentru placa respectivă, după care s-a efectuat diluția antiserului în direcția H → A. În continuare în fiecare rând de godeuri s-a adăugat virusul/antigenul de referință (50 μl) respectiv antiserului utilizat în reacție, plăcile s-au incubat



la temperatura camerei 22-24°C timp de 30 minute. La expirarea timpului în toate godeurile/plăcile s-au distribuit 50 µl de hematii cu timpul de incubare respectiv hematiilor utilizate (Figura 2.2). Testele realizate au permis de a identifica și evalua caracteristicile antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate în Republica Moldova [130, 146, 154-157].

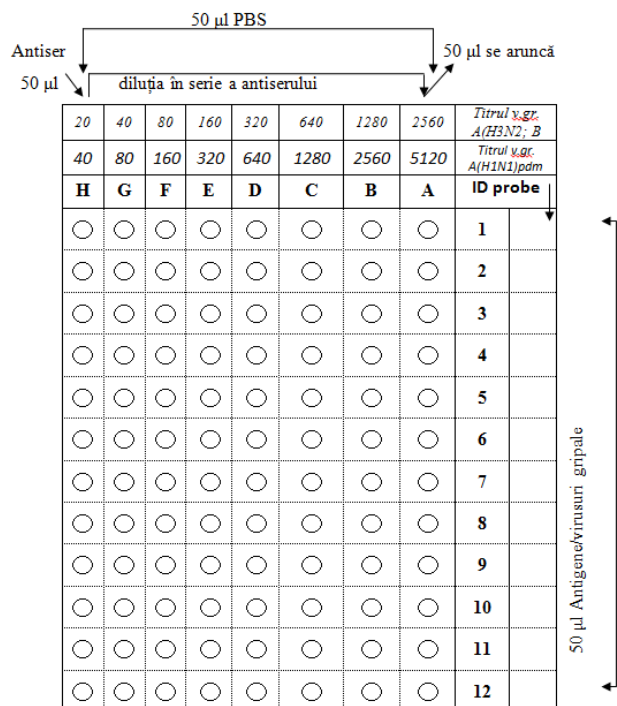


Fig. 2.2. Pregătirea plăcilor pentru reacția HAI și interpretarea rezultatelor.

### Metode imunologice

**Metoda imunofluorescentă.** Pentru depistarea antigenelor virusurilor gripale prin imunofluorescență directă s-au utilizat anticorpi monoclonali contra antigenelor virale cuplați cu FITC. Anticorpii monoclonali utilizați (anti-A(H1N1) sezonier, anti-A(H3N2) și anti-B) reprezintă produse de diagnostic de laborator pentru gripă, fabricate de Institutul de gripă, Sanct-Petersburg [95]. Reacția imunofluorescentă a fost efectuată pe lamele de sticlă cu aplicarea a câte o picătură probă (celule epiteliale sedimentate prin centrifugare 1500 rot/min timp de 10 min), uscarea la temperatura camerei, fixarea în acetonă răcită în prealabil (2-8°C) timp de 10 min, uscarea la temperatura camerei, pe frotiul fixat s-a aplicat câte 50 µl imunoglobuline fluorescente reconstituite, lamelele s-au incubat în camera umedă timp de 30 min la t - +16 - +20°C. Evaluarea și interpretarea rezultatelor s-a efectuat în conformitate cu recomandările OMS și instrucțiunile de lucru anexate la trusă, la microscopul luminiscent binocular Leica 2500 DM, Germania, obiectivul de imersie HI PLAN 20x/0.40 SL, oculare HC PLAN s 10x/22 M, filtre albastru-mauve cu utilizarea uleiului de imersie nefluorescent [130, 159].

**Analiza fluorescentă de inhibare a neuraminidazei (MUNANA) – caracteristica fenotipică** - a fost efectuată cu scopul determinării susceptibilității virusurilor gripale circulante la inhibitorii neuraminidazei – oseltamivir și zanamivir, remedii antivirale de ultimă generație. La moment sunt licențiate și disponibile două medicamente antivirale (oseltamivir și zanamivir) cu acțiune directă asupra neuraminidazei virale. Apariția tulpinilor rezistente la oseltamivir printre virusurile sezoniere H1N1 circulante peste tot în lume, la sfârșitul anului 2007 și începutul anului 2008 a făcut imperativă desfășurarea activităților de supraveghere privind susceptibilitatea inhibitorilor de neuraminidază a virusurilor gripale circulante la nivel mondial. Activitatea NA și susceptibilitatea la antivirale poate fi măsurată prin utilizarea substratului fluorescent – MUNANA (acidul 2'-*(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminic*). Efectuarea investigației în prezența inhibitorilor, și anume, determinarea diluției optime a virusului utilizat pentru standardizarea activității NA la măsurarea valorilor IC<sub>50</sub> ale inhibitorilor NA, permite de a determina concentrația preparatului antiviral necesar de a inhiba activitatea enzimei cu 50% (TECAN-spectrophotometer, programul GraFit 6.0, MUNANA Assay) [101, 107, 130, 146].

**Metoda molecular biologică.** Reacția de polimerizare în lanț (PCR) reprezintă o tehnică utilizată pentru amplificarea regiunilor specifice de ADN de la un nivel foarte mic de ADN-matrice. Reacția PCR cu revers transcriere (RT-PCR) este o extensie a acestei tehnici care permite obținerea din ARN a ADN, prin reacția de revers-transcriere a moleculelor de ARN se obțin fragmente de ADN complementar (cADN), care ulterior poate fi supus amplificării. Mai mult ca atât, există un șir de metode ce folosesc coloranți fluorescenți pentru detecția sau cuantificarea în timp real a procesului de amplificare a ADN în PCR.

Astfel, în studiul de față a fost folosită metoda RT-PCR în timp real (rRT-PCR), care prin utilizarea fluoroforului SYBR Green, a permis detecția în timp real a ARN virusurilor gripale în materialul biologic cercetat. Pentru realizarea acestei metode, materialul clinic a fost procesat primar în conformitate cu recomandările OMS, instrucțiunile în vigoare, cu regulile naționale de biosecuritate, în hote de biosecuritate de clasa 2+ (BSL 2+), urmând etapa de extracție a ARN viral din materialul biologic în condiții și cu consumabile libere de nucleaze (ARN-aze, ADN-aze). Concomitent s-a pregătit Mixul de reacție: mixul de primeri folosiți în reacția de amplificare genică, care era compus din Apă Deionizată liberă de nucleaze (5,5  $\mu$ l/probă), Forward Primer (0,5  $\mu$ l/probă), Revers Primer (0,5  $\mu$ l/probă), Proba-țintă (0,5  $\mu$ l/probă) – componenții Forward Primer, Revers Primer și Proba-țintă au fost specifici fiecărui tip/subtip de virus gripal (A, A/H1pdm, A/H3, B); Enzima Ambion AgPath 25x RT-PCR Enzyme Mix (1  $\mu$ l/probă) și Soluție-tampon 2X RT-PCR Mix (12,5  $\mu$ l/probă). Volumul total al reacției per probă a fost 20  $\mu$ l, la care s-au adăugat 5  $\mu$ l extract ARN de la proba de cercetat – volumul final pentru

amplificare 25 µl. Toate manipulațiile la etapele menționate s-au efectuat pe stative reci [130, 132, 134, 146, 147, 154-158, 160].

Pentru trusa Ambion AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit s-a folosit următoarea schemă de lucru:

<b>Reactivii</b>	<b>Volumul de reactivi/ per o reacție</b>	
<b>Apă liberă de nucleaze (Nuclease-free Water)</b>	<b>N x 5,0 µl</b>	
Forward Primer	N x 0,5 µl	N x 1,5 µl
Reverse Primer	N x 0,5 µl	
Probe	N x 0,5 µl	
<b>AgPath 25x RT-PCR Enzyme Mix</b>	<b>N x 1,0 µl</b>	
2X RT-PCR Buffer	N x 12,5 µl	
<b>Volumul total</b>	<b>N x 20,0 µl</b>	

Condițiile de amplificare rRT-PCR s-au realizat prin programarea amplificatorului în modul următor:

Trusa Ambion AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit

Revers Transcripția	50°C pentru 30 min
Activarea inhibitorului <i>Taq</i>	<b>95°C pentru 10 min</b>
Amplificarea PCR (45 cicluri)	95°C pentru 15 sec 55°C pentru 30 sec*

\* Fluorescența (FAM, SYBR green) s-a citit la etapa de incubare de 55°C.

Procesul de amplificare a constat din posibilitatea de revers transcriere a fragmentelor de ARN în cADN și începerea imediată a multiplicării fragmentelor de ADN de pe cADN, în aceleași tuburi, în același echipament. Amplificarea propriu-zisă a fost efectuată la echipamentele: Corbett Research Rotor – Gene 6000, Australia – cu citire laterală prin pereții tuburilor, CFX 96 Real Time System, BioRad, USA – cu citire prin capacul tubului. Interpretarea rezultatelor a fost efectuată prin programele Rotor-Gene 6000 version 1.8 și Bio-Rad CFX Manager, respectiv. Trusele de primeri folosite au fost oferite de către CDC în baza Rețelei Mondiale de Supraveghere a Gripei, OMS, iar pentru extracția ARN viral au fost utilizate truse omologate și înregistrate în Republica Moldova [130, 132, 134, 146, 147, 154-157, 160].

Pe parcursul acestui studiu au fost rezolvate totalmente (100%) 8 paneele de Control Extern de Calitate privind detecția virusurilor gripale A și B prin PCR organizat de către Centre for Health Protection, Department of Health, The Government of Hong Kong Special

Administrative Region, cu suportul OMS și 2 paneele de Control extern de calitate CDC Influenza Molecular Diagnostic Performance Evaluation, Atlanta, Georgia, USA.

**Electroforeza în gel de agaroză.** Electroforeza este o tehnică analitică utilizată la pentru separarea fragmentelor de ADN în dependență de mărime. Câmpul electric format dintre firele de cation și anion forțează fragmentele de ADN să migreze prin gel. Moleculele de ADN migrează, de obicei, de la polul cu potențial negativ spre cel cu potențial pozitiv datorită încărcăturii negative nete a șirului de fosfați din lanțul moleculei de ADN. Moleculele de mărime mai mari migrează foarte încet astfel ele să fie prinse mult mai ușor în rețea. Produsul amplificat a fost plasat în gel de agaroză de 1% (cu conținut de 0,5 μg/ml bromură de etidiu și soluție tampon GelPilot DNA loading Dye, Qiagen) cu realizarea procesului de electroforeză la 100 W timp de 40 min (Power Pac HV, BioRad). Ulterior, gelul a fost amplasat în transiluminator (Molecular Imager Gel Doc XR, BioRad) și vizualizat în lumină UV cu interpretarea rezultatelor la calculator folosind programul (Quantity One) [130, 132, 134, 146, 147, 154-157, 160].

**Secvențierea.** Principiul acestei metode constă în identificarea tuturor secvențelor genelor HA și NA realizată prin purificarea moleculelor de ADN obținute în urma reacției de amplificare a cADN virusurilor gripale, calitatea cărora a fost evaluată în baza rezultatelor obținute de la electroforeza în gel de agaroză. Deci, în studiu au fost luate doar acele probe, ale căror fragmente de ADN s-au prezentat a fi cele mai specifice. ADN purificat a fost transferat pe placa cu 96 godeuri MicroAmp™ Optic (Applied Biosystems) și tratat cu ajutorul componentelor kitului Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) și analizate la secvențiatorul cu capilare ABI-3730XL (Applied Biosystems). Pentru editarea secvențelor obținute și construirea arborilor filogenetici au fost utilizate programele BioEdit și MEGA 5.2 [131].

### **Metode statistice**

Rezultatele obținute au fost supuse unei analize statistice prin utilizarea metodelor general acceptate pentru selectarea eșantioanelor reprezentative pentru studii științifice, inclusiv următoarea formulă [161]:

$$N = \frac{t^2 * p * (1 - p)}{d^2} \quad (2.1)$$

Unde:

N – volumul eșantionului estimat.

t – criteriul t-Student când veridicitatea studiului este de 95% (t=1.96)

p – probabilitatea rezultatului

$d^2$  – precizia dorită (marja de eroare)

Reieșind din calculele efectuate și luând în considerație faptul că numărul populației generale studiate depășește 100000, în studiu a fost luat un eșantion de 9799 probe cu material biologic colectat de la persoanele cu diagnosticul prezumtiv „Gripă”, „IRVA” și „SARI”, ceea ce reprezintă practic un nivel de precizie de  $\pm 1\%$  (dimensiunea eșantionului de 9091), intervalul de încredere 95%,  $p=0,5$ .

Toate rezultatele obținute în urma investigațiilor au fost introduse în baza de date electronice și prelucrate cu ajutorul programelor computerizate Microsoft Excel, BioEdit și MEGA 5.2.

**Volumul investigațiilor.** La calcularea volumului eșantionului de cercetare au fost luate în considerație mai multe aspecte: numărul de probe investigate per an/sezon, pentru metoda de virusologie clasică - probele pozitive cele mai reprezentative (cu cel mai mic Ct din reacția rRT-PCR, gen, vârstă, distribuție geografică) și respectiv numărul de tulpini de virusuri gripale care au fost obținute în urma izolării pe culturi celulare în perioadele pre-pandemică, pandemică, post-pandemică și interepidemică (Tabelul 2.3).

Tab. 2.3. Volumul cercetărilor științifice efectuate

Nr. d/o	Denumirea cercetărilor	Numărul de materiale, probe examinate incluse în studiu
1.	Studierea literaturii de specialitate	<u>191</u> surse bibliografice
2.	Evaluarea datelor din registrele de înregistrare a probelor cu material biologic	<u>11</u> registre cu date primare, <u>9799</u> probe codificate
3.	Detecția ARN virusurilor gripale: <ul style="list-style-type: none"> <li>• prin metode serologice: perioada pre-pandemică</li> <li>• prin metode molecular-biologice:               <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ perioada pandemică</li> <li>✓ perioadele post-pandemică, interepidemică</li> </ul> </li> </ul>	<u>456</u> probe cu material biologic  <u>6818</u> probe cu material biologic <u>2525</u> probe cu material biologic
4.	Detecția ARN virusurilor gripale: prin metode virusologice clasice: <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ perioada pre-pandemică</li> <li>✓ perioada pandemică</li> <li>✓ perioadele post-pandemică, interepidemică</li> </ul>	<u>16</u> izolate de virusuri gripale <u>34</u> izolate de virusuri gripale <u>77</u> izolate de virusuri gripale
5.	Caracteristica antigenică a tulpinilor de virusuri gripale izolate în perioadele pre-pandemică, pandemică, post-pandemică și interepidemică prin metode virusologice clasice	<u>127</u> tulpini de virusuri gripale
6.	Caracteristica genotipică a tulpinilor de virusuri gripale izolate în perioadele pre-pandemică, pandemică, post-pandemică și interepidemică prin metode moleculare (secvențiere)	<u>78</u> tulpini de virusuri gripale pentru gena HA <u>71</u> tulpini de virusuri gripale pentru gena NA

### **2.3. Concluzii la capitolul 2**

1. Cercetările au prevăzut un studiu analitic complex și au oferit posibilitatea determinării caracteristicilor antigenice, fenotipice și genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale circulante în Republica Moldova.
2. Întru realizarea scopului și a obiectivelor propuse s-a utilizat un set de metode și procedee metodologice de cercetare adecvate studiului.
3. Obiectele investigate și volumul eșantioanelor sunt reprezentative.
4. Abordările microbiologice, virusologice, molecular-biologice și bio-statistice corespund principiilor și tendințelor actuale de cercetare.
5. De rând cu metodele virusologice clasice, lucrarea a fost completată cu metode contemporane de investigare – tehnici de biologie moleculară de ultimă generație, inclusiv tehnicile de secvențiere cu programe de citire a secvențelor și de construcție, în baza lor, a arborilor filogenetici pentru virusurile gripale izolate și identificate la nivel global și în Republica Moldova, utilizate în premieră în țară.
6. Rezultatele obținute au fost prelucrate utilizând metodele statistice de analiză a datelor.

### 3. STUDIAREA ȘI EVALUAREA TULPINILOR DE VIRUSURI GRIPALE IZOLATE ȘI IDENTIFICATE ÎN PERIOADA PANDEMICĂ

Pentru evidențierea evoluției tulpinilor de virusuri gripale studiul realizat a inclus cercetările efectuate în perioadele pre-pandemică (sezonul epidemic 2008-2009), pandemică (sezonul 2009-2010) și post-pandemică (sezonul epidemic 2010-2011).

#### 3.1. Particularitățile virusurilor gripale în perioada pre-pandemică

În conformitate cu datele din literatura de specialitate, pandemiile de gripă apar la fiecare 10-40 ani și sunt practic imprevizibile. Odată cu declanșarea pandemiei de gripă din sec. XXI în perioada 2009-2010, sezonul epidemic 2008-2009 poate fi considerat drept perioadă pre-pandemică [4-6, 9, 15-18, 20, 22, 23, 25-29, 157, 163].

În perioada pre-pandemică, morbiditatea prin gripă s-a caracterizat printr-o răspândire geografică sporadică, cu o intensitate și tendință scăzută a procesului epidemic și un impact nesemnificativ asupra sistemului de sănătate.

Analiza rezultatelor investigațiilor acestui studiu a demonstrat că gripa, în sezonul epidemic 2008-2009, a fost etiologic cauzată de virusurile gripale A(H3N2), A(H1N1) și B. Astfel, virusul gripal A(H3N2) a fost detectat în 20 (16,1%) de probe cu material biologic și virusul gripal de tip B în 9 (7,3%) probe din totalul de specimene, codificate, cu material biologic colectate la persoanele cu diagnosticul clinic „Gripă” (124/27,2%) (Tabelul 3.1).

Tab. 3.1. Rezultatele identificării antigenelor virusurilor gripale prin imunofluorescență în dependență de diagnosticul clinic, sezonul 2008-2009.

Spectrul virusurilor detectate	Numărul probelor investigate											
	Gripă			IRVA			SARI			Total		
	invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive	
		abs.	%		abs.	%		abs.	%		abs.	%
A(H1N1)	124	-	-	324	2	0,6	8	-	-	456	2	0,4
A(H3N2)	124	20	16,1	324	9	2,8	8	1	12,5	456	30	6,6
B	124	9	7,3	324	6	1,8	8	-	-	456	15	3,3
Total	124	29	23,4	324	17	5,2	8	1	12,5	456	47	10,3

De la persoanele cu diagnosticul clinic IRVA au fost colectate 324 (71,0%) probe, din care 2 (0,6%) – au fost pozitive la prezența antigenelor virusului gripal A(H1N1), 9 (2,8%) – pozitive la prezența antigenelor virusului gripal A(H3N2) și 6 (1,8%) – pozitive la prezența antigenelor virusului gripal de tip B. La persoanele cu diagnosticul clinic SARI a fost identificat

doar antigenul virusului gripal A(H3N2) în 1 (12,5%) probă din totalul de 8 (1,8%) specimene cu material biologic (Tabelul 3.1). Virusurile gripale identificate în perioada nominalizată au avut o pondere de: 63,8% pentru A(H3N2), 32,0% - virusurile gripale de tip B și doar 4,2 % iau revenit virusurilor gripale A(H1N1) sezoniere (Figura 3.1).

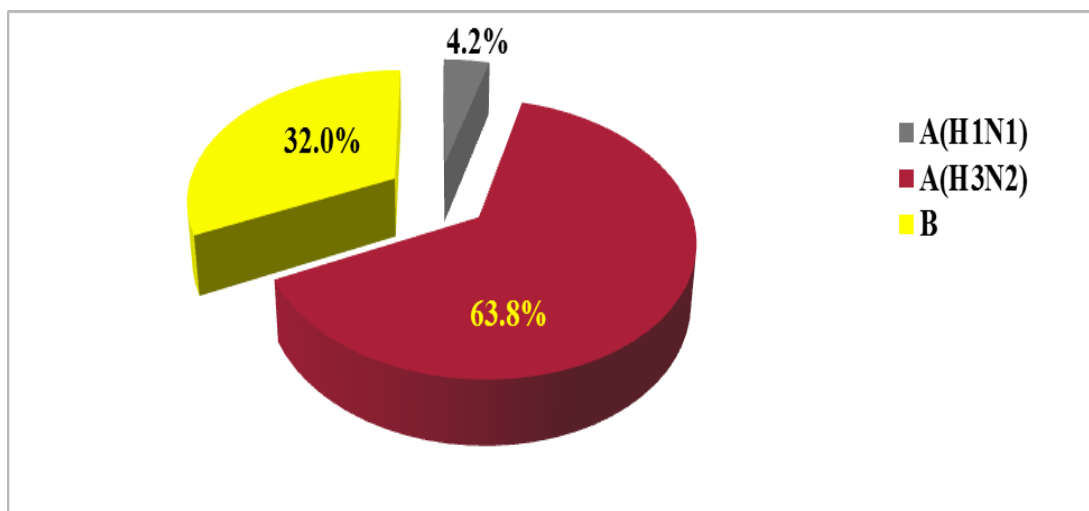


Fig.3.1. Ponderea virusurilor gripale din totalul de probe pozitive detectate în sezonul epidemic 2008-2009.

➤ **Evaluarea particularităților antigenice ale virusurilor gripale**

În perioada nominalizată în culturi celulare MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) au fost izolate 16 tulpini de virusuri gripale A(H3N2), care au avut o reactivitate slabă practic cu toate antiserurile de referință A/Wisconsin/67/2005, A/Trieste/25c/2007, A/Wisconsin/3/2007, A/Brisbane/10/2007, A/Uruguay/716/2007, A/Finland/9/2008, A/Johannesburg/15/2008, A/England/394/2008, A/Brisbane/24/2008. Acest fapt a fost similar tulpinilor virale de referință cu replicare pe MDCK așa ca: A/Trieste/25c/07 și A/Johannesburg/15/08. O reactivitate moderată, tulpinile de virusuri gripale A(H3N2), au prezentat cu antiserul A/Brisbane/10/2007 – tulpină de referință inclusă în coctailul vaccinului antigripal recomandat de OMS pentru sezonul 2009-2010 (Tabelul 3.2). Rezultate similare au fost identificate și pentru alte numeroase tulpini de virus gripal A(H3N2) izolate și identificate în diverse țări ale lumii în această perioadă [157, 164].



Tab. 3.2. Analiza antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) identificate în sezonul epidemic 2008-2009.

Virusuri	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>								
			Seruri de referință (seruri de dihore)								
			A/Wis 67/05 F18/08	A/Trieste 25c/07 F5/07	A/Wis 3/07 F15/07	A/Bris 10/07 F29/08	A/Uru 716/07 F26/08	A/Fin 9/08 F12/08	A/JHB 15/08 F22/08	A/Eng 394/08 F32/08	A/Bris 24/08 F3/09
<b>Virusuri de referință</b>											
A/Wisconsin/67/2005	8/31/2005	SpfCk3E3/3	2560	2560	640	1280	5120	1280	1280	160	2560
A/Trieste/25c/2007	Jan-07	MDCKx2	<	80	160	160	160	80	80	80	80
A/Wisconsin/3/2007	1/21/2007	Ex2	5120	2560	2560	5120	5120	2560	2560	640	2560
A/Brisbane/10/2007	2/6/2007	E2/3	1280	2560	640	1280	2560	2560	1280	320	1280
A/Uruguay/716/2007	6/21/2007	spfc1, 3/1	1280	1280	640	2560	5120	1280	1280	160	1280
A/Finland/9/2008	1/7/2008	MDCK2/1	80	160	160	160	160	320	160	80	160
A/Johannesburg/15/2008	25/06/2008	MDCKx2	80	160	160	160	320	160	160	160	320
A/England/394/2008	9/22/2008	MDCK2/7	80	80	160	160	160	80	160	160	160
A/Brisbane/24/2008	6/23/2008	E5/1	1280	2560	640	640	2560	1280	1280	320	1280
<b>Virusuri testate</b>											
A/Moldova/166/2009	3/4/2009	MDCK2/1	<	<	80	80	80	<	40	80	40
A/Moldova/167/2009	3/4/2009	MDCK2/1	80	80	80	160	160	80	80	80	80
A/Moldova/169/2009	3/4/2009	MDCK2/1	80	80	160	320	160	160	160	160	160
1. < = <40											

În aceeași perioadă, au fost izolate 4 tulpini de virus gripal de tip B, aparținând liniei B/Victoria, care au fost testate cu panelul de seruri de referință B/Shandong/7/97, B/Brisbane/32/2002, B/Hong Kong/45/2005, B/Malaysia/2506/2004, B/Victoria/304/2006, B/England/393/2008, B/Brisbane/33/2008, B/Brisbane/60/2008. Rezultatele testării au atestat că tulpinile izolate antigenic au fost similare cu tulpina B/Shandong/7/97 și cu tulpina virală B/Brisbane/60/08 – tulpină de referință, de asemenea, inclusă în formularea vaccinului antigripal pentru sezonul viitor. Tulpinile de virus gripal B izolate și identificate în Republica Moldova au fost practic similare cu majoritatea tulpinilor de virusuri gripale de tip B izolate în perioada pre-pandemică în diferite părți ale lumii (Tabelul 3.3).

În baza rezultatelor obținute în studiu, atât prin detecția antigenelor virusurilor gripale, cât și prin izolarea, identificarea și caracterizarea antigenică a tulpinilor de virusuri gripale circulante în Republica Moldova, se poate menționa că gripa, în perioada pre-pandemică a fost etiologic cauzată de virusurile gripale A(H3N2), A(H1N1) și B, cu predominarea virusului A(H3N2), tulpinile virale fiind similare cu tulpinile circulante în lume precum și cu variantele de tulpini gripale incluse în componența vaccinului antigripal polivalent recomandat de OMS pentru sezonul 2008-2009.

Tab. 3.3. Analiza antigenică a virusurilor gripale tip B (linia Victoria) identificate în perioada pre-pandemică (sezonul 2008-2009).

Virusuri	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>								
			Seruri de referință (seruri de dihoze)								
			B/Shan <sup>2</sup> 7/97	B/Shan 7/97 F12/02	B/Bris 32/02 F2/03	B/HK 45/05 F15/05	B/Mal 2506/0 4 F28/05	B/Vic 304/06 F16/06	B/Eng 393/08 F31/08	B/Bris 33/08 F1/09	B/Bris 60/08 F2/09
<b>Virusuri de referință</b>											
<b>B/Shandong/7/97</b>		Ex	640	160	80	80	80	80	40	20	80
<b>B/Brisbane/32/2002</b>	7/2/2002	E2 6	640	80	160	80	160	80	40	20	40
<b>B/HK/45/2005</b>	2/7/2005	MDCK2 4	640	160	80	160	320	80	20	20	40
<b>B/Malaysia/2506/2004</b>	12/6/2004	E3 3	320	160	160	80	160	80	40	20	80
<b>B/Victoria/304/2006</b>	6/6/2006	E2 2	320	80	80	80	160	160	40	40	160
<b>B/England/393/2008</b>	29/08/2008	E1 2	160	40	80	<	80	80	160	320	320
<b>B/Brisbane/33/2008</b>	13/07/2008	E3 1	160	80	80	<	80	160	160	320	320
<b>B/Brisbane/60/2008</b>	04/08/2008	E4 1	160	80	80	<	160	160	160	320	320
<b>Virusuri testate</b>											
<b>B/Moldova/168/2009</b>	3/4/2009	MDCK2 1	320	<	<	<	<	<	<	<	320
<b>B/Moldova/173/2009</b>	3/4/2009	MDCK2 1	320	<	<	<	10	<	<	<	320
<b>B/Moldova/174/2009</b>	3/4/2009	MDCK2 1	320	<	<	<	10	<	<	<	320
<b>B/Moldova/175/2009</b>	3/5/2009	MDCK2 1	320	<	<	<	<	<	<	<	320

1. < = <10; 2. Ser hiperimun de oi

### ➤ Evaluarea particularităților genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale

Comparația filogenetică a tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în Republica Moldova în perioada pre-pandemică, în baza arborilor filogenetici globali, a prezentat o similaritate atât antigenică, cât și genetică cu tulpina A/Brisbane/10/2007 – tulpină vaccinală, comparativ cu unele virusuri gripale izolate în alte țări ale lumii care nu au prezentat similaritate tulpinii nominalizate [157, 164].

Astfel, se poate menționa că virusurile gripale A(H3N2), circulante în Republica Moldova în perioada estimată, se includ în grupul genetic atribuit cladei 10 a tulpinii virale A/Brisbane (Figura 3.2). Clada 10 a fost formată, la rândul ei, de secvențele genei HA caracterizate de substituțiile aminoacizilor E62K, N144K, K158N, substituții cu efecte antigenice ne semnificative (Figura 3.3).

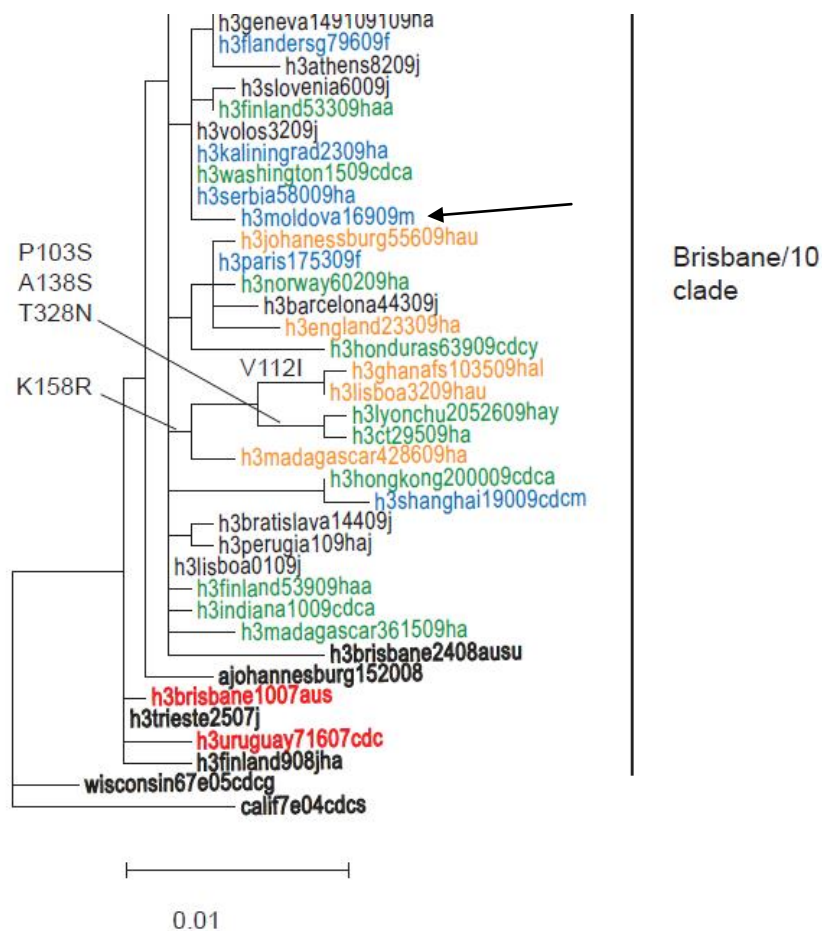


Fig.3.2. Fragment din comparația filogenetică a virusurilor gripale A(H3N2), gena HA, sezonul epidemic 2008-2009 [164].

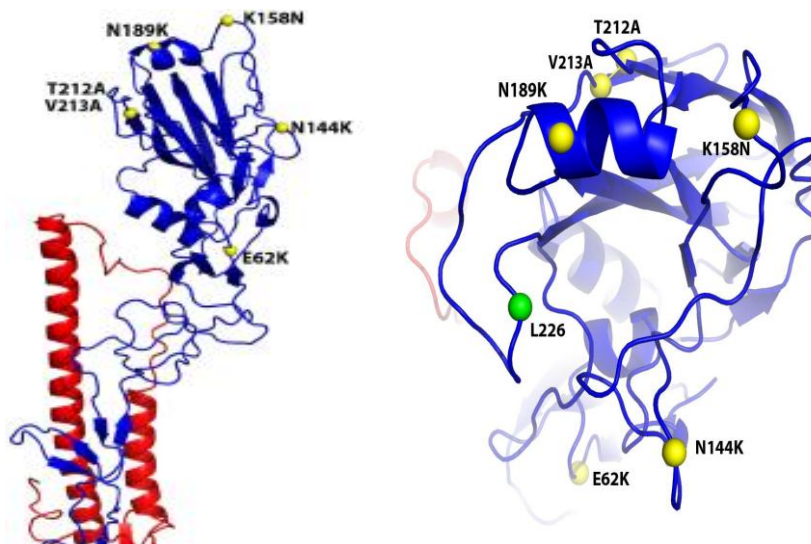


Fig.3.3. Locațiile caracteristice substituțiilor de aminoacizi în gena HA H3 ale virusurilor gripale A(H3N2) [164].

Secvențele genei NA ale virusurilor gripale nominalizate au prezentat așa substituții ca P386H, I464L, care de fapt, nu sunt distinctive pentru a le diferenția de virusurile din clada 10

similare tulpinii A/Brisbane/10/2007 și, ca urmare, poartă caracteristici antigenice ne semnificative (Figura 3.4).

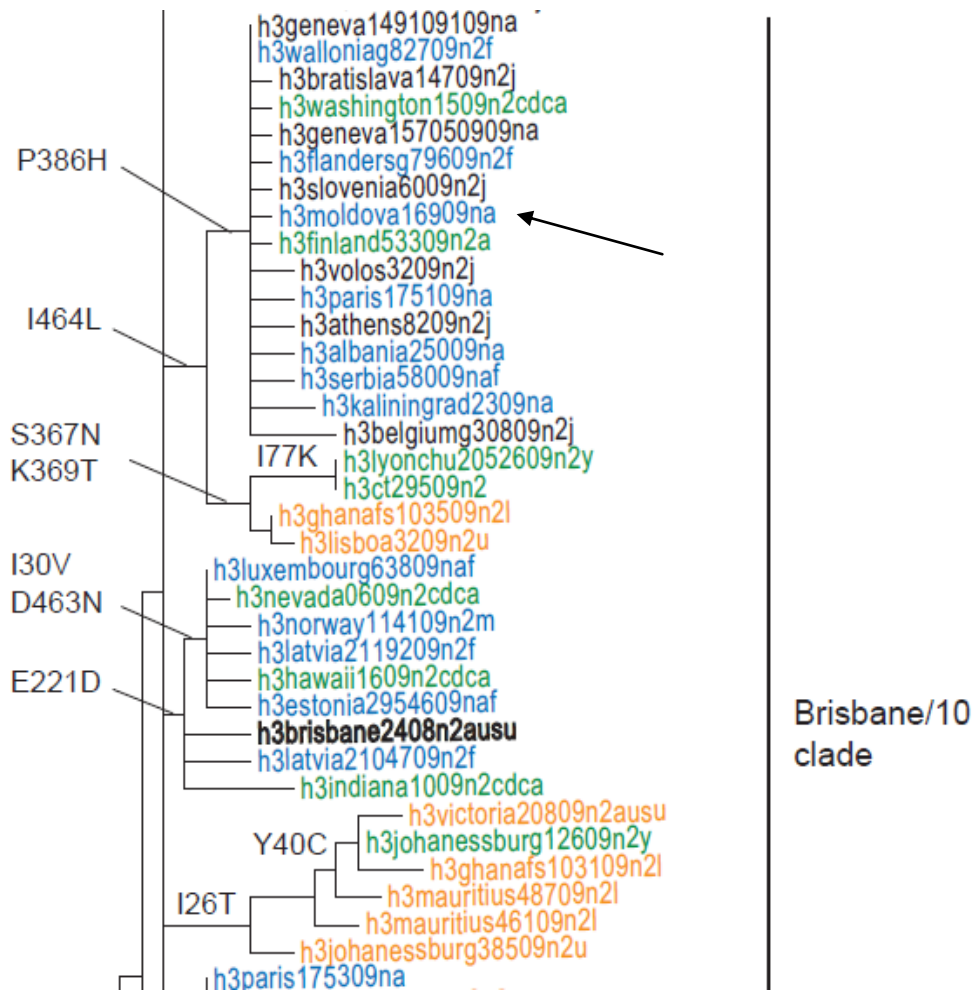


Fig. 3.4. Fragment din caracteristica filogenetică a virusurilor gripale A(H3N2), gena NA, perioada pre-pandemică [164].

Comparația filogenetică a tulpinilor de virusuri gripale de tip B a demonstrat apartenența tulpinilor izolate în Republica Moldova la linia B/Victoria, virusuri antigenic similare cu tulpina vaccinală B/Brisbane/60/2008. Secvențele genei HA au poziționat tulpina B/Moldova/168/2009 în clada Brisbane/60 purtând substituțiile de aminoacizi caracteristice V146I, N75K, N165K, S172P, K48E, K80R, K129N cu efecte antigenice ne semnificative (Figura 3.5). Secvențele genei NA ale virusului gripal nominalizat au prezentat substituțiile aminoacizilor în pozițiile D329N, A358E, de asemenea, cu efecte antigenice minore, relevând apartenența acestui tip virus gripal la linia B/Victoria/2/87 (Figura 3.6)

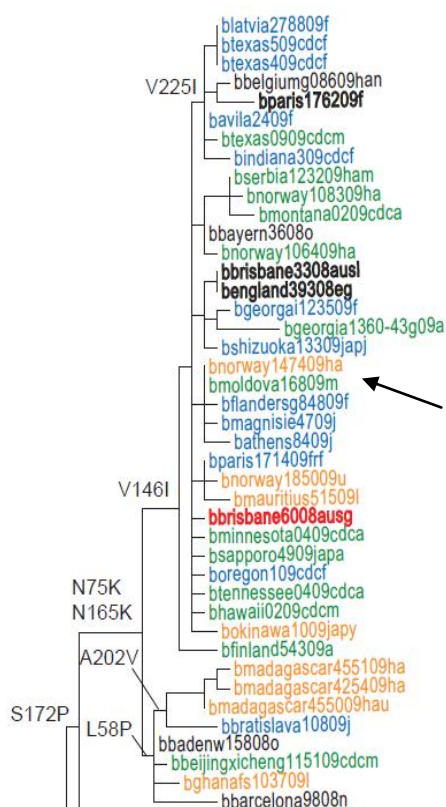


Fig. 3.5. Fragment din comparația filogenetică a virusurilor gripale B (Linia B/Victoria), gena HA, perioada pre-pandemică [164].

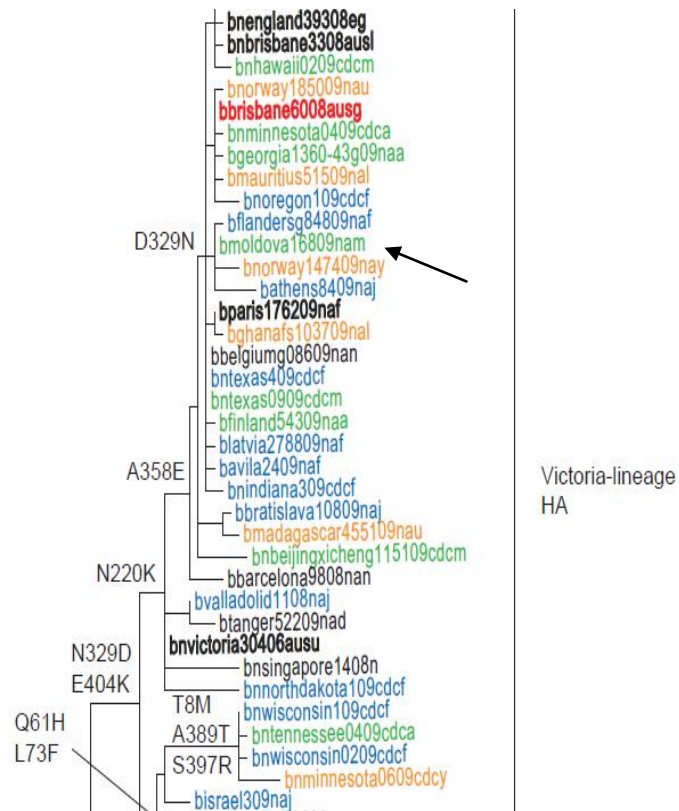


Fig. 3.6. Fragment din comparația filogenetică a virusurilor gripale B (Linia B/Victoria), gena NA, perioada pre-pandemică [164].

### ➤ Particularitățile fenotipice ale tulpinilor de virusuri gripale

Studierea particularităților fenotipice ale virusurilor gripale în perioada nominalizată a atestat faptul, că tulpinile de virusuri gripale A(H3N2) posedă aminoacidul asparagina în poziția 31 a genei M2, ceea ce conferă rezistență virusurilor la remediile antivirale amantadina și remantadina. Totodată aceste virusuri nu au fost rezistente la inhibitorii NA care sunt remedii antivirale de ultimă generație oseltamivir și zanamivir. Virusurile gripale de tip B, de asemenea, au fost sensibile la inhibitorii NA, demonstrat prin lipsa mutațiilor responsabile de rezistență (Figurile 3.5 și 3.6)

Prin urmare, se poate de menționat că tulpinile de virusuri gripale A(H3N2) și B izolate, identificate și caracterizate în acest studiu au fost similare tulpinilor de virusuri de o importanță globală, cum au fost tulpinile A/Brisbane/10/2007 și B/Brisbane/60/2008, incluse în componența vaccinului antigripal recomandat de OMS până la declanșarea pandemiei.

### 3.2. Rezultatele determinării caracteristicilor tulpinilor de virusuri gripale în perioada pandemică

Detectarea în sezoanele epidemice a variantelor, precum și a subtipurilor principal noi de virusuri gripale cu modificări permanente a structurii genetice demonstrează că virusurile gripale au capacitatea de a evolua pe calea reasortării segmentelor genomice ale diverselor tulpini. La 11 iunie 2009 OMS a declarat începutul primei pandemii moderate de gripă în sec. XXI, care a fost provocată de noul virus gripal A(H1N1)pdm. Analiza genetică a acestui virus pandemic a dezvăluit o nouă combinație a genelor virusurilor gripale umane, porcine și aviare. Această combinație complexă a fragmentelor genomice, indiscutabil a condus la apariția unui nou fenotip, care s-a reflectat în tabloul clinic al infecțiilor compatibile cu gripa prin proprietăți biologice noi, exprimate în caracteristicile de detecție, izolare și identificare ale acestui virus [16, 26, 27, 157, 158].

Perioada pandemică, în Republica Moldova, s-a caracterizat prin răspândire geografică extinsă, intensitate foarte înaltă și tendință sporită a procesului epidemic, fapt care a avut un impact esențial asupra sistemului de sănătate, cu înregistrarea a 43 cazuri de deces [157, 158].

Astfel, în perioada pandemică (perioada anilor 2009-2010), prin tehnici de biologie moleculară în timp real (rRT-PCR) – metodă de bază, recomandată de OMS, pentru detectarea ARN virusului gripal de tip nou A(H1N1) – tulpină, numită ulterior pandemică – A(H1N1)pdm – au fost investigate 6818 probe (Tabelul 3.4).

Tab. 3.4. Rezultatele identificării virusurilor gripale prin rRT-PCR în dependență de diagnosticul clinic prezumtiv în anii 2009-2010.

Spectrul virusurilor detectate	Numărul probelor investigate prin rRT-PCR, pe cauze:											
	Gripă			IRVA			SARI			Total		
	invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive	
		abs.	%		abs.	%		abs.	%		abs.	%
A(H1N1)pdm	4295	1629	37,9	955	489	51,2	1568	596	38,0	6818	2714	39,8
A(H3N2)	4295	-	-	955	-	-	1568	1	0,06	6818	1	0,01
B	4295	-	-	955	-	-	1568	1	0,06	6818	1	0,01
<b>Total</b>	<b>4295</b>	<b>1629</b>	<b>37,9</b>	<b>955</b>	<b>489</b>	<b>51,2</b>	<b>1568</b>	<b>598</b>	<b>38,1</b>	<b>6818</b>	<b>2716</b>	<b>39,8</b>

Virusul gripal A(H1N1)pdm a fost detectat în 1629 (37,9%) de specimene, codificate, cu material biologic colectate la persoanele cu diagnosticul clinic „Gripă” (4295/63,0%). De la persoanele cu diagnosticul clinic IRVA au fost colectate 955 (14,0%) probe, din care 489 (51,2%) – au fost pozitive la prezența ARN virusului gripal A(H1N1)pdm. La persoanele cu diagnosticul clinic prezumtiv SARI a fost identificat ARN virusului gripal A(H1N1)pdm în 596 (38,0%) probe, 1 (0,06%) – pozitivă la prezența ARN virusului gripal A(H3N2) și 1 (0,06%) – pozitivă la prezența ARN virusului gripal de tip B din totalul de 1568 (23,0%) specimene cu material biologic (Tabelul 3.4, Figura 3.7).

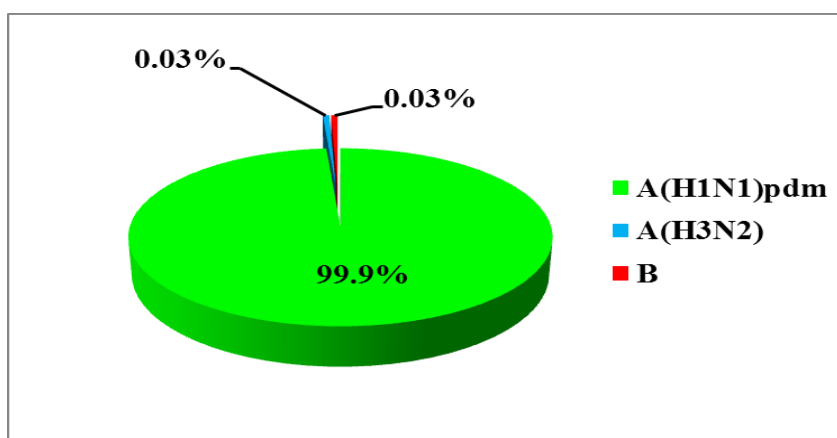


Fig. 3.7. Ponderea virusurilor gripale identificate prin rRT-PCR în perioada pandemică, anii 2009-2010

➤ **Determinarea particularităților antigenice ale virusurilor gripale**

Analiza antigenică a tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm, izolate pe cultura de celule MDCK și identificate la începutul perioadei pandemice, a fost efectuată cu utilizarea panelului de seruri de referință A/New Jersey/8/76, A/California/4/2009, A/California/7/2009, A/England/195/2009, A/Auckland/3/2009. Majoritatea tulpinilor de virusuri gripale au prezentat reactivitate înaltă cu serurile de referință din panel, însă tulpinile A/Moldova/G-182/2009, A/Moldova/G-157/2009 au manifestat reactivitate nesemnificativă, iar tulpina A/Moldova/G-140/2009 – foarte slabă față de serul de referință A/New Jersey/8/76 (Tabelul 3.5).

Determinarea particularităților antigenice ale tulpinilor de virus gripal A(H1N1)pdm izolate în cultura de celule MDCK-SIAT1 și identificate pe parcursul și spre finele pandemiei a fost realizată prin utilizarea panelului de seruri de referință A/California/4/2009, A/California/7/2009, A/England/195/2009, A/Auckland/3/2009, A/Bayern/69/2009 și A/Lviv/N6/2009 [157, 158].

Tab.3.5. Analiza antigenică a tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm identificate la începutul pandemiei în anul 2009.

Virusuri	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>					
			Seruri de referință (seruri de dihere)					
			A/NJ <sup>2</sup> 8/76 R15/79	A/NJ 8/76 F34/82	A/Cal 4/09 C4/F14/09	A/Cal 7/09 C4/31/09	A/Eng 195/09 NIBSC F18/09	A/Auck 3/09 C4/17/09
<b>Virusuri de referință</b>								
A/New Jersey/8/76		Ex	>5120	640	160	160	320	320
A/California/4/2009		C1,E2	2560	160	1280	2560	2560	2560
A/California/7/2009		E5	5120	320	2560	2560	2560	5120
A/England/195/2009		MDCK4	2560	160	1280	2560	2560	2560
A/Auckland/3/2009		Ex+2	5120	640	2560	5120	5120	5120
<b>Virusuri testate</b>								
A/Moldova/G-57/2009	7/31/2009	MDCK2	5120	320	2560	5120	5120	5120
A/Moldova/G-63/2009	8/11/2009	MDCK2	5120	320	2560	2560	2560	5120
A/Moldova/G-85/2009	8/20/2009	MDCK2	2560	160	2560	2560	2560	5120
A/Moldova/G-104/2009	8/29/2009	MDCK2	2560	160	1280	1280	2560	2560
A/Moldova/G-120/2009	9/6/2009	MDCK2	5120	320	2560	2560	2560	5120
A/Moldova/G-162/2009	10/28/2009	MDCK2	2560	160	1280	2560	2560	5120
A/Moldova/G-168/2009	10/30/2009	MDCK2	2560	160	1280	1280	2560	2560
A/Moldova/G-170/2009	10/31/2009	MDCK2	5120	320	1280	1280	2560	2560
A/Moldova/G-174/2009	10/30/2009	MDCK2	2560	320	1280	2560	2560	5120
A/Moldova/G-176/2009	10/31/2009	MDCK2	2560	160	1280	1280	1280	2560
A/Moldova/G-181/2009	10/31/2009	MDCK2	2560	160	1280	2560	2560	5120
A/Moldova/G-182/2009	10/31/2009	MDCK2	1280	80	640	1280	1280	1280
A/Moldova/G-185/2009	11/1/2009	MDCK2	2560	160	1280	2560	1280	2560
A/Moldova/G-186/2009	11/1/2009	MDCK2	2560	160	1280	2560	2560	5120
A/Moldova/G-62/2009	8/12/2009	MDCK3	2560	320	2560	2560	2560	5120
A/Moldova/G-65/2009	8/12/2009	MDCK3	2560	160	1280	2560	1280	2560
A/Moldova/G-72/2009	8/13/2009	MDCK3	2560	160	2560	2560	2560	5120
A/Moldova/G-157/2009	10/26/2009	MDCK3	2560	80	1280	1280	1280	2560
A/Moldova/G-188/2009	11/1/2009	MDCK3	5120	320	2560	2560	5120	5120
A/Moldova/G-140/2009	9/28/2009	MDCK2	1280	<	640	1280	320	640
1. < = <10; 2. Ser hiperimun de iepure								

Trei tulpini de virus gripal (A/Moldova/3958/2009, A/Moldova/30/2010, A/Moldova/398/2010) au manifestat o reactivitate redusă, dar similară cu reactivitatea virusului de referință A/Lviv/N6/2009, însă, mai mare decât a virusului de referință A/Bayern/69/09 cu reactivitate joasă (Tabelul 3.6). Reactivitatea alterată a acestor trei virusuri pare a fi asociată cu schimbările la reziduurile de aminoacizi în pozițiile 154-156 ale genei HA. Ambele virusuri au câte o modificare în poziția 155, iar virusul A/Lviv/N6/2009 prezintă o schimbare adițională la nivelul 222 D spre G [157, 158].

Particularitățile antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm izolate și identificate în Republica Moldova în perioada pandemică au fost similare cu caracteristicile antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate la nivel global, fapt confirmat prin analogia lor cu prototipul A/California/4/2009 și, respectiv, cu virusul vaccinal A/California/7/2009, component al vaccinului monovalent recomandat de către OMS pentru anii 2009-2010 – în pandemie [157, 158, 165].



Tab.3.6. Analiza antigenică a tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm identificate pe parcursul și spre finele pandemiei.

Virusuri	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>					
			Seruri (de dihere) de referință					
			A/Cal 4/09 C4/F14/09	A/Cal 7/09 C4/31/09	A/Eng 195/09 NIBSC F18/09	A/Auck 3/09 C4/17/09	A/Bayern 69/09 C4/33/09	A/Lviv N6/2009 C4/34/09
<b>Virusuri de referință</b>								
A/California/4/2009		C1,E2	1280	1280	1280	1280	640	1280
A/California/7/2009		E6	1280	1280	1280	1280	640	1280
A/England/195/2009		MDCK5	1280	1280	1280	1280	1280	1280
A/Auckland/3/2009		Ex+3	1280	1280	1280	2560	640	1280
A/Bayern/69/2009		MDCK4/SIAT1	80	160	80	80	320	320
A/Lviv/N6/2009		MDCK4/SIAT1	320	640	320	160	1280	1280
<b>Virusuri testate</b>								
A/Moldova/8/2010	1/2/2010	SIAT3	2560	2560	2560	2560	1280	2560
A/Moldova/14/2010	10/1/2010	SIAT3	2560	2560	2560	2560	2560	2560
A/Moldova/63/2010	1/4/2010	SIAT2	2560	5120	2560	2560	2560	2560
A/Moldova/66/2010	1/3/2010	SIAT3	2560	2560	2560	2560	1280	2560
A/Moldova/112/2010	1/5/2010	SIAT2	2560	2560	2560	2560	1280	2560
A/Moldova/226/2010	1/11/2010	SIAT2	1280	1280	1280	2560	640	1280
A/Moldova/379/2010	1/20/2010	SIAT3	1280	640	1280	2560	640	1280
A/Moldova/3958/2009	11/30/2009	SIAT3	640	640	640	1280	320	640
A/Moldova/5278/2009	12/16/2009	SIAT3	1280	1280	1280	1280	640	1280
A/Moldova/5565/2009	12/24/2009	SIAT3	1280	1280	1280	1280	640	1280
A/Moldova/5572/2009	12/25/2009	SIAT4	1280	1280	1280	2560	640	1280
A/Moldova/30/2010	1/2/2010	SIAT3	320	640	320	320	640	640
A/Moldova/398/2010	1/21/2010	SIAT4	640	640	640	640	640	640

1. <= 40

### ➤ Evaluarea particularităților genotipice ale virusurilor gripale

Analiza genotipică a fost efectuată la două loturi prin metoda de secvențiere a genelor HA și NA virusurilor gripale A(H1N1)pdm. În primul lot s-a efectuat secvențierea genelor de HA a 24 izolate de virus gripal și secvențierea genelor de NA a 17 izolate de virusuri gripale A(H1N1)pdm identificate la începutul pandemiei. Din comparația filogenetică a genelor de HA s-a observat că unele tulpini au avut substituția aminoacidului în poziția D222E (Figura 3.9). Această poziție s-a dovedit a fi similară cu poziția glicinei în unele virusuri identificate în cazuri soldate cu deces, însă nu s-a găsit nici un argument întru susținerea ideii că aceasta este asociată cu virulența sporită a virusului A(H1N1)pdm, deși este foarte aproape de substituția D222G [157, 158]. Substituția dată pare a avea un efect neînsemnat asupra antigenicității, fapt ce poate fi observat în interpretarea rezultatelor analizei antigenice (Tabelul 3.5).

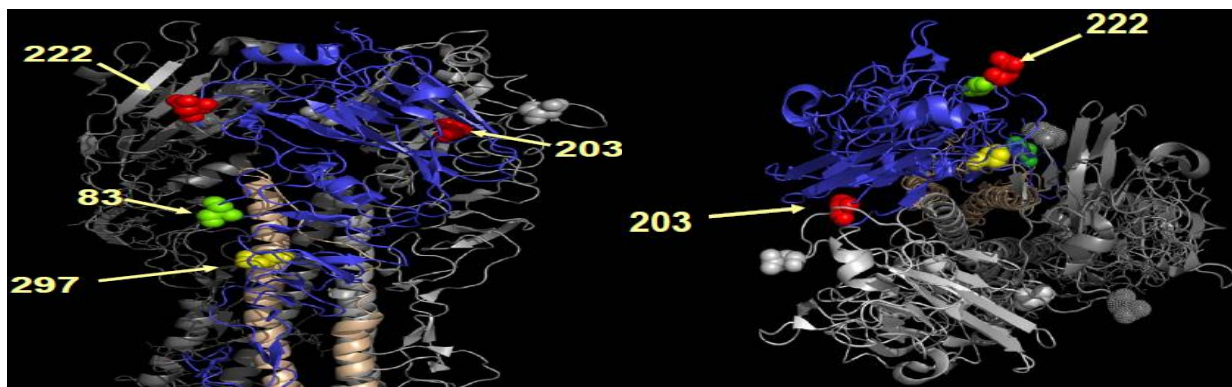


Fig. 3.8. Pozițiile substituțiilor de aminoacizi în gena HA, A(H1N1)pdm [165].

De asemenea, comparația filogenetică a tulpinilor de virus gripal nominalizat au prezentat și alte substituții de aminoacizii, cum ar fi: V321I, D274N, S203T, T120A, D187N, K211E, substituții care au plasat diferit tulpinile de virusuri gripale la construirea arborelui filogenetic, prezentând astfel diferențe minore comparativ cu virusul vaccinal A/California/7/2009 (Figurile 3.8, 3.9 și 3.10).

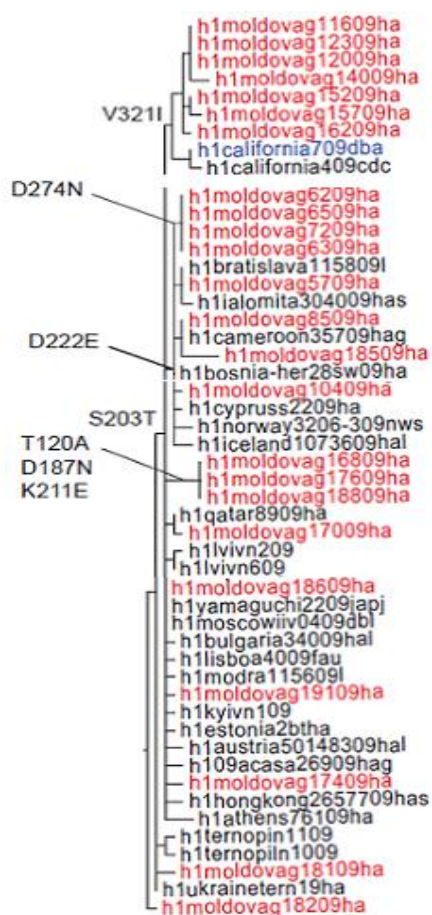


Fig. 3.9. Fragment al comparației filogenetice a virusurilor gripale A(H1N1)pdm, gena HA, perioada pandemică (mijlocul anului 2009) [165].

În al doilea lot s-a efectuat secvențierea genelor de HA și NA a 32 de izolate de virus gripal A(H1N1)pdm identificate la finele pandemiei. În arborii filogenetici atât a genei HA, cât și a genei NA s-a observat că unele virusuri s-au aranjat în grup, pe când altele au fost dispersate, în dependență de substituțiile de aminoacizi codificate de anumite secvențe ale acestor gene, ceea ce poate indica la semnificația epidemiologică a acestor virusuri. Similar lotului anterior, au fost observate virusuri ce prezentau schimbări la nivelul aminoacidului 222 în HA.

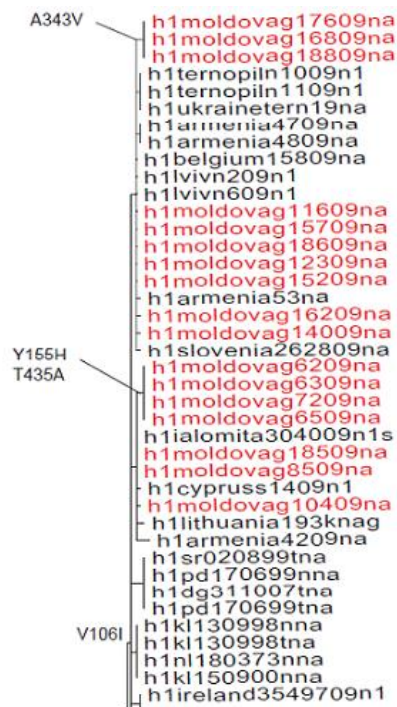


Fig. 3.10. Fragment din arborele filogenetic al virusurilor gripale A(H1N1)pdm, gena NA, perioada pandemică (mijlocul anului 2009) [165].

La nivelul genei HA două virusuri au prezentat o substituție clară la nivelul D222G (virusurile A/Moldova/3163/2009 și A/Moldova/3245/2009), iar altele două conțineau mixul sau D sau G (virusurile A/Moldova/351/2010 și A/Moldova/5053/2009). Interesant este faptul, că aceste probe au fost colectate de la cazurile de deces. Cu toate acestea, nu toate probele colectate de la cazurile de deces au prezentat substituția G în poziția 222 (4 din 9 au prezentat semne de glicină – 2 prezentând predominant glicina) și niciuna din celelalte probe nu au prezentat urme semnificative ale glicinei în analiza de secvențiere. Substituția observată la nivelul 277 în HA în unul din grupurile de virusuri a fost localizată aparte de capătul HA și aparte de site-ul de legare a receptorilor, de asemenea având un efect nesemnificativ (Figura 3.11) [157, 158].

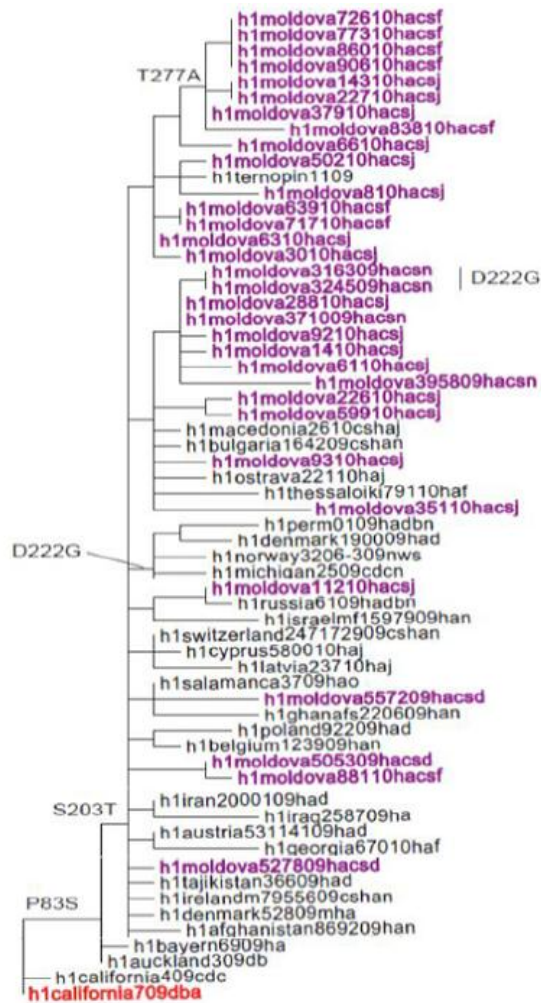


Fig. 3.11. Fragment din arborele filogenetic al virusurilor gripale A(H1N1)pdm, gena HA, perioada pandemică (sf. an. 2009 – înc. an. 2010) [165].

Semnificația substituției D222G a fost și este discutată de către cercetători [157, 158, 166, 167]. Astfel, substituția D222G în gena HA poate fi primul ”marcher al virulenței” identificat la virusul A(H1N1)pdm, care, însă, a fost detectat în unele țări, în special, în numeroase cazuri cu evoluție severă și fatale. Această substituție s-a dovedit a fi cauza extinderii specificității receptrice către acidul  $\alpha$ 2-3 sialic (similar celui aviar) expresate de celulele epiteliale ale tractului respirator inferior [33, 169, 170]. Și anume, atașamentul abundent al D222G al virusului A(H1N1)pdm de macrofagii localizați în alveolele pulmonare poate implica mecanisme de sporire a patogenicității acestuia, ceea ce poate conduce, ulterior, la multiplicarea virusului la acest nivel, manifestată prin afectarea funcției celulelor, inclusiv, prin perturbarea procesului de reparare a epitelului după afectarea alveolelor, dereglarea transportului ionic și producerea anormală de substanțe tensioactive [33]. Totodată, este necesar de menționat, că substituția D222G nu afectează proprietățile antigenice ale virusului A(H1N1)pdm, fapt care a fost stabilit prin RHAi cu seruri de referință atât de dihome, cât și de iepure [166-169].

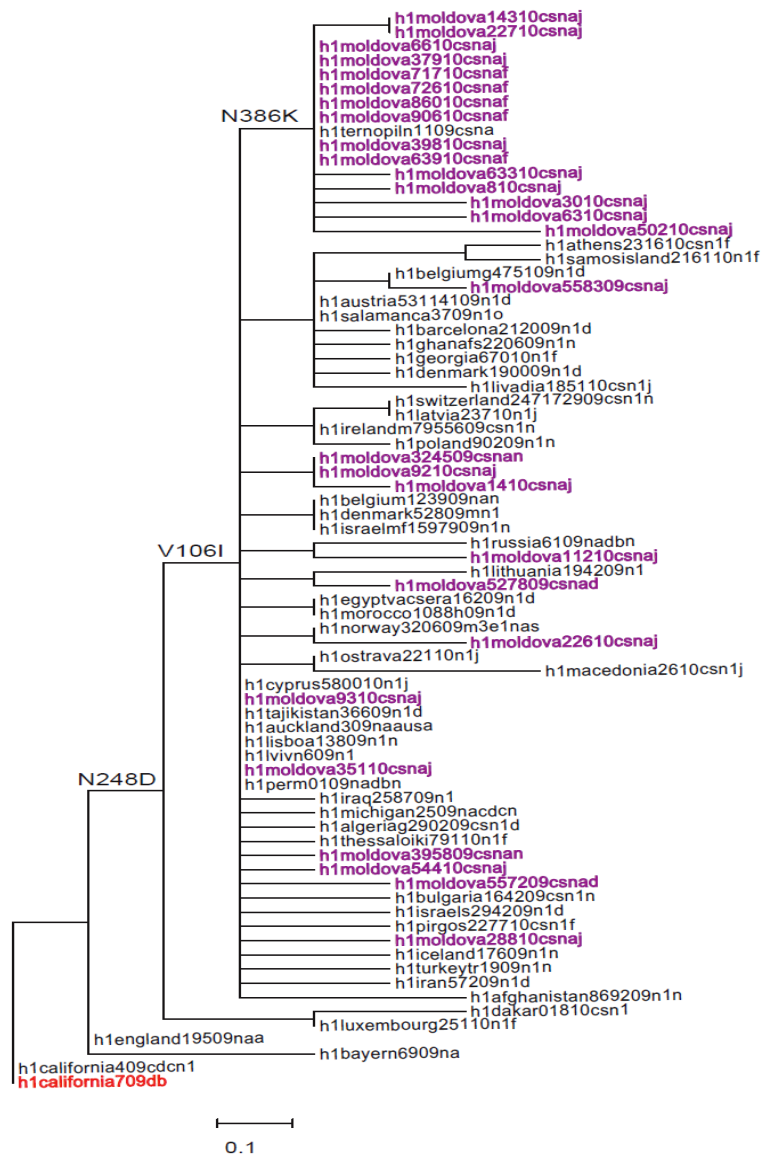


Fig. 3.12. Comparația filogenetică a virusurilor gripale A(H1N1)pdm, gena NA, perioada pandemică (sf. an. 2009 – înc. an. 2010) [165].

De asemenea, în analizele antigenică și de secvențiere s-a demonstrat faptul, că virusurile gripale A(H1N1)pdm care posedă substituția D222G sunt antigenic similare cu virusul A/California/7/2009 (H1N1) – tulpină recomandată de OMS pentru formula vaccinului gripal [157, 169-171]. Aceste date sugerează că vaccinurile antigripale actuale pot asigura protecție atât contra virusurilor gripale care conțin substituția D222G, cât și contra celor ce nu o conțin, fapt prin care vaccinarea ar putea limita impactul virusurilor cu substituția D222G în viitor.

Totodată, analiza genetică a genei NA a atestat că un grup de izolate de virus gripal A(H1N1)pdm au prezentat o substituție la nivelul aminoacidului 386 (N s-a schimbat cu K) și această substituție putea rezulta în pierderea site-ului de glicozilare în tetramerul de NA, aparte de locusul enzimatic activ (Figura 3.12).

### ➤ **Determinarea caracteristicilor fenotipice ale virusurilor gripale**

Comparația filogenetică a genelor NA ale virusurilor gripale analizate în perioada pandemică nu a prezentat substituția de aminoacizi H - Y în poziția 275 – asociată cu rezistența virusurilor la preparatul antiviral oseltamivir, în același timp, substituția dată nu induce rezistență la remediul antiviral zanamivir. Rezistența antivirală, în special la oseltamivir, nu se asociază cu nici una din cladele genetice ale genei HA, însă mutația care induce rezistență prin substituția H275Y în gena NA este suficientă pentru a asocia virusurile rezistente la oseltamivir într-o mică cladă genetică [157, 172].

Evaluarea caracteristicilor fenotipice ale virusurilor gripale a fost realizată în reacția de inhibarea a neuraminidazei (vezi capitolul 2) și a pus în evidență sensibilitatea tulpinilor de virusuri gripale, izolate și identificate în Republica Moldova în perioada nominalizată, la remediile antivirale de ultimă generație oseltamivir și zanamivir [157, 158].

Așa dar, rezultatele studiului au demonstrat, că în perioada pandemică infecțiile gripale etiologic au fost cauzate de tulpinile virusului gripal A(H1N1)pdm circulante în Republica Moldova, care din punct de vedere antigenic, fenotipic și genotipic au fost similare tulpinii prototip A/California/4/2009 și tulpinii vaccinale A/California/7/2009 – inclusă în componența vaccinului antigripal monovalent recomandat de OMS pentru vaccinare în perioada anilor 2009-2010.

### **3.3 Studiarea particularităților tulpinilor de virusuri gripale în perioada post-pandemică**

La 10 august 2010, Directorul General al OMS a anunțat trecerea la perioada post-pandemică: perioadă, când nivelele gripei pandemice în majoritatea țărilor cu supraveghere adecvată au revenit la nivelele înregistrate în cazul gripei sezoniere [158, 171, 172].

Studiarea particularităților tulpinilor de virusuri gripale în perioada post-pandemică, inclusă în acest studiu, a cuprins cercetările din sezonul epidemic 2010-2011.

#### ➤ **Rezultatele evaluării particularităților virusurilor gripale în sezonul 2010-2011**

Sezonul epidemic 2010-2011 s-a caracterizat printr-un pattern sporit cu o răspândire geografică extinsă, intensitate înaltă și o tendință în creștere a procesului epidemic, fapt ce a condus la un impact semnificativ asupra sistemului de sănătate cu înregistrarea a 7 cazuri de deces [155-157, 161, 172].

Prin urmare, în sezonul epidemic 2010-2011, prin metoda rRT-PCR au fost investigate 1045 probe, codificate, colectate de la persoanele cu diagnosticul clinic prezumtiv „Gripă”, „IRVA” și „SARI”. La persoanele cu diagnosticul clinic prezumtiv „Gripă” din 552 (52,8%) specimene ARN virusului gripal A(H1N1)pdm a fost detectat în 200 (36,2%) probe, ARN virusului gripal A(H3N2) detectat în 52 (9,4%) probe, ARN virusului gripal B a fost detectat în

102 (18,5%) probe, iar prezența ARN virusurilor gripale A(H1N1)pdm + B a fost detectată în 4 (0,7%) probe. ARN virusurilor gripale au fost detectate la pacienții cu diagnosticul clinic prezumtiv „IRVA”, după cum urmează: ARN virusului gripal A(H1N1)pdm – în 86 (28,6%) probe, ARN virusului gripal A(H3N2) – în 20 (6,6%) probe, ARN virusului gripal B – în 37 (12,3%) probe din totalul de 301 (28,8%) probe. Din 192 (18,4%) probe colectate de la pacienții cu diagnosticul prezumtiv „SARI” în 76 (39,6%) probe s-a detectat ARN virusului gripal A(H1N1)pdm, în 13 (6,8%) probe a fost detectat ARN virusului A(H3N2) și în 16 (8,3%) probe s-a detectat ARN virusului gripal de tip B (Tabelul 3.7). Așa dar, gripa în perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2010-2011, a fost cauzată de trei virusuri gripale cu predominarea virusului gripal A(H1N1)pdm cu o pondere de 34,6%, virusului gripal de tip B – 14,8%, virusului gripal de tip A cu subtipul H3N2 – 8,1%, iar cea mai mică pondere a fost stabilită în cazul coinfecției cu virusurile gripale de tip A(H1N1)pdm și de tip B doar de 0,4% (Figura 3.13). O situație similară în perioada post-pandemică s-a atestat în majoritatea țărilor din Europa [155-157, 161, 172].

Tab. 3.7. Rezultatele identificării virusurilor gripale prin rRT-PCR în dependență de diagnosticul clinic prezumtiv în sezonul 2010-2011.

Spectrul virusurilor detectate	Numărul probelor investigate prin rRT-PCR											
	Gripă			IRVA			SARI			Total		
	invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive	
		abs.	%		abs.	%		abs.	%		abs.	%
A(H1N1)pdm	552	200	36,2	301	86	28,6	192	76	39,6	1045	362	34,6
A(H3N2)	552	52	9,4	301	20	6,6	192	13	6,8	1045	85	8,1
B	552	102	18,5	301	37	12,3	192	16	8,3	1045	155	14,8
A(H1N1)pdm + B	552	4	0,7	301	-	-	192	-	-	1045	4	0,4
<b>Total</b>	<b>552</b>	<b>358</b>	<b>64,8</b>	<b>301</b>	<b>143</b>	<b>47,5</b>	<b>192</b>	<b>105</b>	<b>54,7</b>	<b>1045</b>	<b>606</b>	<b>57,9</b>

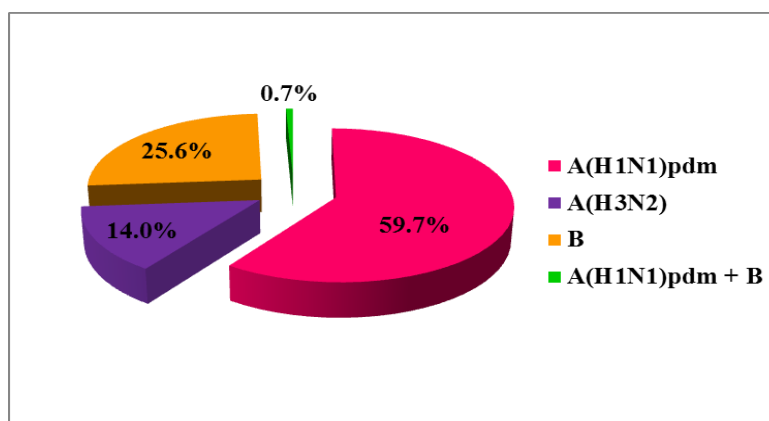


Fig. 3.13. Ponderea virusurilor gripale identificate prin rRT-PCR în perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2010-2011

➤ **Particularitățile antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în sezonul epidemic 2010-2011**

În culturile celulare MDCK și MDCK-SIAT1 au fost investigate 220 din 606 probe pozitive la diferite tipuri/subtipuri ale virusurilor gripale prin rRT-PCR. Din ele au fost izolate 31 tulpini de virusuri gripale, care în RHAI au fost identificate 10 tulpini de virus gripal A(H1N1)pdm, 15 tulpini de virus gripal A(H3N2) și 6 tulpini de virus gripal tip B.

Rezultatele obținute demonstrează că tulpinile izolate de virus gripal A(H1N1)pdm din Republica Moldova totalmente reacționează cu serurile standard A/California/7/2009, A/England/195/2009, A/Auckland/3/2009, A/Bayern/69/2009, A/Lviv/N6/2009, A/Hong Kong/2212/2010, A/Christchurch/16/2010, ceea ce reprezintă o caracteristică comparabilă cu tulpinile din alte țări izolate, identificate și caracterizate din perioada nominalizată, deși tulpina virală A/Moldova/448/2011 a prezentat o activitate ușor redusă în RHAI, în special, cu serurile de referință A/California/7/2009, A/Auckland/3/2009, A/Bayern/69/2009 și A/Christchurch/16/2010 (Tabelul 3.8) [156, 157].

Tab. 3.8. Rezultatele analizei antigenice a virusurilor gripale A(H1N1)pdm identificate în sezonul epidemic 2010-2011.

Virusuri	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>						
			Seruri de referință (seruri de dihere)						
			A/Cal 7/09 C4/31/ 09	A/Eng 195/09 NIBSC F18/09	A/Auck 3/09 C4/17/09	A/Bayern 69/09 C4/33/09	A/Lviv N6/2009 C4/34/09	A/HK 2212/2010 F21/10 Egg	A/C'church 16/2010 F30/10
<b>Virusuri de referință</b>									
A/California/7/2009	4/9/2009	E2/E4	5120	2560	5120	1280	2560	2560	2560
A/England/195/2009	4/28/2009	MDCK1/MDCK2	2560	2560	2560	1280	2560	2560	2560
A/Auckland/3/2009	4/25/2009	Ex/E3	2560	2560	5120	1280	2560	2560	2560
A/Bayern/69/2009	7/1/2009	MDCK4/MDCK1	320	160	80	640	320	160	160
A/Lviv/N6/2009	10/27/2009	MDCK5	1280	160	160	2560	2560	640	640
A/HK/2212/2010	7/16/2010	E3	5120	5120	5120	2560	5120	5120	5120
A/Christchurch/16/2010	7/12/2010	E2/E1	5120	5120	5120	2560	5120	5120	5120
<b>Virusuri testate</b>									
A/Moldova/124/2011	1/24/2011	MDCK3	2560	2560	2560	1280	2560	2560	2560
A/Moldova/291/2011	2/2/2011	MDCK3	2560	2560	1280	640	1280	2560	1280
A/Moldova/338/2011	2/3/2011	MDCK3	2560	2560	1280	640	1280	2560	1280
A/Moldova/366/2011	2/7/2011	MDCK3	1280	1280	1280	640	1280	1280	640
A/Moldova/399/2011	2/9/2011	MDCK3	1280	1280	1280	320	1280	1280	640
A/Moldova/414/2011	2/7/2011	MDCK2	1280	1280	1280	320	1280	1280	640
A/Moldova/448/2011	2/7/2011	MDCK2	640	1280	320	640	1280	1280	640
A/Moldova/74/2011	1/19/2011	MDCK2	1280	2560	2560	1280	1280	2560	1280
A/Moldova/114/2011	1/24/2011	MDCK2	1280	1280	1280	640	1280	1280	640
1. <= 40									

Analiza antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) reprezintă un patern similar de reactivitate cu panelul de seruri de referință A/Wisconsin/67/2005, A/Brisbane/10/2007,



A/Perth/16/2009, A/Wisconsin/15/2009, A/Victoria/208/2009, A/Victoria/210/2009, A/Alabama/5/2010, A/Perth/10/2010. Important este faptul, că aceste virusuri au fost reactive cu serurile specifice standard față de tulpinile virale A/Wisconsin/15/2009, A/Alabama/5/2010 și A/Perth/10/2010, însă, o reactivitate redusă le-au avut cu serul specific față de virusul A/Perth/16/2009 inclus în componența cocktailului vaccinal recomandat de OMS pentru sezonul respectiv, aceste variații fiind neesențiale (Tabelul 3.9) [157, 173].

Tab. 3.9. Caracteristica antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) identificate în sezonul epidemic 2010-2011.

Virusuri	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>							
			Seruri de referință (seruri de dihore)							
			A/Wis 67/05 F18/08	A/Bris 10/07 F29/09	A/Perth 16/09 F30/09	A/Wis 15/09 F24/09	A/Vic 208/09 F7/10	A/Vic 210/09 F11/10	A/Ala 5/10 F27/10	A/Perth 10/10 F03/11
Virusuri de referință										
A/Wisconsin/67/2005	2005-08-31	SpfCk3E3/E11	1280	640	<	<	160	<	<	80
A/Brisbane/10/2007	2007-02-06	E2/E4	5120	5120	40	40	320	160	40	160
A/Perth/16/2009	2009-07-04	E3/E3	40	80	1280	640	1280	1280	640	2560
A/Wisconsin/15/2009	2009-07-06	E2/E3	40	<	640	320	40	160	640	320
A/Victoria/208/2009	2009-06-02	E3/E2	160	160	640	640	5120	5120	1280	2560
A/Victoria/210/2009	2009-06-02	E2/E3	160	320	1280	1280	2560	5120	320	2560
A/Alabama/5/2010	2010-07-13	MK1/M2/S3	<	<	80	40	40	40	160	320
A/Perth/10/2010	2010-05-25	E2/E2	<	<	160	40	40	40	160	320
Virusuri testate										
A/Moldova/96/2011	1/21/2011	SIAT4	40	40	320	320	320	320	640	1280
A/Moldova/145/2011	1/24/2011	SIAT4	40	40	320	160	320	320	320	640
A/Moldova/161/2011	1/25/2011	SIAT4	40	40	320	640	320	320	640	1280
A/Moldova/176/2011	1/26/2011	SIAT2	40	40	320	320	320	320	640	1280
A/Moldova/176/2011	1/26/2011	SIAT3	40	40	320	320	320	320	640	1280
A/Moldova/214/2011	1/28/2011	SIAT2	40	40	320	320	320	320	640	1280
A/Moldova/214/2011	1/28/2011	SIAT3	40	40	320	320	160	160	640	1280
A/Moldova/224/2011	1/28/2011	SIAT4	40	40	320	320	320	160	640	1280
A/Moldova/225/2011	1/28/2011	SIAT2	40	40	320	320	160	160	640	1280
A/Moldova/225/2011	1/28/2011	SIAT3	40	40	320	320	320	320	640	1280
A/Moldova/252/2011	1/31/2011	SIAT4	80	40	640	640	320	320	1280	1280
A/Moldova/317/2011	2/4/2011	SIAT3	40	80	320	640	320	320	640	1280
A/Moldova/278/2011	2/2/2011	SIAT4	40	80	640	640	320	320	640	1280
A/Moldova/375/2011	2/7/2011	SIAT4	40	80	640	640	320	320	640	1280
A/Moldova/378/2011	2/8/2011	SIAT3	40	80	320	320	320	160	640	1280
A/Moldova/113/2011	1/23/2011	SIAT4	40	40	320	320	160	320	640	1280
A/Moldova/594/2011	2/18/2011	SIAT4	40	40	320	320	320	160	640	1280
A/Moldova/601/2011	2/18/2011	SIAT3	40	40	320	320	320	320	640	1280

1. < = <40

Pentru a caracteriza din punct de vedere antigenic tulpinile de virus gripal de tip B au fost utilizate serurile de referință B/Malaysia/2506/2004, B/England/393/2008, B/Brisbane/60/2008, B/Paris/1762/2008, B/Hong Kong/514/2009, B/Odessa/3886/2010. Rezultatele analizei antigenice au atestat că tulpinile de virus gripal B, izolate și identificate în Republica Moldova,

au prezentat același model general de reactivitate, demonstrând o reactivitate înaltă cu serurile specifice față de virusurile strâns legate genetic de tulpina vaccinală B/Brisbane/60/2008 (Tabelul 3.10).

Tab. 3.10. Rezultatele analizei antigenice a virusurilor gripale de tip B identificate în sezonul epidemic 2010-2011.

Virusuri	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titru de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>						
			Seruri de referință (seruri de dihone)						
			B/Bris <sup>2</sup> 60/08 Sh 524	B/Mal 2506/04 F28/05	B/England 393/08 F31/08	B/Bris 60/08 F25/10	B/Paris 1762/08 F11/09	B/HK 514/09 F13/10	B/Odessa 3886/10 F17/10
<b>Virusuri de referință</b>									
<b>B/Malaysia/2506/2004</b>	2004-12-06	E3/E3	640	640	160	80	<	<	<
<b>B/England/393/2008</b>	2008-08-29	E1/E6	640	160	320	320	40	40	40
<b>B/Brisbane/60/2008</b>	2008-08-04	E4/E4	640	160	160	320	40	20	40
<b>B/Paris/1762/2008</b>	2009-02-09	C2/MDCK4	640	10	<	20	80	160	80
<b>B/Hong Kong/514/2009</b>	2009-10-11	MDCK1/MDCK1	640	<	<	20	80	160	80
<b>B/Odessa/3886/2010</b>	2010-03-19	C2/MDCK3	640	10	<	40	80	320	160
<b>Virusuri testate</b>									
<b>B/Moldova/141/2011</b>	2011-01-25	MDCK2	640	20	<	40	160	320	160
<b>B/Moldova/284/2011</b>	2011-02-02	MDCK3	640	10	<	40	160	160	160

1. < = <10; 2. Ser hiperimun de oi

➤ **Particularitățile genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în sezonul epidemic 2010-2011**

Secvențierea genelor HA și NA efectuată pentru virusurile gripale A(H1N1)pdm izolate a atestat două virusuri care s-au aranjat diferit în cluster-ele din analiza filogenetică a fiecărei gene. Secvențele genei HA a tulpinii A/Moldova/338/2011 au poziționat-o în subgrupele genetice definite de substituțiile aminoacizilor S185T și D97N, făcând parte din grupul genetic 6, iar tulpina A/Moldova/448/2011 s-a amplasat în subgrupul definit de substituțiile aminoacizilor A134T și S183P, grupul genetic 3 (Figurile 3.14, 3.15 și 3.16). Recent, au fost recunoscute cinci clase genetice emergente ale genei HA de virusuri H1N1: 1) grupul Emisferei Sudice (SH) (modificările-cheie N125D, altele cu V250A); 2) grupul Hong Kong (modificările-cheie S128P, V199A, I295V, K163T și P271S), 3) un grup definit de aminoacizii A134T, S183P - observat în cel puțin șase țări, 4) un grup definit de aminoacizii R205K, I216V, V249L - observat în cel puțin trei țări; 5) S185T- grupul cu cea mai mare expansiune și răspândire geografică, multe cu substituția D97N [157]. Virusurile în fiecare grup genetic sunt considerate antigenic similare.

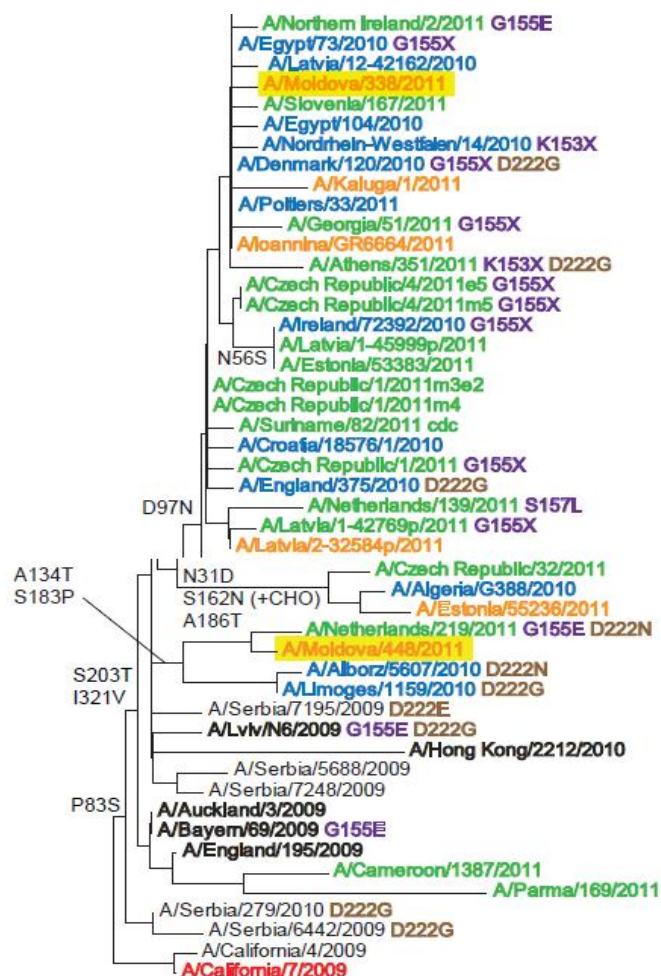


Fig. 3.14. Fragmente ale comparației filogenetice a virusurilor gripale A(H1N1)pdm, gena HA (regiunea HA1), sezonul 2010 – 2011 [172].

Evaluarea rezultatelor analizei genetice ale tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm – A/Moldova/338/2011 și A/Moldova/448/2011 a atestat că secvențele genei NA poartă substituțiile specifice grupelor genetice 3 (V241I, N369K) și 6 (R220K, I389K, Q313R, V394I, V106I și N248D), respectiv pentru fiecare virus în parte (Figura 3.17).

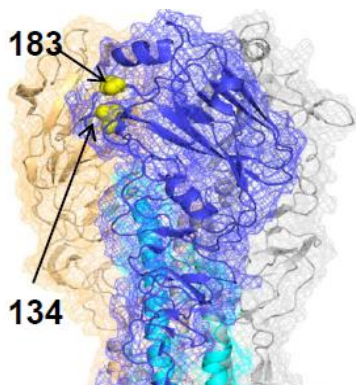


Fig. 3.15. Locațiile substituțiilor specifice grupului genetic 3 a genei HA-H1: S183P și A134T [172].

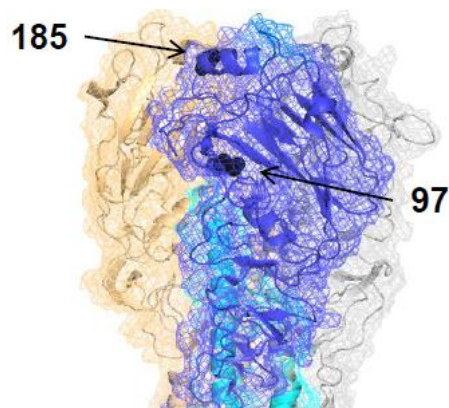


Fig. 3.16. Locațiile substituțiilor specifice grupului genetic 6 a genei HA-H1: S185T și D97N [172].

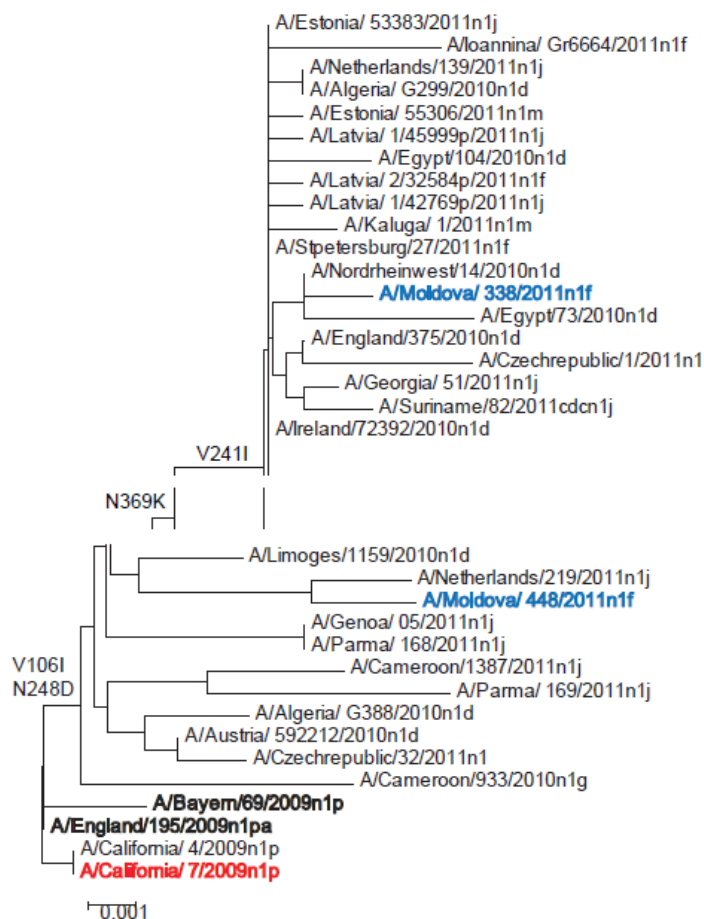


Fig. 3.17. Fragmente din evaluarea filogenetică a virusurilor gripale A(H1N1)pdm, gena NA, sezonul epidemic 2010 – 2011 [172].

Astfel, din comparația filogenetică efectuată în baza arborelui filogenetic global, reiese că tulpinile de virusuri gripale A(H1N1)pdm, izolate și identificate în Republica Moldova, din grupurile genetice nominalizate au fost similare la nivelul genelor HA și NA cu tulpina de referință A/California/7/2009 H1N1pdm – tulpină de referință, componentă a cocktailului vaccinal antigripal recomandat de OMS pentru vaccinare în sezonul 2011-2012.

Rezultatele analizei secvențelor nucleotidice ale genei HA ale tulpinilor de virusuri gripale A(H3N2) au atestat prezența substituțiilor de aminoacizi D53N, Y94H, I230V, E280A și D97N. Aceste substituții au poziționat tulpinile A/Moldova/601/2011, A/Moldova/176/2011, A/Moldova/317/2011, A/Moldova/278/2011, A/Moldova/378/2011, A/Moldova/225/2011, A/Moldova/161/2011 și A/Moldova/113/2011 în grupul genetic 5, clada Victoria/208 (grupul Perth/10) (Figurile 3.18 și 3.19).



Fig. 3.18. Fragment al arborelui filogenetic al virusurilor gripale A(H3N2), gena HA (regiunea HA1), sezonul epidemic 2010 – 2011 [172].

Tulpinile de referință A/Alabama/5/2010 și A/Perth/10/2010, din panelul de seruri standard utilizate pentru caracterizarea antigenică a tulpinilor de virus gripal A(H3N2) din Republica Moldova (Tabelul 3.9), de asemenea, s-au încadrat în această grupă genetică.

De menționat, că grupa genetică 5, clada Victoria/208 nu s-a deosebit antigenic semnificativ de virusul vaccinal A/Perth/16/2009, luat ca bază la construcția arborelui filogenetic pentru efectuarea comparației filogenetice în baza genei HA.

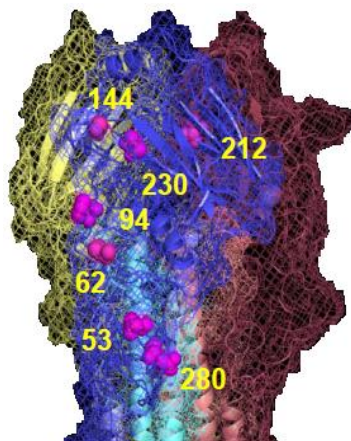


Fig. 3.19. Locațiile substituțiilor specifice grupului genetic 5 a genei HA a virusurilor gripale A(H3N2): D53N, Y94H, I230V și D97N [172].

Rezultatele secvențierii genei NA a virusurilor gripale A(H3N2), izolate și identificate în Republica Moldova, au atestat prezența substituțiilor de aminoacizi S367N, K369T și I464L specifice grupurilor genetice 5 și 6, care se includ în clada Victoria/208 al grupului Perth/10 (Figura 3.20).

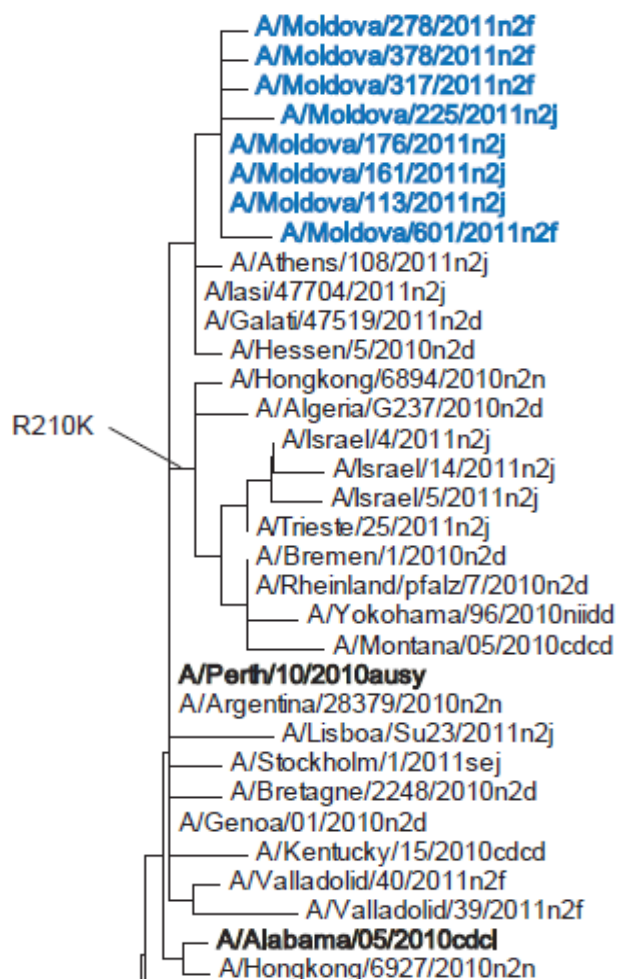


Fig. 3.20. Fragment al analizei filogenetice comparative a virusurilor gripale A(H3N2), gena NA, sezonul epidemic 2010 – 2011 [172].

Analiza de secvențiere a tulpinii B/Moldova/284/2011 pentru gena HA a demonstrat că virusul analizat posedă substituțiile de aminoacizi L-P în poziția 58, N-K în poziția 75, N-K în poziția 165 și S-P în poziția 172 – substituții comune pentru o bună parte din tulpinile de virusuri gripale izolate în diferite țări ale lumii și care se referă la clada genetică 1 „Brisbane/60”, fiind stabilit că aceste substituții nu afectează antigenicitatea virusurilor (Figura 3.21) [157, 161].

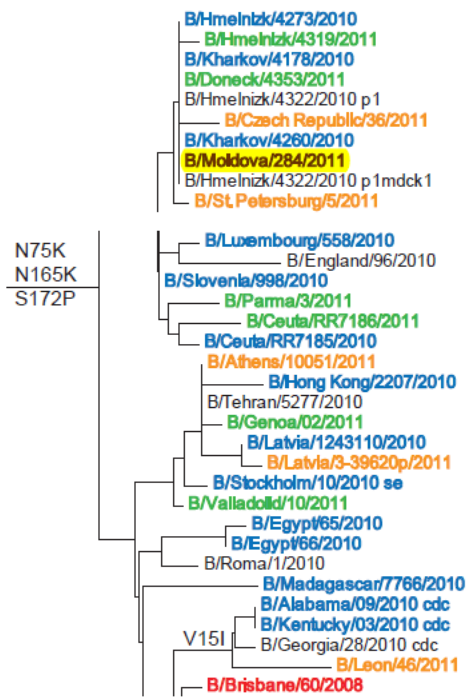


Fig. 3.21. Fragment al comparației filogenetice a virusurilor gripale B (Linia B/Victoria), gena HA (regiunea H1), sezonul 2010-2011 [172].

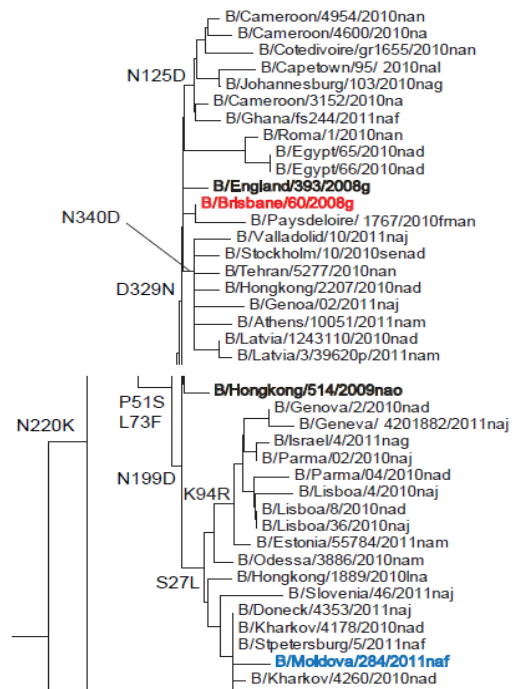


Fig. 3.22. Fragment al comparației filogenetice a virusurilor gripale B (Linia B/Victoria), gena NA, sezonul 2010-2011 [172].

Evaluarea rezultatelor secvențierii genei NA a virusului gripal de tip B (B/Moldova/284/2011) a pus în evidență prezența substituțiilor de aminoacizi S27L, P51S, L73F și N199D, care au poziționat această tulpină de virus gripal în clada 1 „Brisbane/60”, de rând cu tulpinile de referință B/Odessa/3886/2010, B/Hong Kong/514/2009, B/Paris/1762/2009, B/England/393/2008 și, respectiv, cu tulpina B/Brisbane/60/2008 – component al cocktailului vaccinal antigripal recomandat de OMS pentru vaccinare în sezonul 2011-2012 (Figura 3.22) [157, 172].

➤ **Rezultatele determinării particularităților fenotipice ale tulpinilor de virusuri gripale identificate în sezonul epidemic 2010-2011**

Analiza sensibilității fenotipice la antivirale (oseltamivir și zanamivir) a virusurilor gripale A și B, izolate și identificate în Republica Moldova în perioada nominalizată, cu un nivel suficient de activitate a sialidazei a fost efectuat în testul de inhibare a neuraminidazei. Tulpinile de virusuri gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B, testate, au fost totalmente sensibile la ambii inhibitori. În pofida faptului că inhibitorii neuraminidazei au fost utilizați pe scară largă atât cu scop de profilaxie, cât și de tratament pe parcursul perioadelor nominalizate, rezistența la oseltamivir a fost identificată sporadic, iar virusurile rezistente nu aveau potențial eficient de transmisie în comunitate. Totuși, cercetările au demonstrat că virusul gripal A(H1N1)pdm, având un potențial înalt de transmisie și o virulență mai înaltă comparativ cu virusurile gripale

A(H3N2) și B a fost totalmente rezistent la antiviralele din grupa adamantanelor, dar susceptibil la ambii inhibitori ai neuraminidazei – zanamivir și oseltamivir [157, 161, 172].

Monitorizarea continuă a variabilității mutaționale prin analiza genotipică a tulpinilor circulante de virusuri gripale deține un rol important în selectarea tulpinilor vaccinale cu scop de profilaxie specifică a infecțiilor gripale, dar și pentru alegerea corectă a remediilor antivirale cu scop de tratament.

Așa dar, sezonul epidemic 2010-2011 s-a caracterizat prin circulația virusurilor gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B. În comparație cu sezoanele epidemice de până la declanșarea primei pandemii a sec. XXI, în această perioadă (post-pandemică) s-a observat circulația preponderentă a virusului gripal A(H1N1)pdm care practic totalmente l-a substituit pe virusul gripal sezonier A(H1N1) care s-a aflat în circulație de aproape un secol sau și mai mult [102, 110, 112]. Caracteristica genotipică a virusurilor gripale A(H1N1)pdm identificate atât în Republica Moldova, cât și în alte țări ale lumii a atestat circulația în continuare a virusurilor ce conțineau substituția D222G, care tot mai des se detecta în virusurile identificate în probele colectate de la pacienții cu evoluție severă a bolii [102, 110]. Cu toate acestea, este necesar de menționat că toate tipurile de virusuri gripale identificate în Republica Moldova au făcut parte din cladele virusurilor vaccinale, după cum urmează: virusul A(H1N1)pdm – clada virusului A/California/7/2009, virusul A(H3N2) – clada virusului A/Perth/16/2009 și virusul gripal de tip B – clada virusului B/Brisbane/60/2008 (linia B/Victoria) – grupare caracteristică majorității virusurilor gripale circulante în țările europene.

### **3.4. Concluzii la capitolul 3.**

1. Aspectele teoretice și practice ale rezultatelor obținute în cadrul cercetărilor reflectate în capitolul dat au scos în evidență că în perioada pre-pandemică (2008-2009) tulpinile de virusuri gripale A(H3N2) și B izolate și identificate în Republica Moldova au fost antigenic similare cu tulpinile vaccinale, la nivel genetic făcând parte din clada A/Brisbane/10/2007 pentru virusul gripal A(H3N2) și clada B/Brisbane/60/2008 linia B/Victoria pentru virusul gripal de tip B. Substituțiile de aminoacizi prezente în genele HA și NA la ambele tipuri de virusuri gripale izolate și identificate în RM nu au fost distincte pentru a le diferenția de tulpinile de referință nominalizate.
2. Rezultatele investigațiilor au evidențiat că perioada pandemică (2009-2010) s-a caracterizat prin circulația preponderentă a tulpinilor de virus gripal A(H1N1)pdm, tulpini antigenic similare și la nivel genetic aparținente la clada genetică cu tulpina A/California/7/2009 recomandată de OMS pentru a fi inclusă în componența vaccinului antigripal trivalent pentru sezonul 2010-2011. Comparația la nivelul arborelui filogenetic global a tulpinilor de virus



gripal A(H1N1)pdm izolate și identificate în Republica Moldova a pus în evidență apariția substituției aminoacidului D222G în gena HA, detectată în special în cazuri cu evoluție severă a infecției gripale, cât și în cazuri soldate cu deces. Analiza datelor obținute, însă, nu a demonstrat efectul substituțiilor atestate asupra transmisibilității virusului gripal A(H1N1)pdm. Circulația virusurilor gripale A(H3N2) și B în perioada nominalizată a fost practic direct influențată de virusul gripal A(H1N1)pdm detectat în 99,9% cazuri.

3. În perioada post-pandemică (2010-2011) practic s-a demonstrat substituția din circulație a virusului gripal sezonier A(H1N1) de către virusul gripal A(H1N1)pdm – tulpină dominantă în sezonul nominalizat, similară antigenic și apartenență la clada genetică a tulpinii de referință A/California/7/2009 – componentă a vaccinului antigripal recomandat de OMS pentru vaccinare în sezonul 2011-2012. Substituțiile de aminoacizi prezente în genele HA și NA au poziționat în două grupuri genetice diferite, 3 și 6 tulpinile de virus gripal A(H1N1)pdm, fapt confirmat prin comparația filogenetică la nivelul arborelui filogenetic global. Tulpinile de virus gripal A(H3N2) identificate în perioada nominalizată nu s-au deosebit antigenic semnificativ cu tulpina de referință A/Perth/16/2009 – componentă a vaccinului antigripal recomandat de OMS pentru sezonul 2010-2011. Comparația filogenetică a acestor tulpini la nivel global a pus în evidență apartenența lor la grupul genetic 5, clada Victoria/208 (grupul Perth/10) prin prezența substituțiilor specifice acestui grup genetic la nivelul genelor HA și NA. Virusurile gripale de tip B au fost antigenic similare cu tulpina vaccinală B/Brisbane/60/2008 linia B/Victoria, recomandată de OMS pentru a fi inclusă în cocktailul vaccinal antigripal trivalent pentru sezonul 2011-2012. Substituțiile de aminoacizi specifice cladei genetice 1 „Brisbane/60” prezente în genele HA și NA tulpinilor de virus gripal de tip B nu au afectat antigenicitatea acestor virusuri.
4. Virusurile gripale izolate și identificate în Republica Moldova fac parte din cladele virusurilor vaccinale specifice fiecărei perioade în parte – grupări caracteristice majorității virusurilor gripale circulante atât în țările europene, cât și la nivel global în perioadele pre-pandemică, pandemică și post-pandemică.
5. Cercetarea la susceptibilitatea inhibitorilor neuraminidazei a virusurilor gripale circulante în Republica Moldova din perioadele nominalizate a demonstrat sensibilitatea lor la remediile antivirale de ultimă generație – oseltamivir și zanamivir. Totodată, prezența substituției de aminoacizi S31N specifică pentru virusurile gripale A(H1N1)pdm și A(H3N2) la nivelul genei M2 le conferă acestor virusuri proprietatea de rezistență la adamantane (amantadina și remantadina).

6. Analizele antigenică și filogenetică au permis de a evalua particularitățile distincte ale virusurilor gripale aflate în circulație și reprezintă instrumente de o importanță majoră în detectarea noilor tulpini reasortante de virusuri gripale atât cu potențial epidemic, cât și pandemic – element indispensabil în realizarea supravegherii epidemiologice cu elemente de control și răspuns.
7. Concordanța rezultatelor obținute în acest studiu privind evaluarea particularităților antigenice, genotipice și fenotipice cu datele selectate din literatura internațională a permis de a confirma procesul evolutiv al virusurilor gripale de la o perioadă la alta (pre-pandemică - pandemică) prin variații antigenice majore, manifestat prin apariția în circulație a unei tulpini noi de virus gripal A(H1N1)pdm.

#### 4. EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR VIRUSURILOR GRIPALE ÎN PERIOADA INTEREPIDEMICĂ ÎNTRU OPTIMIZAREA SUPRAVEGHERII EPIDEMIOLOGICE ȘI VIRUSOLOGICE A GRIPEI

Evaluarea particularităților tulpinilor de virusuri gripale în perioada interepidemică, inclusă în acest studiu, a cuprins cercetările din următoarele sezoane epidemice: sezonul 2011-2012, 2012-2013 și sezonul 2013-2014.

##### 4.1. Rezultatele evaluării particularităților virusurilor gripale în sezonul 2011-2012

Sezonul epidemic 2011-2012 s-a caracterizat printr-un pattern scăzut cu o răspândire geografică sporadică și localizată, intensitate joasă și o tendință în descreștere a procesului epidemic, fapt ce a avut un impact nesemnificativ asupra sistemului de sănătate [174-176].

Cercetările efectuate în acest studiu, în perioada sezonului epidemic 2011-2012, s-au realizat prin testarea a unui eșantion de 214 specimene codificate cu material biologic în rRT-PCR. Rezultatele investigațiilor au pus în evidență circulația virusurilor gripale A(H3N2) și B. Virusul gripal A(H3N2) a fost detectat în 15 (65,2%) din 23 (10,7%) probe colectate de la persoanele cu diagnosticul prezumtiv „Gripă”, în 27 (16,1%) din 168 (78,5%) mostre cu material biologic prelevat de la persoanele cu diagnosticul prezumtiv „IRVA” și în 3 (13,0%) din 23 (10,7%) specimene colectate de la pacienții cu diagnosticul prezumtiv „SARI”. Totodată, ARN virusului gripal de tip B a fost detectat doar în 2 cazuri: 1 caz – persoană cu diagnosticul clinic prezumtiv „Gripă” (4,3%) și 1 caz – „IRVA” (0,6%) (Tabelul 4.1).

Tab.4.1. Rezultatele identificării virusurilor gripale prin rRT-PCR în dependență de diagnosticul clinic prezumtiv în sezonul 2011-2012

Spectrul virusurilor detectate	Numărul probelor investigate prin rRT-PCR											
	Gripă			IRVA			SARI			Total		
	invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive	
		abs.	%		abs.	%		abs.	%		abs.	%
A(H1N1) pdm	23	-	-	168	-	-	23	-	-	214	-	-
A(H3N2)	23	15	65,2	168	27	16,1	23	3	13,0	214	45	21
B	23	1	4,3	168	1	0,6	23	-	-	214	2	0,9
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>16</b>	<b>69,5</b>	<b>168</b>	<b>28</b>	<b>16,7</b>	<b>23</b>	<b>3</b>	<b>13,0</b>	<b>214</b>	<b>47</b>	<b>21,9</b>

Ponderea virusurilor gripale detectate în perioada nominalizată a constituit 96% pentru virusul gripal A(H3N2), identificată ca tulpină dominantă în sezonul nominalizat și 4% pentru virusul gripal de tip B (Figura 4.1).

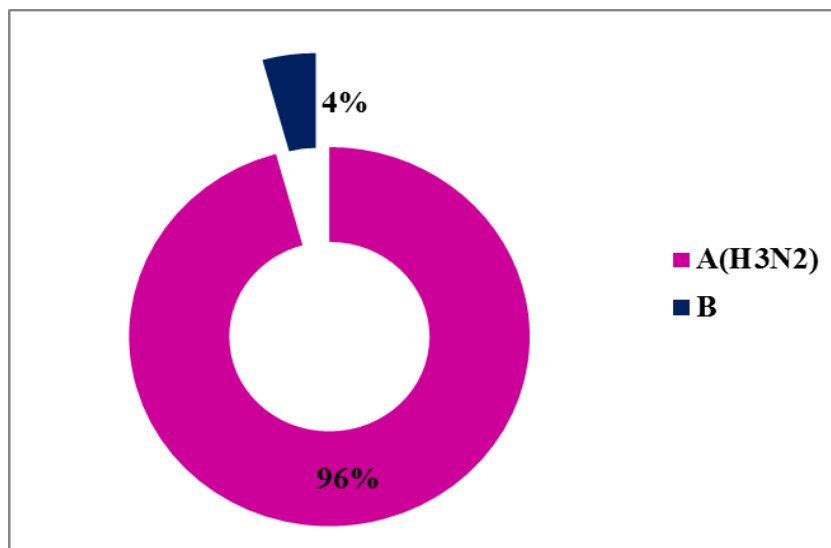


Fig. 4.1. Ponderea virusurilor gripale detectate în sezonul epidemic 2011-2012

➤ **Rezultatele evaluării particularităților antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în sezonul epidemic 2011-2012**

Tulpinile de virusuri gripale A(H3N2) izolate și identificate în Republica Moldova în sezonul epidemic 2011-2012, pentru determinarea particularităților antigenice, au fost testate cu panelul de seruri de referință A/Perth/16/2009, A/Victoria/208/2009, A/Alabama/5/2010, A/Hong Kong/3969/2011, A/Stockholm/18/2011, A/Iowa/19/2010, A/Finland/190/2011, A/Norway/1789/2011, A/Victoria/361/2011. Rezultatele obținute au demonstrat că unele tulpini (A/Moldova/99/2012, A/Moldova/94/2012 și A/Moldova/101/2012) au manifestat o reactivitate medie cu tulpinile de referință A/Hong Kong/3969/2011, A/Finland/190/2011 și A/Victoria/361/2011, pe când cu celelalte virusuri de referință reactivitatea a fost nesemnificativă. Acest fapt se poate datora, cel mai mult probabil, apartenenței virusurilor gripale testate grupului genetic respectiv tulpinilor de referință (grupul genetic 3C). Mai mult ca atât, tulpinile A/Moldova/99/2012, A/Moldova/94/2012 și A/Moldova/101/2012 au fost antigenic similare cu tulpina de referință A/Victoria/361/2011, parte componentă a grupului genetic 3C și, de asemenea, componentă a coctailului vaccinal antigripal recomandat de OMS pentru vaccinare în sezonul 2012-2013, comparativ cu vaccinul antigripal recomandat de OMS pentru sezonul precedent, 2011-2012, în care componenta A(H3N2) a fost prezentată de tulpina A/Perth/16/2009. Din tulpinile de virusuri gripale testate, doar A/Moldova/78/2012 a avut o reactivitate redusă cu panelul de seruri de referință (Tabelul 4.2) [174-177].

Tab.4.2. Particularitățile antigenice ale virusurilor gripale A(H3N2) identificate în perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2011-2012

Virusuri	Grupul genetic	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>								
				Seruri de referință (seruri de dihone)								
				A/Perth 16/09 F35/11	A/Vic 208/09 F7/10	A/Ala 5/10 F27/10 group 5	A/HK 3969/11 F27/11 group 3C	A/Stock 18/11 F28/11 group 3A	A/Iowa 19/2010 F15/11 group 6	A/Fin 190/11 F01/12 group 3C	A/Norway 1789/11 F03/12 group 3B	A/Vic 361/11 F05/12 group 3C
<b>Virusuri de referință</b>												
A/Perth/16/2009		2009-07-04	E3/E1	1280	80	160	640	160	160	320	640	160
A/Victoria/208/2009		2009-06-02	E3/E1	1280	5120	1280	2560	2560	5120	5120	5120	2560
A/Alabama/5/2010		2010-07-13	MK1/M2/ SIAT1	40	40	160	320	160	160	160	320	80
A/Hong Kong/3969/2011		2011-05-19	MDCK3	160	320	320	1280	640	640	1280	1280	640
A/Stockholm/18/2011		2011-03-28	MDCK2/ SIAT2	80	160	160	640	640	160	320	640	640
A/Iowa/19/2010		2010-12-30	E3/E1	640	5120	1280	2560	2560	5120	2560	5120	2560
A/Finland/190/2011		2011-11-25	Cx/SIAT3	160	320	320	640	640	640	1280	1280	640
A/Norway/1789/2011		2011-08-02	Cx/SIAT3	160	320	320	640	640	640	1280	1280	640
A/Victoria/361/2011		2011-10-24	E3/E1	320	640	640	1280	160	1280	1280	1280	5120
<b>Virusuri testate</b>												
A/Moldova/99/2012	3C	2012-03-21	MDCK2/ SIAT1	80	80	40	160	80	80	320	160	320
A/Moldova/94/2012	3C	2012-03-14	MDCK2/ SIAT1	80	80	40	320	80	80	320	80	320
A/Moldova/78/2012	3C	2012-03-06	MDCK2/ SIAT3	40	<	<	80	80	40	80	80	80
A/Moldova/101/2012	3C	2012-03-21	MDCK2/ SIAT3	80	80	40	160	80	80	320	160	320
1. < = <40				Vaccine				Vaccine				

➤ **Studierea particularităților genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în sezonul epidemic 2011-2012**

Secvențierea genei HA a tulpinilor de virus gripal A(H3N2) a pus în evidență prezența substituțiilor de aminoacizi T212A, N312S, A198S, V223I, S45N, T48I, Q33R, N278K, stabilindu-se faptul că substituția S45N conduce la obținerea unui situs de glicozilare, însă fără de efecte antigenice semnificative. Aceste substituții sunt caracteristice cladei genetice Victoria/208, însă din această cladă genetică fac parte grupurile genetice 3A, 3B, 3C, 4, 5 și 6. Din analiza arborelui filogenetic reiese, că substituțiile nominalizate sunt comune cladei genetice Victoria/208 și diferite substituții corespund diferitor grupuri genetice. Astfel, tulpina A/Moldova/99/2012 posedă substituțiile Q33R și N278K specifice grupului genetic 3C și în același timp posedă și substituțiile specifice cladei genetice Victoria/208 (Figura 4.2).

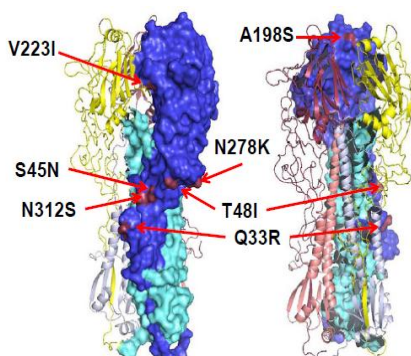


Fig.4.2. Locațiile substituțiilor caracteristice grupului genetic 3C, clada Victoria/208 caracteristice virusurilor gripale A(H3N2).

Totodată, din grupul genetic 3C fac parte și tulpinile de referință A/Norway/1789/2011, A/Hong Kong/3969/2011 și respectiv tulpina vaccinală A/Victoria/361/2011 componente în panelul serurilor de referință la evaluarea particularităților antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale identificate în Republica Moldova (Figura 4.3, Tabelul 4.2).

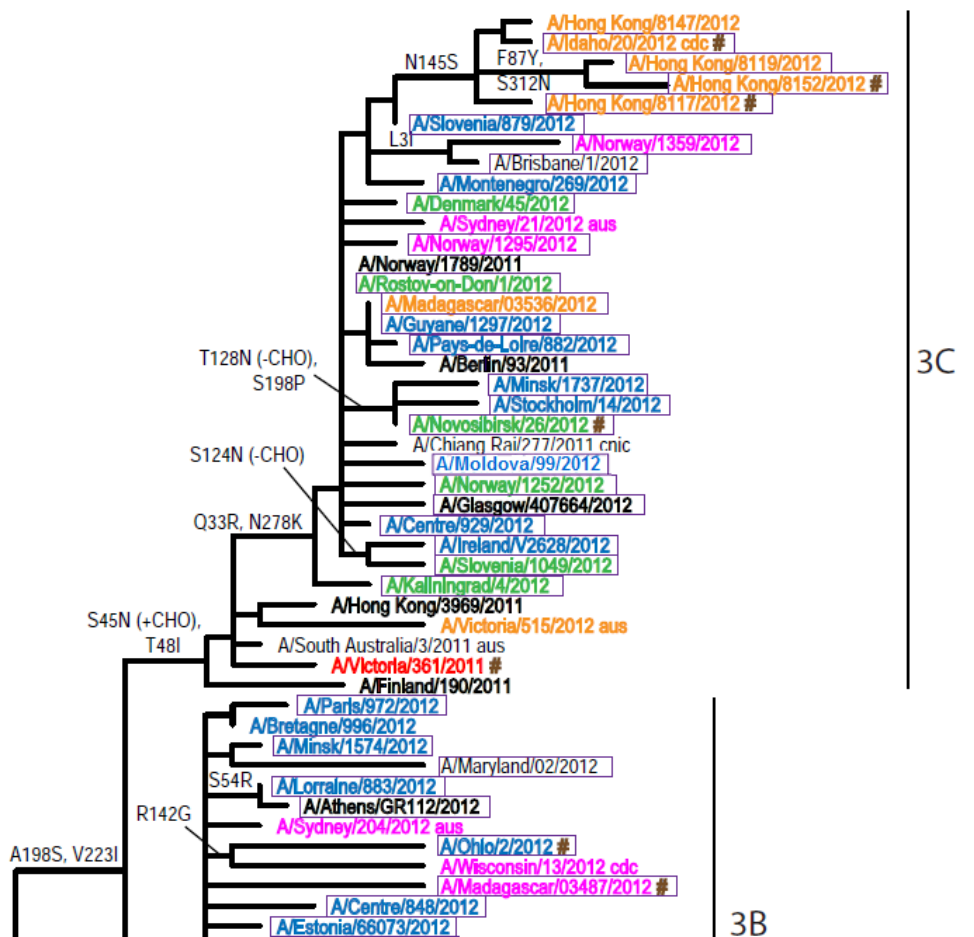


Fig.4.3. Fragment al comparației filogenetice a virusurilor gripale A(H3N2), gena HA (regiunea HA2), sezonul epidemic 2011 – 2012 [177].

Analiza rezultatelor comparației filogenetice efectuate în baza arborilor filogenetici globali a atestat că secvențele genei NA a virusurilor gripale A(H3N2) posedă substituțiile de aminoacizi T9S, D97N, E258K și N329T – specifice grupului genetic 3C, clada genetică Victoria/208 și respectiv tulpinii de virus gripal A/Moldova/99/2012 (Figura 4.4). Substituțiile nominalizate atât la nivelul genei HA, cât și la nivelul genei NA nu poartă semnificație antigenică semnificativă, fapt dovedit și prin analiza antigenică ale tulpinilor de virusuri gripale studiate.

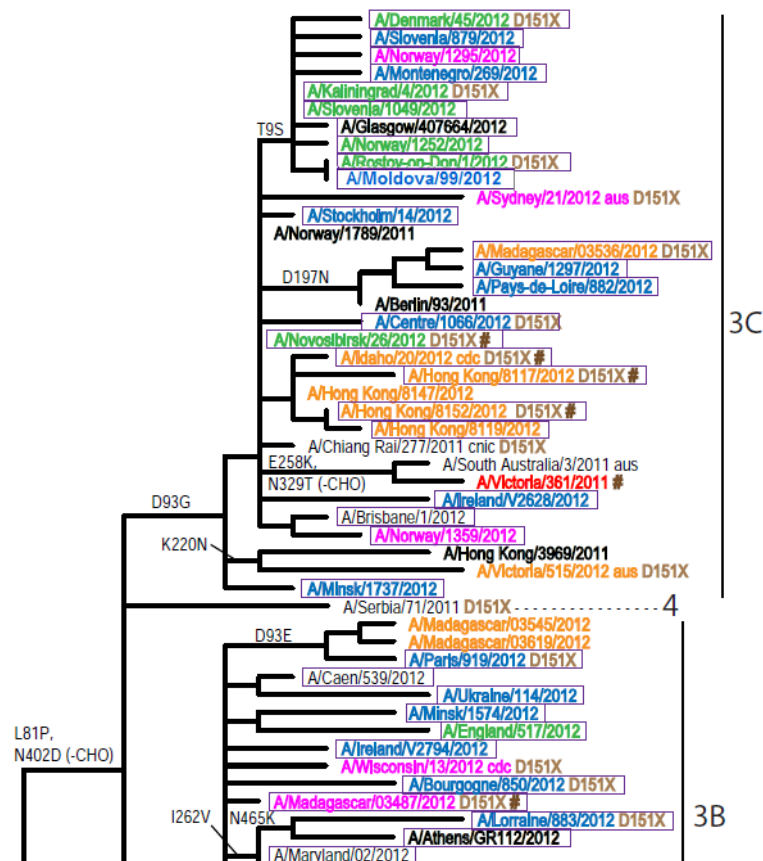


Fig.4.4. Fragment din arborele filogenetic al virusurilor gripale A(H3N2), gena NA (regiunea HA2), perioada post-pandemică (2011 – 2012) [177].

➤ **Determinarea particularităților fenotipice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în sezonul epidemic 2011-2012**

Rezultatele determinării particularităților fenotipice au scos în evidență faptul, că tulpinile de virusuri gripale izolate și identificate în Republica Moldova posedă substituția S31N în proteina M2 (reprezintă un canal ionic ce participă la reglarea pH în procesul „dezbrăcării” virusului în endosomi și în aparatul Golgi, unde are loc sinteza HA), fapt stabilit la secvențierea genei M ale acestor tulpini, substituție responsabilă de inducerea rezistenței față de adamantane: amantadina și remantadina. Totodată, a fost stabilit că tulpinile de virusuri gripale A(H3N2) au prezentat un fenotip sensibil față de inhibitorii neuraminidazei: oseltamivir și zanamivir [174-176].

Prin urmare, sezonul epidemic 2011-2012 s-a caracterizat prin circulația virusurilor gripale A(H3N2) și B, cu predominarea tulpinii de virus gripal A(H3N2). Rezultatele evaluării particularităților antigenice și genotipice au pus în evidență faptul apartenenței virusului gripal A(H3N2) la grupul genetic 3C, clada Victoria/208, din care a făcut parte și tulpina A/Victoria/361/2011, componentă a vaccinului antigripal recomandat de OMS pentru sezonul viitor. Cu toate acestea, la nivel fenotipic s-a detectat mutația S31N responsabilă de inducerea

rezistenței virusurilor gripale A(H3N2) la adamantane, însă față de remediile antivirale de ultimă generație: oseltamivir și zanamivir, aceste tulpini de virusuri gripale au fost sensibile. O situație similară privind caracteristicile antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale A(H3N2) s-a observat în majoritatea țărilor din Europa [174-177].

#### 4.2. Rezultatele evaluării particularităților virusurilor gripale în sezonul 2012-2013

Sezonul epidemic 2012-2013 s-a caracterizat printr-un pattern sporit cu o răspândire geografică extinsă, intensitate înaltă și o tendință în creștere a procesului epidemic, fapt ce a condus la un impact semnificativ asupra sistemului de sănătate cu înregistrarea a 12 cazuri de deces [178-180].

Prin urmare, în sezonul epidemic 2012-2013, au fost investigate 662 specimene cu material biologic colectat de la persoanele cu diagnosticul clinic prezumtiv „Gripă”, „IRVA” și „SARI”. La persoanele cu diagnosticul clinic prezumtiv „Gripă” din 144 (21,8%) de specimene ARN virusului gripal A(H1N1)pdm a fost detectat în 40 (27,8%), ARN virusului gripal A(H3N2) detectat în 7 (4,9%) mostre cu material biologic, ARN virusului gripal B a fost detectat în 46 (31,9%), iar prezența ARN virusurilor gripale A(H1N1)pdm + B a fost detectată în 1 (0,7%) probă. La pacienții cu diagnosticul clinic prezumtiv „IRVA” ARN virusurilor gripale au fost detectate, după cum urmează: ARN virusului gripal A(H1N1)pdm – în 36 (10,2%) cazuri, ARN virusului gripal A(H3N2) – în 10 (2,8%), ARN virusului gripal B – în 30 (8,5%) și prezența ARN virusurilor gripale A(H1N1)pdm + B a fost detectată în 1 (0,3%) probă din totalul de 353 (53,3%) probe. Din eșantionul de 165 (24,9%) mostre cu material biologic colectat de la pacienții cu diagnosticul prezumtiv „SARI” în 36 (21,8%) probe s-a detectat ARN virusului gripal A(H1N1)pdm, în 5 (3,0%) – a fost detectat ARN virusului A(H3N2), în 19 (11,5%) – ARN virusului gripal de tip B și în 2 (1,2%) – s-au detectat virusurile gripale A(H1N1)pdm + B (Tabelul 4.3).

Tab. 4.3 Rezultatele identificării virusurilor gripale prin rRT-PCR în dependență de diagnosticul clinic prezumtiv în sezonul 2012-2013.

Spectrul virusurilor detectate	Numărul probelor investigate prin rRT-PCR											
	Gripă			IRVA			SARI			Total		
	invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive	
		abs.	%		abs.	%		abs.	%		abs.	%
A(H1N1) pdm	144	40	27,8	353	36	10,2	165	36	21,8	662	112	16,9
A(H3N2)	144	7	4,9	353	10	2,8	165	5	3,0	662	22	3,3
B	144	46	31,9	353	30	8,5	165	19	11,5	662	95	14,4
A(H1N1) pdm + B	144	1	0,7	353	1	0,3	165	2	1,2	662	4	0,6
<b>Total</b>	<b>144</b>	<b>94</b>	<b>65,3</b>	<b>353</b>	<b>77</b>	<b>21,8</b>	<b>165</b>	<b>62</b>	<b>37,5</b>	<b>662</b>	<b>233</b>	<b>35,2</b>



Astfel, gripa în sezonul 2012-2013 a fost etiologic cauzată de trei virusuri gripale cu predominarea virusului gripal A(H1N1)pdm cu o pondere de 48,1%, codominarea virusului gripal de tip B – 40,8%, ponderea virusului gripal A(H3N2) a constituit 9,4%, iar cea mai mică pondere a fost stabilită în cazul prezenței ARN virusurilor gripale A(H1N1)pdm și B doar de 1,7% (Figura 4.5). O situație similară în perioada nominalizată s-a atestat în majoritatea țărilor din Europa [178-182].

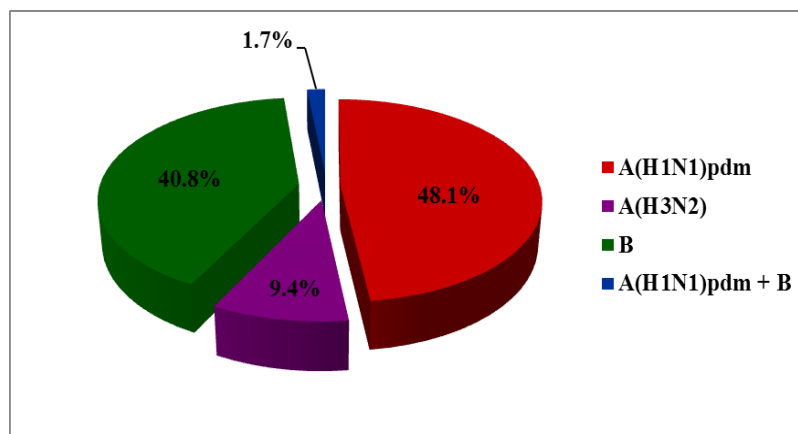


Fig. 4.5. Ponderea virusurilor gripale identificate prin rRT-PCR în perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2012-2013

➤ **Evaluarea particularităților antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în sezonul epidemic 2012-2013**

În perioada sezonului rece 2012-2013 a fost pusă în evidență cocirculația a trei tulpini de virusuri gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B. Evaluarea rezultatelor privind particularitățile antigenice ale virusurilor gripale circulante în Republica Moldova a fost efectuată cu utilizarea diferitor panele de seruri standard specifice fiecărui tip/subtip de virus gripal, produse de Centrul Colaborativ pentru Gripă al OMS, Institutul Național de Cercetări în Medicină, Londra, Marea Britanie.

Astfel, particularitățile antigenice ale virusurilor gripale A(H1N1)pdm au fost evaluate prin utilizarea panelului de seruri de referință A/California/7/2009, A/Bayern/69/2009, A/Lviv/N6/2009, A/Christchurch/16/2010, A/Hong Kong/3934/2011, A/Astrakhan/1/2011, A/St. Petersburg/27/2011, A/St. Petersburg/100/2011, A/Hong Kong/5659/2012. În linii generale, toate tulpinile de virus gripal testate au reacționat cu panelul prezentat. Însă, tulpina A/Moldova/335/2013 a avut o reactivitate redusă cu tulpina vaccinală A/California/7/2009 și A/Bayern/69/2009, comparativ cu celelalte tulpini de virusuri gripale testate. De asemenea, cu serul de referință A/Bayern/69/2009 o reactivitate redusă au prezentat și tulpinile A/Moldova/258/2013, A/Moldova/294/2013 și A/Moldova/179/2013. Acest fapt, s-a datorat, probabil, apartenenței virusurilor testate la grupul genetic 6C, iar tulpina A/Bayern/69/2009 nu

face parte din acest grup genetic, cu toate că, este antigenic similară tulpinii vaccinale A/California/7/2009 (Tabelul 4.4) [180-185].

Tab.4.4. Particularitățile antigenice ale virusurilor gripale A(H1N1)pdm identificate în perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2012-2013

Virusuri Grupul genetic	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>								
			Seruri de referință (seruri de dihere)								
			A/Cal 7/09 F30/11	A/Bayern 69/09 F11/11	A/Lviv N6/09 C4/09/34	A/Chch 16/2010 F30/10 Group 4	A/HK 3934/11 F21/11 Group 3	A/Astrak 1/11 F22/11 Group 5	A/St. P 27/11 F23/11 Group 6	A/St. P 100/11 F24/11 Group 7	A/HK 5659/11 F30/12 Group 6
<b>Virusuri de referință</b>											
A/California/7/2009	2009-04-09	E1/E2	1280	1280	1280	640	1280	640	640	1280	640
A/Bayern/69/2009	2009-07-01	MDCK5/ MDCK1	160	320	160	80	40	80	80	80	40
A/Lviv/N6/2009	2009-10-27	MDCK4/S 1/MDCK3	640	1280	640	320	160	160	160	160	320
A/Christchurch/16/2010	2010-07-12	E2/E2	1280	1280	2560	5120	2560	2560	1280	5120	2560
A/Hong Kong/3934/2011	2011-03-29	MDCK2/ MDCK4	640	160	640	640	1280	640	640	1280	1280
A/Astrakhan/1/2011	2011-02-28	MDCK1/ MDCK5	1280	640	1280	1280	2560	1280	1280	2560	5120
A/St. Petersburg/27/2011	2011-02-14	E1/E3	2560	2560	2560	1280	2560	2560	5120	5120	5120
A/St. Petersburg/100/2011	2011-03-14	E1/E2	1280	640	1280	1280	2560	2560	2560	5120	2560
A/Hong Kong/5659/2012	2012-05-21	MDCK4/ MDCK1	1280	640	2560	1280	2560	1280	1280	5120	2560
<b>Virusuri testate Gr. gen.</b>											
A/Moldova/335/2013 6C	2013-03-05	MDCK2	320	320	640	640	1280	640	640	1280	1280
A/Moldova/317/2013 6C	2013-03-04	MDCK1/ MDCK1	640	1280	1280	640	1280	640	640	1280	1280
A/Moldova/258/2013 6C	2013-02-27	MDCK3	640	320	640	640	1280	1280	1280	2560	1280
A/Moldova/294/2013 6C	2013-03-01	MDCK2	640	320	640	640	1280	1280	1280	2560	1280
A/Moldova/157/2013 6C	2013-02-12	MDCK3	1280	640	1280	1280	2560	1280	2560	2560	2560
A/Moldova/158/2013	2013-02-12	MDCK3	1280	640	1280	640	2560	1280	1280	2560	2560
A/Moldova/179/2013 6C	2013-02-15	MDCK3	640	320	640	640	1280	1280	1280	2560	2560
A/Moldova/216/2013	2013-02-20	MDCK3	1280	640	1280	640	1280	1280	2560	5120	2560
A/Moldova/229/2013 6C	2013-02-18	MDCK3	1280	640	1280	640	2560	1280	2560	2560	2560
A/Moldova/433/2013 6C	2013-03-29	MDCK3	1280	640	1280	640	2560	1280	2560	5120	5120
1. <= <40											

Tulpinile de virus gripal A(H3N2) au fost caracterizate antigenic cu utilizarea a două paneluri de seruri de referință. Prin urmare, particularitățile antigenice ale tulpinilor de virus gripal A(H3N2) – A/Moldova/326/2013, A/Moldova/242/2013 și A/Moldova/235/2013 au fost evaluate cu utilizarea panelului de seruri standard A/Perth/16/2009, A/Victoria/208/2009, A/Alabama/5/2010, A/Stockholm/18/2011, A/Iowa/19/2010, A/Victoria/361/2011, A/Berlin/93/2011, A/Victoria/361/2011, A/Athens/112/2012, A/Texas/50/2012, A/Hawaii/22/2012 – prezentând o reactivitate ușor redusă. Totodată, s-a observat că o reactivitate moderată au avut tulpinile de virusuri testate față de tulpina vaccinală A/Victoria/361/2011 și alte tulpini antigenic similare care fac parte din același grup genetic 3C (Tabelul 4.5).

Tab.4.5. Caracteristica antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) identificate în perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2012-2013

Virusuri  Grupul genetic	Data colectării probei	Istoric ul pasajel or	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>										
			Seruri de referință (seruri de dihone)										
			A/Perth 16/09 F17/11	A/Vic 208/09 F7/10	A/Ala 5/10 F27/10 Group 5	A/Stock 18/11 F28/11 Group 3A	A/Iowa 19/10 F15/11 Group 6	A/Vic 361/11 Egg F/35/12 Group 3C	A/Berlin 93/11 T/C F11/12 Group 3C	A/Vic 361/11 T/C F14/12 Group 3C	A/Athens 112/12 F16/12 Group 3B	A/Texas 50/12 F36/12 Group 3C	A/Hawai 22/12 F37/12 Group 3C
<b>Virusuri de referință</b>													
A/Perth/16/2009	2009-07-04	E3/E2	640	40	160	160	80	160	320	320	320	320	80
A/Victoria/208/2009	2009-06-02	E3/E2	640	2560	640	1280	1280	1280	2560	1280	1280	5120	2560
A/Alabama/5/2010	2010-07-13	MK1/C2/ SIAT2	<	<	40	80	80	80	160	160	160	160	40
A/Stockholm/18/2011	2011-03-28	SIAT5	40	80	40	320	80	80	320	160	320	320	160
A/Iowa/19/2010	2010-12-30	E3/E2	320	640	320	640	640	640	1280	1280	1280	2560	640
A/Victoria/361/2011	2011-10-24	E3/E2	320	320	160	160	320	1280	640	320	160	1280	640
A/Berlin/93/2011	2011-12-07	NVD3/ SIAT5	160	160	160	320	160	320	1280	640	640	1280	320
A/Victoria/361/2011	2011-10-24	MDCK2 /SIAT2	40	80	80	160	80	80	640	320	320	640	160
A/Athens/112/2012	2012-02-01	SIAT6	160	160	320	640	320	320	1280	1280	1280	1280	640
A/Texas/50/2012	2012-04-15	E5/E1	320	640	320	640	640	640	1280	1280	1280	2560	1280
A/Hawaii/22/2012	2012-07-09	E4/E1	320	640	320	640	640	640	1280	640	1280	2560	2560
<b>Virusuri testate</b>													
A/Moldova/326/2013	2013-03-07	MDCK2 /SIAT1	<	80	40	160	80	80	320	320	160	320	160
A/Moldova/242/2013	2013-02-22	MDCK2 /SIAT1	40	80	40	320	80	80	320	320	320	320	160
A/Moldova/235/2013	2013-02-21	MDCK2 /SIAT3	<	<	<	160	80	160	640	320	640	640	320
1. < = <40													

Evaluarea particularităților antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale A/Moldova/440/2013, A/Moldova/368/2013 și A/Moldova/262/2013 s-a realizat prin utilizarea panelului de seruri de referință A/Perth/16/2009, A/Alabama/5/2010, A/Stockholm/18/2011, A/Iowa/19/2010, A/Victoria/361/2011, A/Berlin/93/2011, A/Victoria/361/2011, A/Athens/112/2012, A/Texas/50/2012, A/Samara/73/2013 – observându-se, de asemenea, o reactivitate ușor redusă. Rezultatele obținute demonstrează că tulpinile de virus gripal testate sunt antigenic similare cu tulpinile de virus gripal care fac parte din grupul genetic 3C, inclusiv subgrupul 3 (Tabelul 4.6) [180-185].

Tab.4.6. Caracteristica antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) identificate în perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2012-2013

Virusuri	Grup genetic	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>									
				Seruri de referință (seruri de dihoze)									
				A/Perth 16/09 F35/11	A/Ala 5/10 F27/10	A/Stock 18/11 F28/11	A/Iowa 19/10 F15/11	A/Vic 361/11 Egg F35/12	A/Berlin 93/11 T/C F11/12	A/Vic 361/11 T/C F34/12	A/Athens 112/12 F16/12	A/Texas 50/12 Egg F36/12	A/Samara 73/13 F24/13
Virusuri de referință													
A/Perth/16/2009		2009-07-04	E3/E2	1280	320	320	320	160	640	320	640	640	320
A/Alabama/5/2010	5	2010-07-13	MK1/C1/ SIAT2	<	80	80	80	80	160	160	160	160	160
A/Stockholm/18/2011	3A	2011-03-28	SIAT4	160	160	640	320	160	640	640	640	1280	640
A/Iowa/19/2010	6	2010-12-30	E3/E2	320	640	1280	2560	640	1280	1280	1280	2560	1280
A/Victoria/361/2011	3C	2011-10-24	E3/E2	320	320	320	640	2560	1280	640	320	2560	640
A/Berlin/93/2011	3C.1	2011-12-07	NVD3/ SIAT4	160	320	320	320	320	1280	640	1280	1280	1280
A/Victoria/361/2011	3C.1	2011-10-24	MDCK2/ SIAT5	160	320	320	320	160	1280	640	1280	1280	640
A/Athens/112/2012	3B	2012-02-01	SIAT7	80	160	320	160	160	640	320	640	640	640
A/Texas/50/2012	3C.1	2012-04-15	E5/E2	640	640	1280	1280	1280	1280	1280	1280	5120	1280
A/Samara/73/2013	3C.3	2013-03-12	C1/SIAT2	160	320	640	640	320	1280	1280	1280	2560	1280
Virusuri testate													
A/Moldova/440/2013	3C.3	2013-04-02	SIAT2	<	40	40	40	80	320	320	320	640	640
A/Moldova/368/2013	3C.3	2013-03-14	SIAT2	<	40	160	160	160	640	320	320	640	640
A/Moldova/262/2013	3C.3	2013-02-27	SIAT2	<	80	160	80	160	640	320	320	640	640
1. < = <40													

Particularitățile antigenice ale virusurilor gripale de tip B, izolate și identificate în Republica Moldova în sezonul epidemic 2012-2013 au fost studiate în reacția RHAI (vezi Capitolul 2) cu utilizarea panelului de seruri de referință B/Florida/4/2006, B/Brisbane/3/2007, B/Wisconsin/1/2010, B/Stockholm/12/2011, B/Estonia/55669/2011, B/Novosibirsk/1/2012, B/Hong Kong/3577/2012, B/Massachusetts/02/2012, prezentând o reactivitate redusă față de tulpina vaccinală B/Wisconsin/1/2010 care aparține liniei B/Victoria/2/1987 (B/Victoria). În același timp, tulpinile de virus gripal testate au prezentat o reactivitate moderată față de tulpina B/Massachusetts/02/2012 – tulpină care a fost recomandată de OMS pentru a fi introdusă în componența vaccinului antigripal trivalent pentru sezonul viitor [182-184]. Rezultatele caracterizării antigenice au demonstrat că tulpinile de virus gripal testate au fost antigenic similare cu tulpinile de referință aparținente liniei B/Yamagata/16/1988 (B/Yamagata) și care fac parte din grupul genetic 2, frecvent întâlnit la virusurile gripale de tip B circulante în sezonul 2012-2013 în alte țări ale Europei (Tabelul 4.7) [182].

Tab.4.7. Particularitățile antigenice ale virusurilor gripale de tip B identificate în perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2012-2013

Virusuri	Grupul genetic	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>									
				Seruri de referință (seruri de dihoire)									
				B/FI <sup>3</sup> 4/06 SH479	B/FI <sup>1</sup> 4/06 F1/10	B/Bris <sup>2</sup> 3/07 F21/12	B/Wis <sup>2</sup> 1/10 F24/12	B/Stock <sup>2</sup> 12/11 F34/11	B/Eston <sup>2</sup> 55669/11 F26/11	B/Novo <sup>2</sup> 1/12 F31/12	B/HK <sup>2</sup> 3577/12 F33/12	B/Mass <sup>2</sup> 2/12 Egg F2/13	B/Mass <sup>2</sup> 2/12 T/C F15/13
Virusuri de referință													
B/Florida/4/2006	1	2006-12-15	E7/E1	5120	640	1280	320	640	320	40	320	1280	320
B/Brisbane/3/2007	2	2007-09-03	E2/E2	5120	1280	1280	320	640	320	40	640	1280	320
B/Wisconsin/1/2010	3	2007-08-07	E3/E2	640	320	160	320	320	10	40	40	320	80
B/Stockholm/12/2011	3	2007-08-07	E4/E1	1280	320	160	160	320	10	40	40	320	40
B/Estonia/55669/2011	2	2011-03-14	MDCK2/ MDCK3	1280	160	160	80	320	640	40	640	160	640
B/Novosibirsk/1/2012	3	2012-02-14	C2/MDCK2	640	160	80	160	320	80	160	160	160	160
B/Hong Kong/3577/2012	2	2012-06-13	MDCK4	1280	160	160	80	320	1280	80	640	160	640
B/Massachusetts/02/2012	2	2012-03-13	E3/E3	2560	640	640	160	320	160	40	320	640	160
B/Massachusetts/02/2012	2	2012-03-13	MDCK1/C2/ MDCK3	5120	640	320	160	320	640	80	640	640	640
Virusuri testate													
B/Moldova/130/2013	2	2013-02-11	MDCK1/ MDCK1	2560	160	160	160	320	640	80	640	320	640
B/Moldova/366/2013	2	2013-03-13	MDCK2	1280	80	160	80	320	640	40	640	160	320
B/Moldova/395/2013		2013-03-21	MDCK2	1280	160	160	80	320	640	40	640	320	320
B/Moldova/431/2013	2	2013-03-27	MDCK2	320	40	80	40	320	640	20	320	160	640
B/Moldova/458/2013	2	2013-04-07	MDCK2	320	20	80	40	160	640	40	640	160	640
B/Moldova/459/2013		2013-04-08	MDCK2	160	20	80	80	320	40	80	80	160	160
B/Moldova/462/2013	2	2013-04-10	MDCK2	160	20	80	40	160	640	40	320	160	320
B/Moldova/279/2013	2	2013-02-26	MDCK3	640	80	80	40	160	320	20	320	160	320

1. < = <40

➤ Studierea particularităților genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în sezonul epidemic 2012-2013

Studierea particularităților genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm izolate și identificate în Republica Moldova în sezonul epidemic 2012-2013 a fost efectuată prin comparația filogenetică a tulpinilor de virusuri gripale circulante la nivel de mapamond în baza arborelui filogenetic global (Figura 4.6).

Astfel, secvențierea genei HA a tulpinilor de virusuri gripale nominalizate a demonstrat prezența substituțiilor comune de aminoacizi S203T, D97N în gena HA1 și E47K, S124N în gena HA2, precum și prezența substituțiilor specifice de aminoacizi V234I și K283E în gena HA1 și E172K în gena HA2. Prezența acestor substituții specifice au poziționat tulpinile de virus gripal A(H1N1)pdm circulante în Republica Moldova în grupul genetic 6 (în baza substituțiilor comune) subgrupul genetic C (prezența substituțiilor specifice) (Figura 4.7).

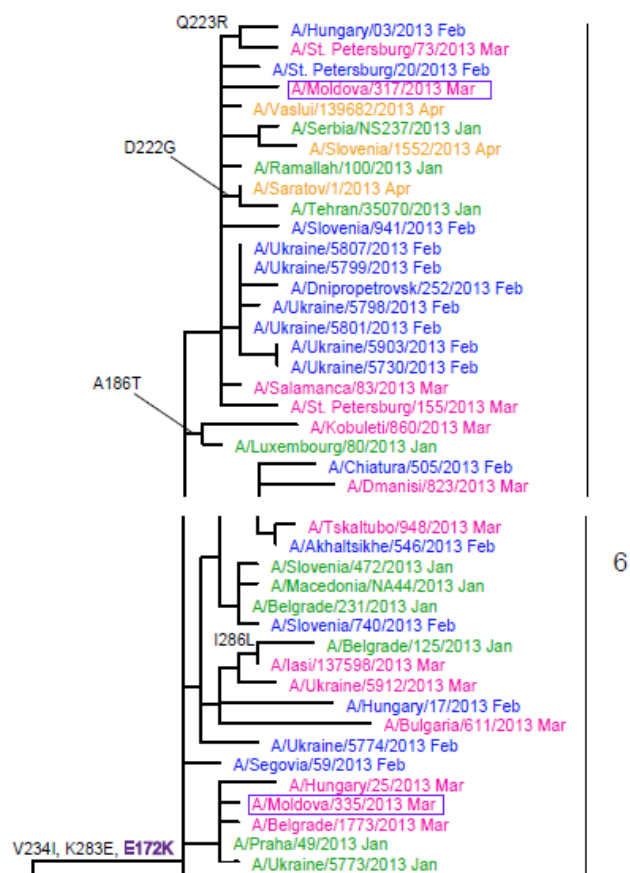


Fig.4.6. Fragment al analizei filogenetice a virusurilor gripale A(H1N1)pdm, gena HA, sezonul epidemic 2012 – 2013 [185].

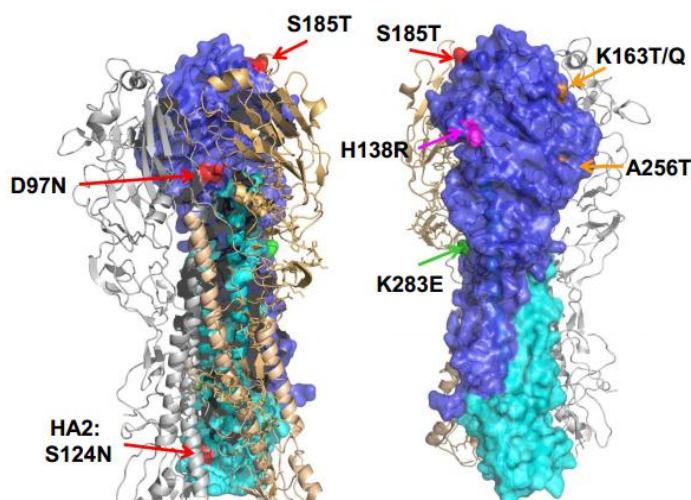


Fig.4.7. Locusurile substituțiilor caracteristice genei HA H1 din grupul genetic 6 ale virusurilor gripale A(H1N1)pdm din sezonul 2012-2013 [185].

Rezultatele secvențierii genei NA a tulpinilor de virus gripal A(H1N1)pdm nominalizate au atestat prezența substituțiilor comune de aminoacizi N248D, V106I, V241I, N369K, N44S – caracteristice grupului genetic 6 și a substituțiilor specifice I106V, N200S, V83A și R220K – caracteristice pentru subgrupul genetic C (Figura 4.8).

Așadar, aceste rezultate atestă că tulpinile de virus gripal A(H1N1)pdm fac parte din grupul genetic 6C, totodată, fiind antigenic similare cu tulpina vaccinală A/California/7/2009 și, respectiv, cu alte tulpini de referință care fac parte din grupul genetic 6 (Tabelul 4.4). Interesant este faptul, că majoritatea tulpinilor de virus gripal A(H1N1)pdm circulante în diferite țări ale lumii în perioada nominalizată, s-au poziționat în grupurile genetice 6 și 7 (Figura 4.6 și 4.8) [182, 185].

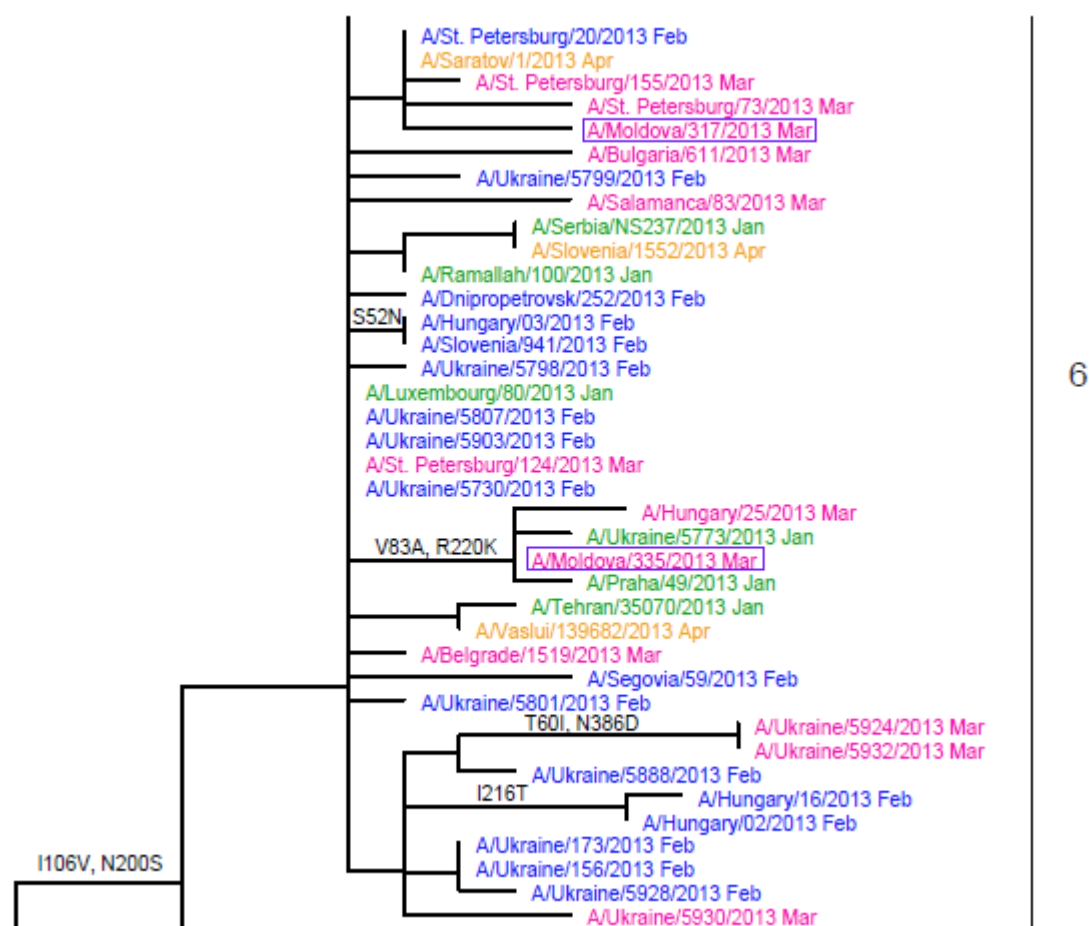


Fig.4.8. Fragment din arborele filogenetic al virusurilor gripale A(H1N1)pdm, gena NA, sezonul 2012 – 2013 [185].

Analiza particularităților genotipice la nivelul genei HA a tulpinilor de virus gripal A(H3N2) izolate și identificate în Republica Moldova a pus în evidență, de asemenea, prezența substituțiilor comune de aminoacizi N145S, V223I, D158N, A198S, N312S, S45N (+CHO), T48I, S145N, G186V – caracteristice pentru toate tulpinile de virus gripal A(H3N2) și, în mod special, pentru virusurile de referință A/Perth/16/2009, A/Iowa/19/2010, A/Stockholm/18/2011 și A/Athens/112/2012 utilizate în panelul de seruri standard la caracterizarea antigenică a tulpinilor de virus gripal A(H3N2). Prezența substituțiilor specifice s-a caracterizat prin substituțiile de aminoacizi Q33R, N278K, V186G, N145S, T128A (-CHO), N312S care sunt

tipice atât virusurilor de referință A/Victoria/361/2011, A/Berlin/93/2011 și A/Samara/73/2013 utilizate în panelul de seruri standard la analiza antigenică, cât și tulpinilor de virus gripal A(H3N2) A/Moldova/262/2013, A/Moldova/368/2013, A/Moldova/326/2013 și A/Moldova/440/2013. Însă, tulpina A/Moldova/440/2013, concomitent cu substituțiile enumerate, mai posedă și substituția V18M la nivelul genei HA2 (Figura 4.9).

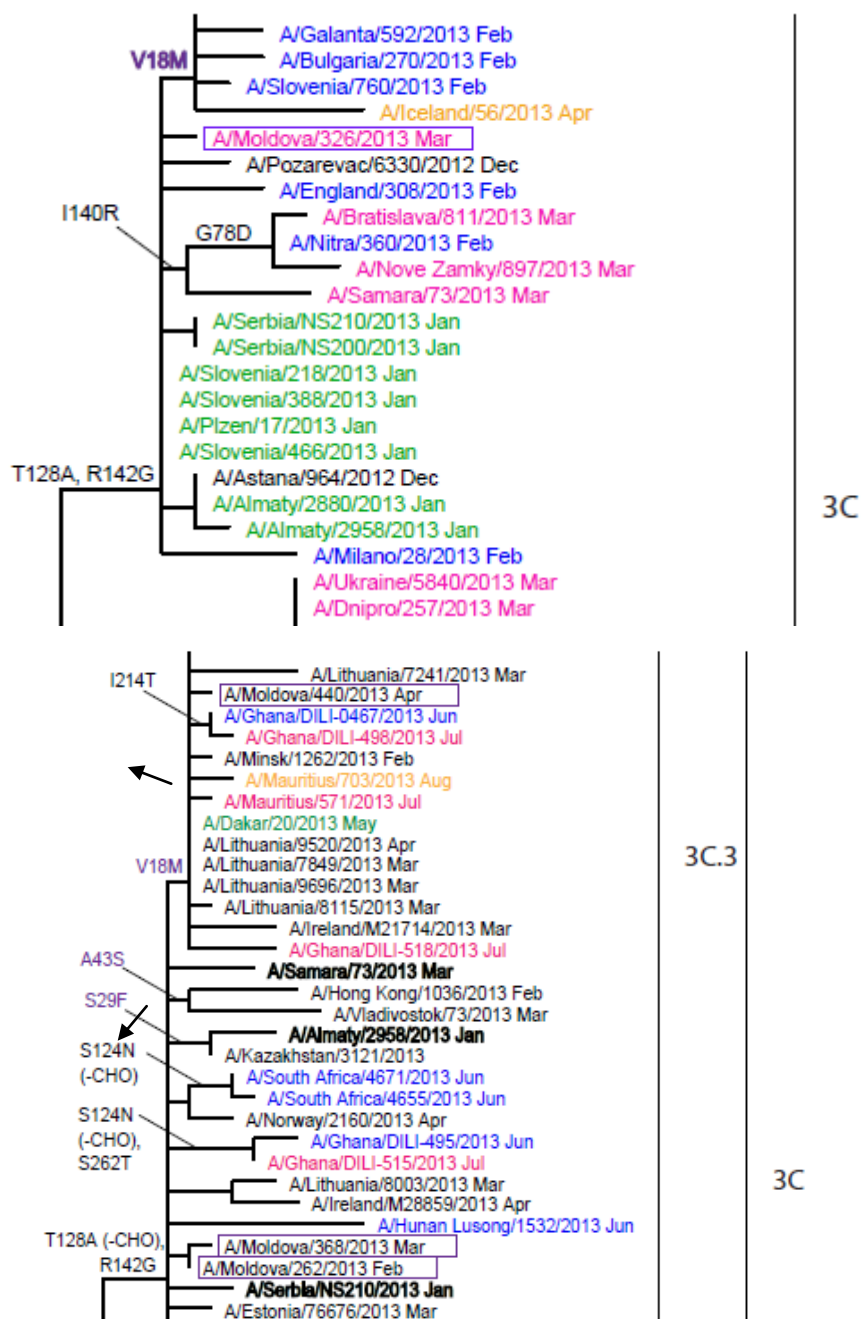


Fig.4.9. Fragmente din comparația filogenetică a virusurilor gripale A(H3N2), gena HA, sezonul epidemic 2012 – 2013 [185].



Este necesar de menționat, că substituția comună S45N (+CHO) conduce la obținerea unui situs de glicozilare în plus, iar substituția specifică T128A (-CHO) conduce la pierderea unui situs de glicozilare la nivelul genei HA a tulpinilor de virus gripal A(H3N2) din grupul genetic 3C.3 (Figura 4.10).

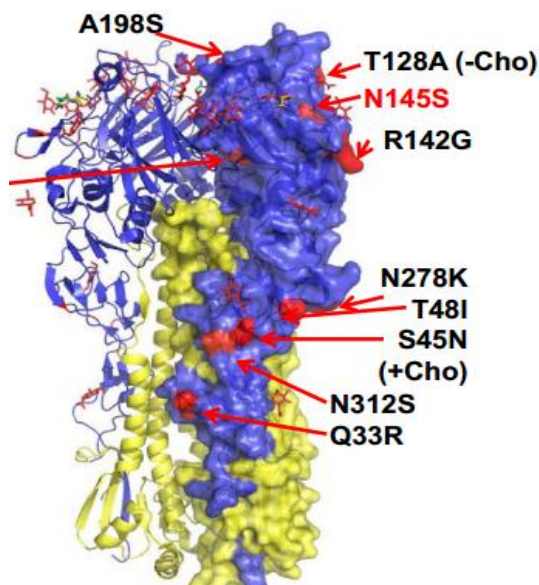


Fig.4.10. Locusurile substituțiilor caracteristice genei HA H3 din grupul genetic 3C.3 ale virusurilor gripale A(H3N2) din sezonul 2012-2013.

Secvențele genei NA ale virusurilor gripale A(H3N2) luate în acest studiu grupează diferit aceste tulpini de virus gripal comparativ cu poziționarea lor la nivelul grupului genetic 3C în arborele filogenetic în baza genei HA. Este de remarcă faptul, că virusurile din grupul genetic 3C poartă substituții duble S367N și K369T în gena NA, care are ca rezultat adăugarea unui situs de glicozilare la reziduul 367. Majoritatea tulpinilor de virus gripal A(H3N2) circulante în perioada nominalizată au pierdut un situs potențial de glicozilare la reziduul 402. Totodată, analiza secvențelor genei NA N2 a demonstrat că tulpina de virus gripal A/Moldova/326/2013 nu posedă substituții de aminoacizi în pozițiile 148 și 151 care influențează capacitatea de aglutinare a hematiilor prin intermediul neuraminidazei, iar tulpina A/Moldova/440/2013 conține substituția de aminoacizi S44P specifică pentru grupul genetic 3C.3, însă care nu posedă efecte antigenice semnificative (Figura 4.11).

Din cele menționate mai sus, reiese că datorită prezenței substituțiilor specifice tulpinile de virus gripal A(H3N2) circulante în Republica Moldova se întrunesc în grupul genetic 3C.3 (grup genetic 3, subgrupul C, sub-subgrupul 3) al cladei genetice A/Victoria 208, unul din grupurile genetice predominante pentru tulpinile circulante la nivel global în perioada nominalizată [182, 185].

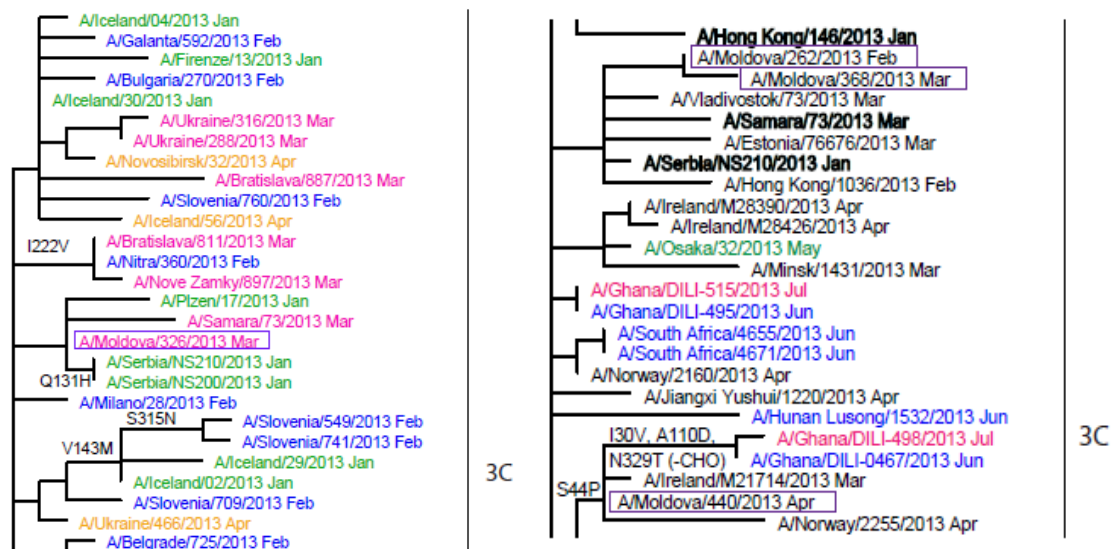


Fig.4.11. Fragmente ale comparației filogenetice a virusurilor gripale A(H3N2), gena NA, sezonul epidemic 2012 – 2013 [185].

Evaluarea caracteristicilor genotipice ale virusurilor gripale de tip B circulante în perioada sezonului epidemic 2012-2013 în Republica Moldova a fost efectuată prin secvențierea genelor HA și NA și construirea arborelui filogenetic global al tulpinilor de virus gripal de tip B ce aparțin liniei B/Yamagata. Secvențierea genei HA a atestat prezența substituțiilor de aminoacizi T181A, D196N (+CHO) – comune, T46I, A358T, S170T, T75N, T121S – specifice. Aceste substituții sunt caracteristice grupului genetic 2 de virusuri gripale B în care s-au încadrat și tulpinile de referință B/Estonia/55669/2011, B/Hong Kong/3577/2012, inclusiv, tulpina vaccinală B/Massachusetts/02/2012. Prezența substituției D196N (+CHO) a condus la obținerea unui situs de glicozilare în poziția 196 a genei HA a virusurilor gripale de tip B linia B/Yamagata încadrate în grupul genetic 2.

Comparația filogenetică efectuată în baza arborelui filogenetic global a demonstrat că tulpinile de virus gripal B izolate și identificate în Republica Moldova s-au poziționat diferit în interiorul grupului genetic 2, fapt confirmat prin prezența diferitor substituții. Așadar, s-a observat că tulpina B/Moldova/462/2013 posedă substituția T121S care a poziționat-o distant de celelalte tulpini din Moldova (Figura 4.12). Tulpinile B/Moldova/366/2013, B/Moldova/458/2013, B/Moldova/130/2013 și B/Moldova/279/2013 au fost grupate separat datorită posesiei substituției de aminoacizi T75N din ramificarea arborelui filogenetic cu substituțiile specifice S170T și A358T. În același timp, tulpina B/Moldova/431/2013 s-a poziționat în arborele filogenetic distinct de tulpinile nominalizate datorită substituției T46I (Figura 4.12).

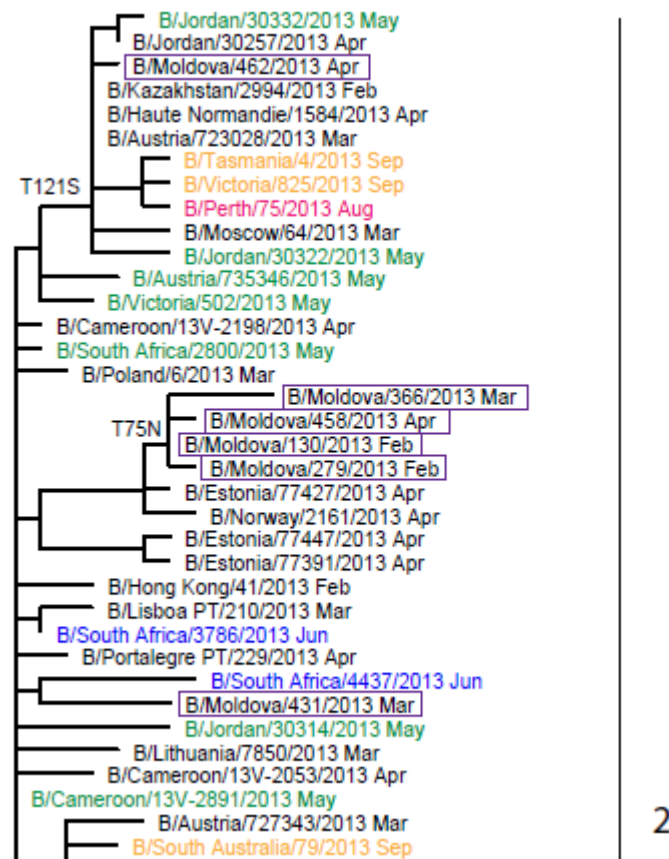
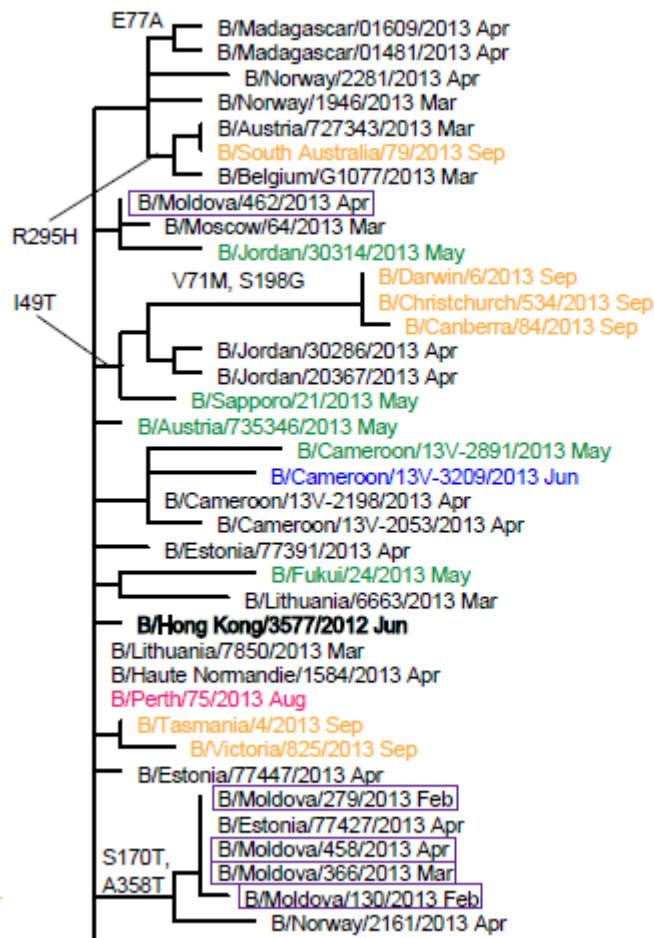


Fig.4.12. Fragment din arborele filogenetic al virusurilor gripale de tip B (linia Yamagata), gena HA, sezonul 2012 – 2013 [185].

Rezultatele secvențierii genei NA a tulpinilor de virus gripal nominalizate au pus în evidență prezența substituțiilor de aminoacizi T106I, S295R care s-au dovedit a fi comune pentru toate ramurile arborelui filogenetic global, încadrându-se în grupul genetic 2. Similar tabloului atestat la secvențierea genei HA, tulpinile de virus gripal B circulante în Republica Moldova în perioada nominalizată, în interiorul grupului genetic 2 s-au poziționat diferit datorită substituțiilor specifice de aminoacizi. Astfel, tulpina B/Moldova/462/2013 s-a poziționat distant datorită substituției A290V. Tulpinile B/Moldova/366/2013, B/Moldova/458/2013, B/Moldova/130/2013 și B/Moldova/279/2013 au purtat aceleași substituții de aminoacizi și în aceleași poziții S107T și A358T care le-au amplasat împreună, similar secvențelor obținute la nivelul genei HA ale acestor virusuri. Iar tulpina B/Moldova/431/2013 posedând substituția de aminoacizi A55T s-a poziționat separat de celelalte tulpini nominalizate (Figura 4.13) [182].



2

Fig.4.13. Fragment din arborele filogenetic al virusurilor gripale de tip B (linia Yamagata), gena NA, sezonul 2012 – 2013 [185].

➤ **Evaluarea particularităților fenotipice ale tulpinilor de virusuri gripale identificate în sezonul epidemic 2012-2013**

Rezultatele evaluării particularităților fenotipice au scos în evidență faptul, că tulpinile de virusuri gripale de tip A: A(H1N1)pdm și A(H3N2), izolate și identificate în Republica Moldova posedă substituția S31N în proteina M2, fapt stabilit la secvențierea genei M ale acestor tulpini, substituție responsabilă de inducerea rezistenței față de adamantane: amantadina și remantadina.

Analiza sensibilității fenotipice la remediile antivirale de ultimă generație (oseltamivir și zanamivir) a virusurilor gripale A: A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B, izolate și identificate în Republica Moldova în perioada nominalizată, a fost efectuată în testul de inhibare a neuraminidazei. Tulpinile de virusuri gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B, testate, au fost totalmente sensibile la ambii inhibitori, ceea ce poate fi confirmat prin rezultatele analizei genotipice care nu a prezentat evidențe semnificative la nivelul genei NA privind rezistența acestor tulpini la oseltamivir și zanamivir [182, 185].

Prin urmare, gripa în Republica Moldova în sezonul epidemic 2012-2013 a fost etiologic cauzată de virusurile gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B. Comparativ cu sezonul 2011-2012, în această perioadă (post-pandemică) s-a observat circulația preponderentă a virusului gripal A(H1N1)pdm care a lipsit din circulație în sezonul epidemic precedent în Republica Moldova. Evaluarea particularităților antigenice și genotipice a pus în evidență faptul că tulpinile de virus gripal A(H1N1)pdm și A(H3N2) au fost antigenic similare cu tulpinile vaccinale A/California/7/2009 și A/Victoria/361/2011, respectiv, recomandate de OMS pentru a fi incluse în componența vaccinului antigripal trivalent pentru sezonul viitor 2013-2014. Totodată, aceste tulpini de virusuri gripale la nivel genotipic s-au poziționat în grupurile genetice: 6C pentru tulpinile A(H1N1)pdm și 3C.3 pentru A(H3N2). Relevant este faptul, că tulpinile de virus gripal de tip B circulante în Republica Moldova în perioada nominalizată la nivel genotipic (componente ale grupului genetic 2) și antigenic au fost similare cu tulpina B/Massachusetts/02/2012 linia B/Yamagata, tulpină componentă a coctailului vaccinal antigripal trivalent recomandat de OMS pentru vaccinare în Emisfera de Nord pentru sezonul viitor. Comparativ cu sezoanele epidemice precedente 2010-2011 și 2011-2012, când în circulație se aflau preponderent virusurile gripale de tip B linia B/Victoria, în sezonul 2012-2013, acestea au fost înlocuite în mare parte cu tulpinile B/Yamagata, fapt confirmat de rezultatele analizelor antigenice și genotipice – fenomen întâlnit în multe țări la nivel global [182-185]. Evaluarea rezultatelor analizei fenotipice a atestat că tulpinile de virusuri gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B, circulante în perioada nominalizată, au fost sensibile la remediile antivirale de ultimă generație oseltamivir și zanamivir.

#### **4.3. Studierea și evaluarea particularităților virusurilor gripale în sezonul 2013-2014**

Sezonul epidemic 2013-2014 s-a caracterizat printr-un pattern scăzut cu o răspândire geografică regională, intensitate joasă și o tendință în descreștere a procesului epidemic, precum și la un impact nesemnificativ asupra sistemului de sănătate [186].

Pentru studierea și evaluarea particularităților virusurilor gripale circulante în Republica Moldova în sezonul epidemic 2013-2014, au fost investigate 604 specimene cu material biologic colectat de la persoanele cu diagnosticul clinic prezumtiv „Gripă”, „IRVA” și „SARI”. La persoanele cu diagnosticul clinic prezumtiv „Gripă” din 65 (11,0%) de specimene în 41 (63,1%) mostre cu material biologic a fost detectat ARN virusului gripal A(H3N2). La pacienții cu diagnosticul clinic prezumtiv „IRVA” ARN virusului gripal A(H3N2) – în 63 (16,2%) cazuri, iar ARN virusului gripal A(H1N1)pdm a fost detectat în 1 (0,3%) din totalul de 388 (64,2%) probe. Din eșantionul de 151 (25,0%) mostre cu material biologic colectat de la pacienții cu

diagnosticul prezumtiv „SARI” în 25 (13,0%) probe s-a detectat ARN virusului gripal A(H3N2) (Tabelul 4.8).

Tab. 4.8. Rezultatele identificării virusurilor gripale prin rRT-PCR în dependență de diagnosticul clinic prezumtiv în sezonul 2013-2014.

Spectrul virusurilor detectate	Numărul probelor investigate prin rRT-PCR, pe cauze:											
	Gripă			IRVA			SARI			Total		
	invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive		invest.	Pozitive	
		abs.	%		abs.	%		abs.	%		abs.	%
A(H1N1)pdm	65	-	-	388	1	0,3	151	-	-	604	1	0,2
A(H3N2)	65	41	63,1	388	63	16,2	151	25	13,0	604	129	21,3
B	65	-	-	388	-	-	151	-	-	604	-	-
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>41</b>	<b>63,1</b>	<b>388</b>	<b>64</b>	<b>16,5</b>	<b>151</b>	<b>25</b>	<b>13,0</b>	<b>604</b>	<b>130</b>	<b>21,5</b>

Prin urmare, gripa în sezonul 2013-2014 a fost etiologic cauzată predominant de virusul gripal A(H3N2), ponderea căruia a constituit 99,2%, iar ponderea virusului gripal A(H1N1)pdm a constituit doar 0,8% (Figura 4.14). O situație similară în Republica Moldova s-a atestat în sezonul 2011-2012, pe când în majoritatea țărilor din Europa tulpina dominantă s-a fost A(H1N1)pdm [186, 187].

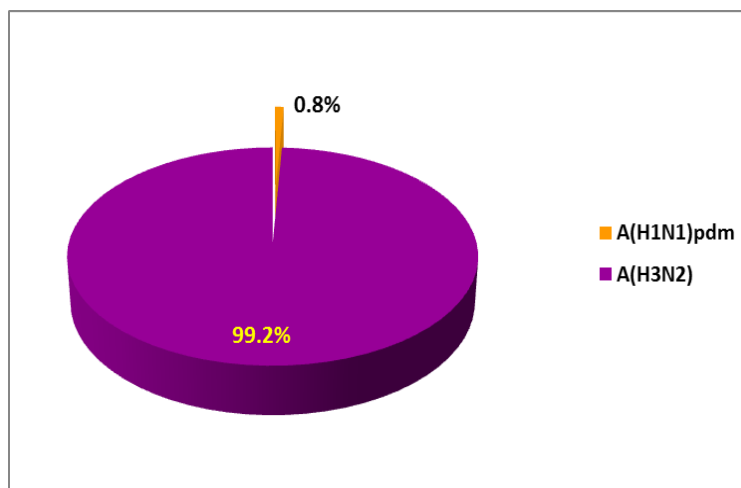


Fig. 4.14. Ponderea virusurilor gripale detectate în sezonul epidemic 2013-2014

➤ **Particularitățile antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în sezonul epidemic 2013-2014**

După cum s-a menționat, în sezonul epidemic 2013-2014 în Republica Moldova s-au aflat în circulație predominant tulpinile de virus gripal A(H3N2) care au fost caracterizate antigenic cu panelul de seruri de referință A/Perth/16/2009, A/Stockholm/18/2011, A/Iowa/19/2010, A/Victoria/361/2011, A/Athens/112/2012, A/Texas/50/2012,

A/Samara/73/2013, A/Serbia/NS-210/2013, A/Hong Kong/146/2013, NIB-85 (A/Almaty/2958/2013) (Tabelul 4.9).

Tab.4.9. Caracteristica antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) identificate în sezonul epidemic 2013-2014

Virusuri	Grupul genetic	Data colectării probei	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a Hemaglutinării <sup>1</sup>									
				Seruri de referință (seruri de dihoze)									
				A/Perth 16/09 F35/11	A/Stock 18/11 F28/11 3A	A/Iowa 19/10 F15/11 6	A/Vic 361/11 T/C F11/13 3C.1	A/Athens 112/12 F16/12 3B	A/Texas 50/12 Egg F42/13 3C.1	A/Samara 73/13 F24/13 3C.3	A/Serbia NS- 210/13 F39/13 3C.3	A/HK 146/13 F40/13 3C.2	NIB-85 F45/13 3C.3
<b>Virusuri de referință</b>													
A/Perth/16/2009		2009-07-04	E3/E3	640	160	160	160	320	160	160	80	160	160
A/Stockholm/18/2011	3A	2011-03-28	SIAT4	80	640	320	320	640	320	1280	320	320	320
A/Iowa/19/2010	6	2010-12-30	E3/E2	320	1280	1280	1280	2560	1280	1280	640	1280	640
A/Victoria/361/2011	3C.1	2011-10-24	MDCK2/ SIAT6	80	320	160	640	640	320	640	320	320	320
A/Athens/112/2012	3B	2012-02-01	SIAT4	80	320	160	640	640	320	640	320	320	320
A/Texas/50/2012	3C.1	2012-04-15	E5/E2	640	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280
A/Samara/73/2013	3C.3	2013-03-12	C1/SIAT2	160	640	320	1280	1280	320	1280	640	1280	640
A/Serbia/NS-210/2013	3C.3	2013-01-18	E5/E1	320	1280	640	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280
A/Hong Kong/146/2013	3C.2	2013-01-11	E5/E1	320	2560	1280	640	1280	640	1280	640	2560	640
NIB-85 A/Almaty/2958/2013	3C.3	2013-01-27	E5/E1	640	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280	1280
<b>Virusuri testate</b>													
A/Moldova/696/2013	3C.3	2013-12-17	MDCK2/ SIAT1	40	160	160	320	640	160	640	320	320	320
A/Moldova/7/2014	3C.3	2014-01-15	SIAT2	<	80	80	160	320	80	320	80	80	80
A/Moldova/28/2014	3C.3	2014-01-14	MDCK2	<	160	80	160	640	640	640	320	80	160
A/Moldova/41/2014	3C.3	2014-01-19	MDCK3	40	320	80	80	320	80	620	160	80	160
A/Moldova/49/2014	3C.3	2014-01-23	MDCK3	<	160	80	80	160	160	320	160	160	320
A/Moldova/59/2014	3C.3	2014-01-29	MDCK3	<	160	160	320	640	160	160	160	320	320
A/Moldova/73/2014	3C.3	2014-01-29	MDCK3	40	80	80	160	320	320	80	80	80	160
A/Moldova/82/2014	3C.3	2014-02-03	MDCK3	40	160	80	160	640	160	160	80	160	320
A/Moldova/108/2014	3C.3	2014-02-07	MDCK3	40	320	80	320	80	160	320	80	80	320
A/Moldova/117/2014	3C.3	2014-02-12	MDCK2	<	160	80	160	80	160	160	80	80	160
A/Moldova/124/2014	3C.3	2014-02-06	MDCK2	40	320	80	320	80	320	620	160	80	160
A/Moldova/130/2014	3C.3	2014-02-12	MDCK2	<	160	80	160	80	80	320	160	160	320
A/Moldova/131/2014	3C.3	2014-02-11	MDCK1	<	160	160	640	320	160	160	160	320	320
A/Moldova/133/2014	3C.3	2014-02-11	MDCK3	40	80	80	320	160	160	80	80	80	160
A/Moldova/136/2014	3C.3	2014-02-10	MDCK3	40	160	80	640	160	80	160	160	320	320
A/Moldova/138/2014	3C.3	2014-02-10	MDCK1	40	320	80	320	80	320	80	80	80	160
A/Moldova/146/2014	3C.3	2014-02-10	MDCK2	<	160	80	160	80	80	160	80	160	320
A/Moldova/168/2014	3C.3	2014-02-20	MDCK3	40	320	80	320	80	320	320	80	80	320
1. < = <40													
Vaccin													

Rezultatele analizei antigenice au atestat faptul că tulpinile izolate și identificate în Republica Moldova au prezentat o reactivitate moderată practic cu toate serurile de referință, în afară de tulpina A/Perth/16/2009 – tulpină vaccinală în sezonul 2010-2011, ceea ce demonstrează că tulpinile de virusuri gripale evoluează în timp prin „antigenic drift” – variație antigenică minoră, caracteristică practic tuturor tipurilor de virusuri gripale, manifestându-se prin mutații punctiforme în genomul viral. Totodată, se poate observa similaritatea antigenică cu

tulpina vaccinală A/Texas/50/2012, precum și cu alte tulpini din panelul de seruri standard prezentat, tulpina A/Moldova/696/2013, izolată și identificată în luna decembrie 2013, ca fiind cea mai reprezentativă. Acest fapt poate fi explicat prin apartenența tulpinilor de virus gripal A(H3N2) din acest studiu la grupul genetic 3C.3 (Tabelul 4.9) [186, 188, 189].

➤ **Analiza particularităților genotipice ale tulpinilor de virus gripal circulante în sezonul epidemic 2013-2014**

Studierea particularităților genotipice a fost realizată prin secvențierea genelor HA și NA, care a permis analiza secvențelor acestor gene și, respectiv, construcția arborelui filogenetic global cu utilizarea programelor specifice (vezi capitolul 2).

Secvențierea genei HA a tulpinilor de virus gripal A(H3N2) a pus în evidență prezența substituțiilor comune de aminoacizi S45N (+CHO), T48I specifice grupului genetic 3, a substituțiilor de aminoacizi Q33R, N278K, N145S, T128A (-CHO), R142G, V186G și V18M caracteristice grupului genetic 3C, din care substituțiile T128A (-CHO), R142G, V186G și V18M sunt substituții ce pun în evidență particularitățile grupului genetic 3C.3 (Figura 4.15), inclusiv substituțiile de aminoacizi D-N în poziția 53 și A-S în poziția 43 pentru tulpina A/Moldova/7/2014 și, respectiv, substituția M-K în poziția 18 pentru tulpina A/Moldova/696/2013, care au plasat aceste tulpini în acest grup genetic.

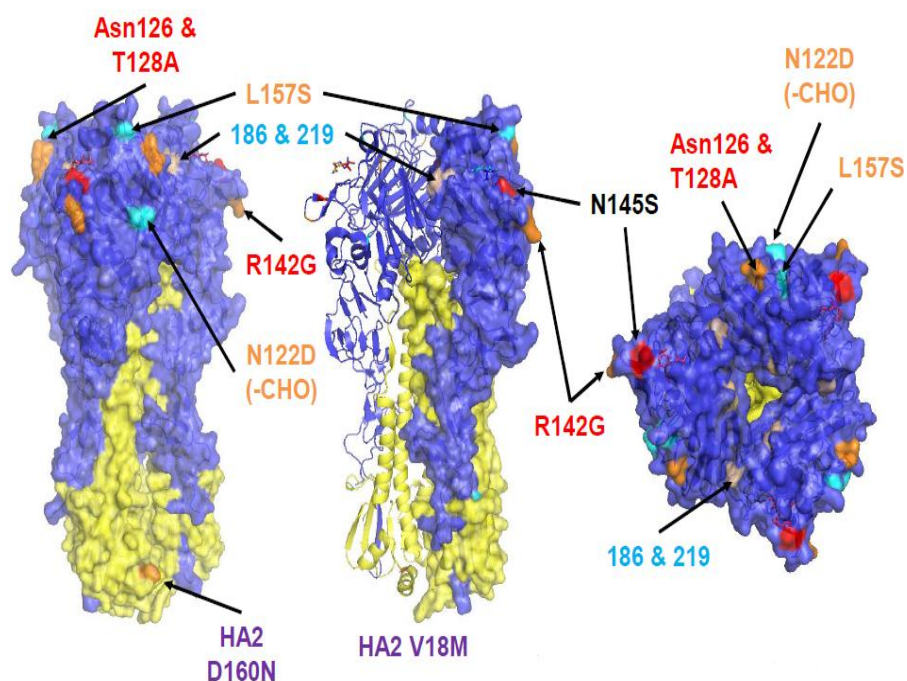


Fig.4.15. Locusurile substituțiilor T128A, R142G, N145S care definesc subgrupul genetic 3C.3. În acest subgrup genetic cluster-ele virusurilor sunt definite inclusiv și de substituțiile individuale HA2 V18M, N122D (-CHO) sau L157S [189].



O particularitate caracteristică pentru grupul genetic 3, este că substituția de aminoacizi S45N (+CHO) conduce la obținerea unui situs de glicozilare în această poziție și unește la nivel antigenic tulpinile de virus gripal A(H3N2) ce se încadrează în acest grup genetic. În același timp, substituția de aminoacizi T-A în poziția 128 conduce la pierderea situsului de glicozilare în poziția dată, astfel, grupând tulpinile A/Moldova/7/2014 și A/Moldova/696/2013 în grupul genetic 3C.3, ceea ce le conferă antigenicitate similară cu tulpinile din panelul de referință utilizat A/Samara/73/2013, A/Serbia/NS-210/2013 și A/Almaty/2958/2013 (Figura 4.16) [188, 190].

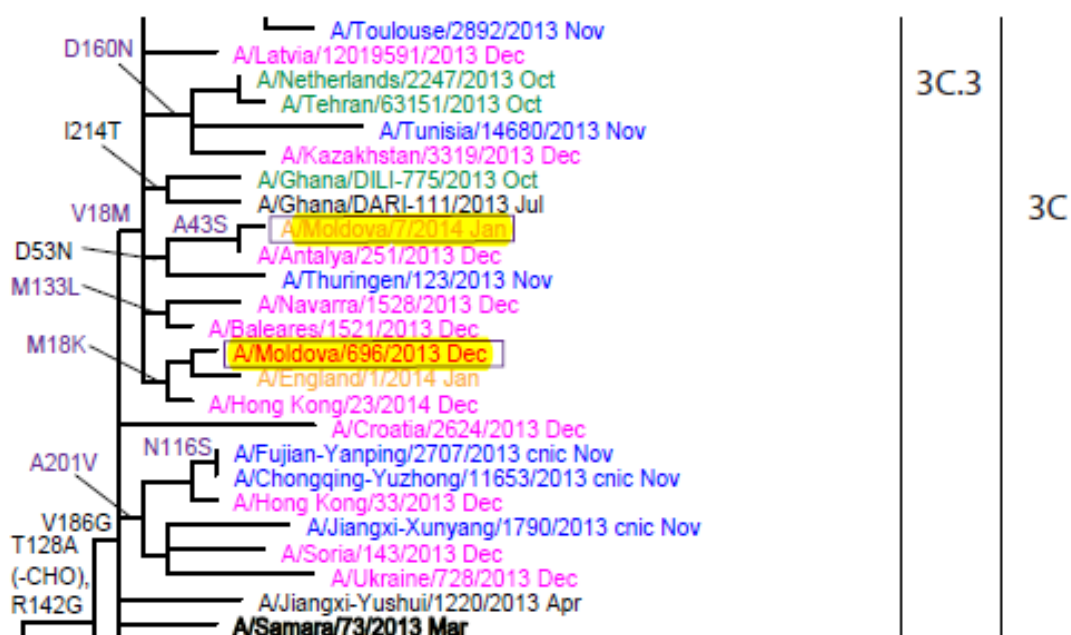


Fig.4.16. Fragment din analiza filogenetică comparativă a tulpinilor de virus gripal A(H3N2), gena HA, sezonul epidemic 2013 – 2014 [189].

Rezultatele analizei filogenetice comparative efectuate în baza secvențierii genei NA a tulpinilor de virus gripal A(H3N2) circulante în Republica Moldova în perioada nominalizată au atestat poziționarea tulpinilor în același grup genetic 3C.3, dar absolut diferit față de gena HA a acestor tulpini de virus gripal. Acest fapt s-a datorat prezenței substituțiilor de aminoacizi Y155F și D251V, substituții observate și la tulpinile A/Moldova/7/2014 și A/Moldova/696/2013, care în interiorul grupului genetic 3C.3 s-au poziționat în diferite subgrupe (Figura 4.17). Astfel, tulpina A/Moldova/7/2014 s-a poziționat în clada definită de substituțiile S335G și E381K, pe când poziționarea tulpinii A/Moldova/696/2013 a depins primordial de prezența substituțiilor S315G, Y155F și D251V, substituția aminoacizilor S-G în poziția 315 fiind comună pentru ambele tulpini precăutate (Figura 4.18).

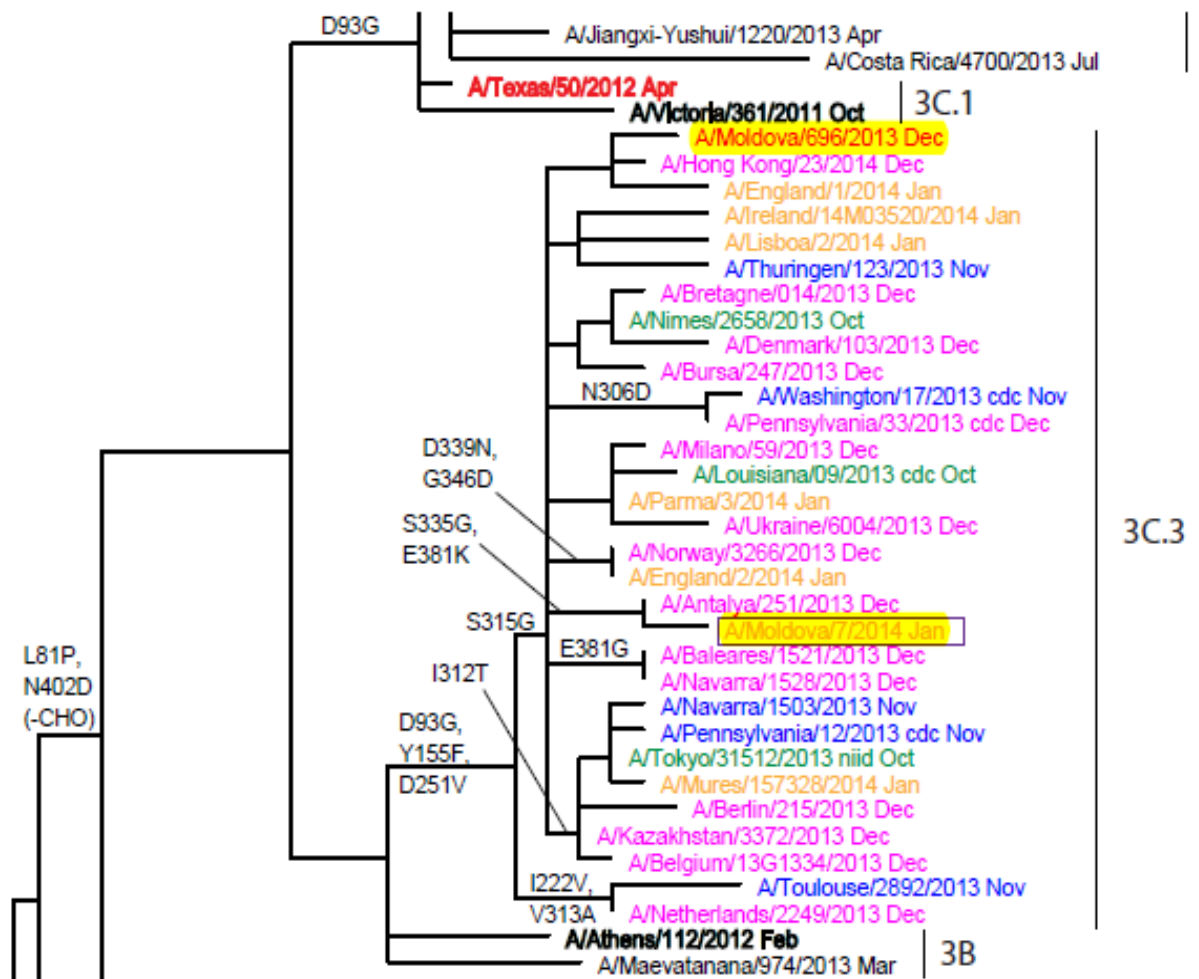


Fig.4.17. Fragment al comparației filogenetice la nivel global a virusurilor gripale A(H3N2), gena NA, sezonul epidemic 2013 – 2014 [189].

Totodată, s-a observat că aceste tulpini de virus gripal posedă și substituțiile de aminoacizi L81P, D93G și N402D (-CHO) care demonstrează evoluția tulpinilor circulante în Republica Moldova în perioada nominalizată de la tulpina vaccinală A/Perth/16/2009 – component al vaccinului antigripal trivalent recomandat de OMS pentru vaccinare în sezonul 2011-2012 [177].

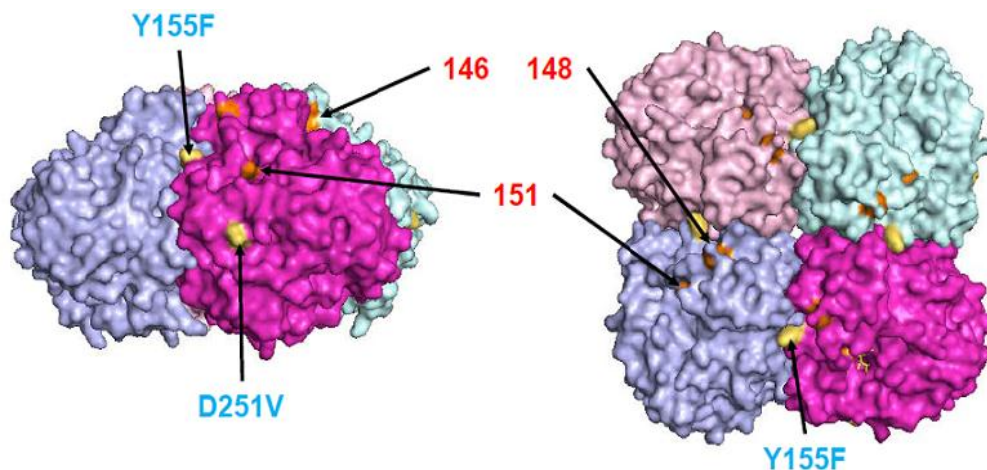


Fig.4.18. Locusurile N2-NA ale aminoacizilor care influențează aglutinarea mediată de NA și definirea subgrupurilor genetice. Sunt indicate pozițiile (146, 148 și 151) unde substituțiile de aminoacizi influențează aglutinarea NA-mediată, pozițiile (Y155F și D251V) definesc subgrupurile NA în care se includ virusurile cu genele HA 3C.3 [189].

➤ **Studierea particularităților fenotipice ale tulpinilor de virusuri gripale identificate în sezonul epidemic 2013-2014**

Analiza filogenetică comparativă efectuată în baza secvențierii genei M a tulpinilor de virus gripal A(H3N2) și a arborelui filogenetic global a pus în evidență prezența substituției S31N la nivelul genei M2 la toate tulpinile circulante la nivel global, conferind rezistență față de adamantane: amantadina și remantadina. De rând cu substituția nominalizată, tulpina A/Moldova/696/2013 s-a poziționat într-un grup separat de tulpinile de virus gripal A(H3N2) de referință, din panelul de seruri standard, datorită posesiei substituției L-V în poziția 54, de asemenea, la nivelul genei M2, având efecte antigenice minore (Figura 4.19).

De asemenea, particularitățile fenotipice ale tulpinilor de virus gripal A(H3N2) circulante în Republica Moldova în sezonul epidemic 2013-2014 au fost studiate în reacția de inhibare a neuraminidazei (MUNANA – vezi capitolul 2). În rezultat, s-a demonstrat că sensibilitatea fenotipică a tulpinilor menționate este înaltă față de remediile antivirale oseltamivir și zanamivir – inhibitori ai neuraminidazei de ultimă generație [186, 188, 190].

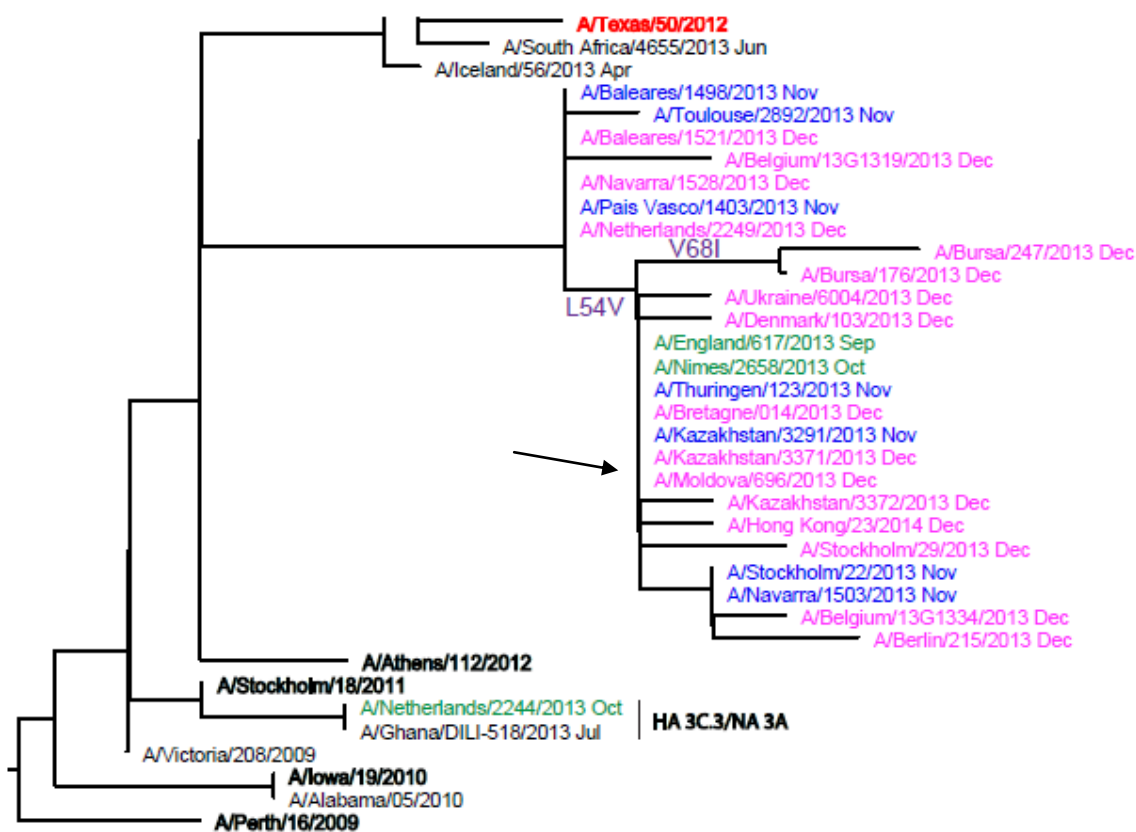


Fig.4.19. Fragment al analizei filogenetice comparative a tulpinilor de virusurile gripale A(H3N2), gena M, sezonul epidemic 2013 – 2014 [189].

În baza rezultatelor obținute la acest compartiment al studiului, putem menționa, că sezonul epidemic gripal 2013-2014 a avut o evoluție lejeră, gripa fiind etiologic cauzată preponderent de virusul gripal A(H3N2). Din punct de vedere antigenic, tulpinile de virus gripal A(H3N2) circulante în Republica Moldova în perioada dată au fost similare cu tulpinile de virusuri gripale de referință din grupul genetic 3C.3 și, nu mai puțin, cu tulpina vaccinală A/Texas/50/2012 – recomandată de OMS pentru a fi inclusă ca component al vaccinului trivalent pentru sezonul 2014-2015, care de asemenea face parte din grupul genetic 3C – cel mai frecvent întâlnit grup genetic din sezonul respectiv [186, 188-190].

De menționat, că tulpinile de virus gripal A/Moldova/696/2013 și A/Moldova/7/2014 clasându-se într-un grup genetic 3C.3 s-au poziționat diferit, fapt datorat prezenței diferitor substituții de aminoacizi în diferite poziții – fenomen caracteristic și pentru alte tulpini de virus gripal A(H3N2) la nivel global. Și cel mai important aspect, este că tulpinile nominalizate posedând substituția de aminoacizi S31N, care conferă rezistență față de adamantane, sunt sensibile față de inhibitorii NA: oseltamivir și zanamivir – remedii antivirale de ultimă generație. Aceste particularități au pus în evidență evoluția tulpinilor de virusuri gripale de la un sezon epidemic la altul prin variații antigenice minore.

#### **4.4. Valorificarea rezultatelor obținute întru optimizarea supravegherii epidemiologice și virusologice a gripei**

Studierea și evaluarea particularităților antigenice, genotipice și fenotipice ale tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B izolate și identificate în Republica Moldova în perioadele pre-pandemică, pandemică și post-pandemică, inclusiv în perioada interepidemică care a succedat perioadele esențiale precăutate în acest studiu, a permis de a elabora un șir de acte normative întru optimizarea supravegherii epidemiologice și virusologice a gripei cu realizarea măsurilor de prevenire și control.

Astfel, pe parcursul realizării studiului, cu participarea CCBV, au fost elaborate și implementate următoarele documente (Anexa 1):

1. Plan-cadru intersectorial gradual pentru combaterea efectelor pandemiei cu virusul gripal nou A(H1N1) în Republica Moldova, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 824 din 15.12.2009 – în scopul planificării și organizării intervenției autorităților publice centrale și locale, instituțiilor de stat cu atribuții în gestionarea riscului legat de declanșarea în aprilie 2009 a pandemiei de gripă, cauzată de virusul gripal nou A(H1N1) și Ordinul Ministerului Sănătății nr. 65 din 29.01.2010 „Cu privire la planul de acțiuni al Ministerului Sănătății pentru realizarea Planului-cadru intersectorial gradual pentru combaterea efectelor pandemiei cu virusul gripal nou A(H1N1) în Republica Moldova” – în scopul asigurării continuității activităților în pandemia de gripă cu virusul gripal nou A(H1N1).
2. Ordinul Ministerului Sănătății nr. 366 din 30.10.2009 „Cu privire la măsurile de vigilență și răspuns la pandemia cu noul virus gripal A(H1N1)”, Ordinul Ministerului Sănătății nr. 399 din 16.11.2009 „Cu privire la modificarea ordinului MS nr. 366 din 30.10.2009 (capitolul I, p. 6 și capitolul IV, anexa nr. 4)” și Dispoziția Ministerului Sănătății nr. 615-d din 27.12.2010 „Cu privire la unele măsuri de profilaxie a gripei în sezonul rece al anilor 2010-2011” – în scopul fortificării supravegherii epidemiologice, asigurării depistării precoce, monitorizării sistematice a cazurilor de infecții respiratorii acute cu virusul gripal nou A(H1N1) cu organizarea măsurilor de control și răspuns în teritoriile administrative ale Republicii Moldova în conformitate cu recomandările OMS, ECDC și CDC.
3. Ordinile Ministerului Sănătății nr. 495 din 15.12.2009 „Privind vaccinarea împotriva gripei pandemice a contingentelor cu risc sporit de îmbolnăvire cu vaccinul CANTGRIP”, nr. 316 din 12.05.2010 „Privind vaccinarea împotriva gripei pandemice cu vaccinul PANENZA”, nr. 1088 din 30.10.2012 „Privind vaccinarea

contra gripei sezoniere către sezonul gripal 2012-2013”, nr. 1249 din 06.11.2013 „Privind vaccinarea contra gripei sezoniere către sezonul gripal 2013-2014”, nr. 1248 din 10.11.2014 „Privind vaccinarea contra gripei sezoniere către sezonul gripal 2014-2015” – în scopul asigurării protejării contra gripei a contingentelor cu risc sporit de infectare și complicații postgripale, de importanță majoră în asigurarea funcționalității serviciilor de îngrijiri medicale și de securitate a statului.

4. Dispozițiile Ministerului Sănătății nr. 151-d din 08.04.2011, nr. 202-d din 18.05.2012, nr. 162-d din 03.05.2013, nr. 244-d din 17.05.2014 „Cu privire la suspendarea prezentării informației săptămânale privind morbiditatea prin gripă și IRVA de către CSP teritoriale” – în legătură cu diminuarea semnificativă a morbidității prin gripă și IRVA cu revenirea incidenței la limitele multianuale, caracteristice pentru perioada interepidemică.
5. Notă informativă și Hotărârea Colegiului MS din 22 septembrie 2011 “Privind situația epidemiologică prin gripă, IACRS și pneumonii în perioada sezonului 2010-2011 în RM: măsuri de control și răspuns”.
6. Ordinul Ministerului Sănătății nr. 824 din 31.10.2011 „Cu privire la perfectarea sistemului de supraveghere la gripă și infecțiile acute ale căilor respiratorii în Republica Moldova” – în scopul fortificării supravegherii epidemiologice, monitorizării sistematice a circulației gripei, infecțiilor acute ale căilor respiratorii superioare și infecțiilor respiratorii acute severe pentru organizarea măsurilor adecvate de prevenire și control și în contextul integrării în rețelele de supraveghere regionale (EuroFlu) și globale (FluNet) ale Organizației Mondiale a Sănătății.
7. Note informative și Hotărârile Comisiei Naționale Extraordinare de Sănătate Publică din 23 decembrie 2011 „Privind situația epidemiologică prin gripă, IACRS și pneumonii în perioada sezonului 2010-2011 în RM: măsuri de control și răspuns”, din 28 ianuarie 2013 „Privind situația epidemiologică la gripă, infecții acute ale căilor respiratorii superioare și infecții respiratorii acute severe și realizarea măsurilor de control și răspuns în sezonul 2012-2013”, din 27 februarie 2013 „Privind evoluția situației epidemiologice la gripă, infecții acute ale căilor respiratorii superioare și infecții respiratorii acute severe: măsuri de control și răspuns”, 13 decembrie 2013 „Privind situația epidemiologică la gripă, infecțiile acute ale căilor respiratorii superioare (IACRS) și infecțiile respiratorii acute severe (SARI) cu realizarea măsurilor de control și răspuns în sezonul 2013-2014”.

8. Dispozițiile Ministerului Sănătății nr. 356-d din 28.09.2012 „Cu privire la prezentarea informației săptămânale privind morbiditatea prin gripă, IACRS și SARI de către CSP teritoriale”, nr. 325-d din 27.09.2013 și nr. 498-d din 29.09.2014 „Cu privire la prezentarea informației săptămânale privind morbiditatea prin gripă, IACRS și SARI de către CSP teritoriale, inclusiv monitorizarea virusologică în cadrul sistemului de supraveghere sentinelă” – în scopul fortificării supravegherii epidemiologice, monitorizării sistematice a circulației virusurilor gripale, IACRS și SARI în perioada săptămânilor 40 a anului curent – 20 a anului viitor.
9. Ordinul CNSP nr. 116 din 28.11.2012 „Cu privire la fortificarea sistemului național de supraveghere și sentinelă a bolilor transmisibile cu potențial epidemic” – în scopul fortificării capacităților sistemului național de supraveghere și de tip sentinelă a bolilor transmisibile cu potențial epidemic, inclusiv gripă și infecții respiratorii acute, aprecierea gradului de pregătire și răspuns, prevenirea și managementul urgențelor de sănătate publică.
10. Ordinul Ministerului Sănătății nr. 701 din 17.06.2013 „Cu privire la petrecerea seminarului zonal privind implementarea Programului Național de combatere a hepatitelor virale B, C și D și perfecționarea sistemului de supraveghere la gripă, IACRS și SARI” – în conformitate cu planul de acțiuni pentru realizarea Programului Național de combatere a hepatitelor virale B, C și D pentru anii 2012-2016 și Ordinul MS nr. 824 din 31.10.2011 „Cu privire la perfectarea sistemului de supraveghere la gripă și infecțiile acute ale căilor respiratorii în Republica Moldova”.

Cercetările realizate în cadrul acestui studiu au contribuit la implementarea și fortificarea sistemelor de supraveghere la gripă, IACRS și SARI de rutină și, în special, de tip sentinelă, care implică nemijlocit monitorizarea virusologică a infecțiilor nominalizate. În acest scop, sistemul de rutină de supraveghere epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI include colectarea datelor privind numărul de cazuri înregistrate, spitalizate și decese prin aceste maladii – indicatori specifici, inclusiv cu colectarea probelor de la pacienții cu evoluție severă, în special cu SARI din CSP teritoriale. Realizarea supravegherii în cadrul sistemului de rutină se valorifică în perioada sezonului rece, începând cu săptămâna 40 a anului în curs până în săptămâna 20 a anului viitor. Excepție a făcut doar perioada anilor 2009-2010, când s-a declanșat prima pandemie de gripă a sec. XXI cauzată de virusul gripal de tip nou A(H1N1), tulpină denumită ulterior A(H1N1)pdm și sistemul de supraveghere a funcționat pe parcursul acestor ani. Iar din primăvara anului 2011, în baza recomandărilor OMS, ECDC și CDC s-a trecut la sistemul de supraveghere sezonier în perioada rece a anului.

De rând cu sistemul de rutină a fost implementat sistemul de supraveghere sentinelă care include 9 puncte sentinelă cu colectarea datelor ce țin de indicatorii specifici, cât și a indicatorilor nespecifici: absenteism, consumul de medicamente simptomatice și specifice, numărul de consultații și vizite la domiciliu, numărul de concedii medicale de scurtă durată, numărul de adresări la serviciul ambulanță, numărul total de internări în spital/secția de boli infecțioase și numărul de internări în secția/spitalul de boli infecțioase pe cauze de gripă, IACRS și SARI. Implementarea acestor sisteme a contribuit la fortificarea supravegherii epidemiologice, monitorizării sistematice a circulației virusurilor gripale, precum și la organizarea măsurilor adecvate de prevenire și control și în contextul integrării în rețelele de supraveghere regionale EuroFlu în perioada anilor 2008-2014, iar din 2014 rețeaua unificată a OMS și ECDC TESSy și globală FluNet ale Organizației Mondiale a Sănătății. Sistemul de supraveghere sentinelă, implementat în Republica Moldova funcționează pe parcursul întregului an, întru realizarea măsurilor de control și răspuns cu intervenții prompte în cazuri de urgență [191].

O parte componentă de o importanță majoră în cadrul sistemului de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică de tip sentinelă care a servit drept bază pentru inițierea acestui studiu este monitorizarea circulației virusurilor gripale. În acest scop, pe parcursul realizării studiului, a fost elaborat și perfecționat algoritmul de investigații la gripă, care a fost ajustat, respectiv, la recomandările OMS și rigorile impuse de pandemia din 2009-2010. Principiile de bază ale algoritmului de investigații la gripă constau în: colectarea, păstrarea și transportarea corectă a probelor de la pacienții care întrunesc definițiile de caz standard pentru Gripă, IACRS și SARI elemente descrise în ordinile și dispozițiile Ministerului Sănătății menționate mai sus.

Actualmente, algoritmul de investigații la gripă a exsudatelor nazofaringiene colectate de la persoanele cu diagnosticul prezumtiv de „Gripă”, „IRVA” și „SARI” include două compartimente cheie: 1) segmentul care include nemijlocit detecția virusurilor gripale – ține de metoda de diagnostic molecular rRT-PCR și se încheie cu eliberarea buletinului de analiză și 2) compartimentul privind investigațiile de izolare, identificare, caracterizare antigenică genotipică și fenotipică ale tulpinilor de virusuri gripale circulante. Ultima etapă a inclus selectarea celor mai reprezentative tulpini de virusuri gripale similare cu cele circulante la nivel global întru argumentarea formulei coctailurilor vaccinale antigripale (Figura 4.20).



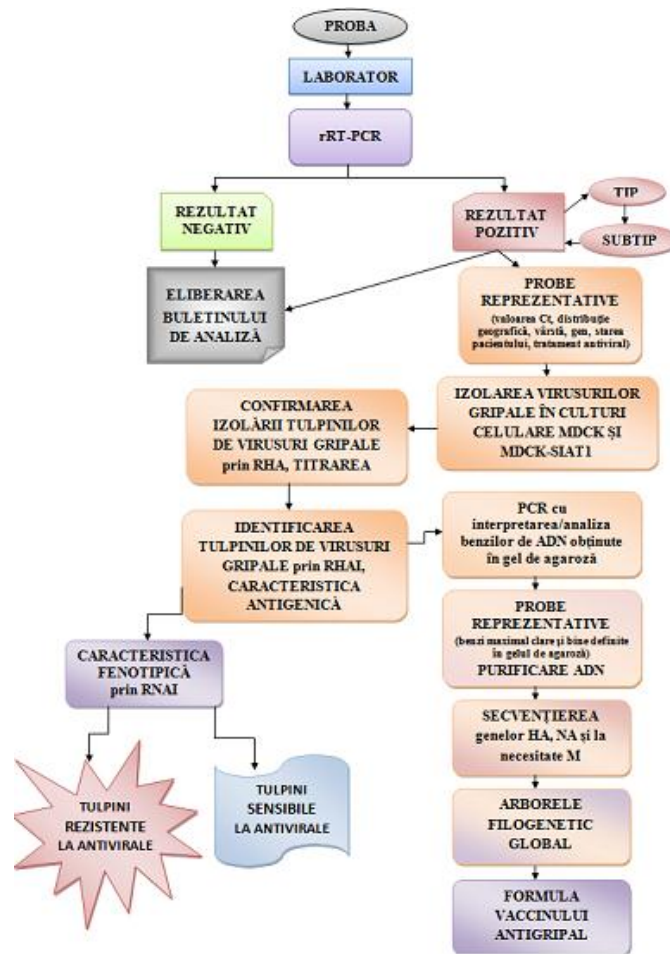


Fig. 4.20. Algoritmul investigațiilor de laborator la gripă.

Realizarea cercetărilor în baza algoritmului prezentat, valorificat prin implementarea sistemului național de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI permite de a studia și evalua particularitățile antigenice, genotipice și fenotipice ale tulpinilor de virusuri gripale circulante în Republica Moldova. Valorificarea acestui sistem racordat la exigențele OMS, ECDC și CDC contribuie la identificarea și studierea tulpinilor de virusuri gripale în cadrul Rețelei Globale de Supraveghere și Răspuns la Gripă (GISRS – Global Influenza Surveillance and Response System) din cadrul Rețelei Globale de Supraveghere la Gripă al OMS (WHO GISN – World Health Organization Global Influenza Surveillance Network) întru depistarea cât mai precoce a noilor substituții de aminoacizi care, probabil, ar putea influența atât patogenitatea, tropismul, cât și capacitatea de transmisie a virusurilor gripale de la o specie la alta, precum și posibilitatea de a evidenția factorii asociați reasortării virusurilor, în special în apariția de noi virusuri cu potențial pandemic [191].

Implementarea sistemului de supraveghere clinico-epidemiologică cu elemente de virusologie moleculară la gripă, IACRS și SARI prin realizarea măsurilor de control și răspuns, inclusiv în situații de urgență a făcut posibilă acreditarea de către OMS a laboratorului

Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale al Centrului Național de Sănătate Publică care la 18 martie 2013 a fost recunoscut ca Centru Național de Gripă și atestat ca membru al Sistemului Global de Supraveghere și Răspuns la Gripă al OMS (WHO GISRS) (Anexa 2, Anexa 3).

Așadar, realizarea investigațiilor virusologice în cadrul sistemului de supraveghere clinico-epidemiologică formează una din verigile principale ale acestui sistem și unul din obiectivele de bază care include identificarea tulpinilor de virusuri gripale emergente cu potențial epidemic și/sau pandemic.

Astfel, diagnosticul de laborator la gripă realizat prin supravegherea virusologică a virusurilor gripale circulante în Republica Moldova din cadrul sistemelor de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI de rutină și sentinelă, parte componentă a activităților GISN al OMS – reprezintă elementul cheie, atât în selecția virusurilor gripale pentru vaccin, cât și în detecția timpurie a virusurilor emergente cu potențial pandemic întru pronosticarea situației epidemiologice.

Este necesar de menționat că veridicitatea rezultatelor obținute în acest studiu a fost evaluată prin prisma panelurilor de control extern de calitate al investigațiilor la gripă în cadrul Programelor de Evaluare a Controlului Extern de Calitate pentru Detecția virusurilor gripale de tip A prin PCR (External Quality Assessment Programme for the Detection of Influenza Virus Type A by PCR) organizate în cadrul Rețelei Globale de Supraveghere și Răspuns la Gripă al OMS și CDC (CDC Influenza Molecular Diagnostic Performance Evaluation Panel) cu obținerea scorului maxim pentru fiecare panel (Anexa 4).

#### **4.5. Concluzii la capitolul 4.**

1. În perioada interepidemică (sezoanele 2011-2012, 2012-2013 și 2013-2014) s-a atestat circulația a trei virusuri gripale: A(H1N1)pdm – tulpină dominantă în sezonul 2012-2013 (48,1%); A(H3N2) – dominant în sezoanele 2011-2012 (96%), 2013-2014 (99,2%) și virusul gripal de tip B – aflat în circulație în sezoanele 2011-2012 și 2012-2013 (tulpină codominantă cu ponderea de 40,8%). De asemenea, s-a atestat prezența de coinfecții cu virusurile gripale A(H1N1)pdm și B în sezonul 2012-2013 (1,7%).
2. Studiul realizat a pus în evidență similaritatea antigenică a acestor tulpini cu tulpinile vaccinale: A/California/7/2009 (2012-2013) pentru tulpinile A(H1N1)pdm; A/Victoria/361/2011 (2011-2012, 2012-2013) și A/Texas/50/2012 (2013-2014) pentru tulpinile A(H3N2) și B/Brisbane/60/2008 linia B/Victoria (2011-2012) și B/Massachusetts/2/2012 linia B/Yamagata (2013-2014) pentru tulpinile de virus gripal de tip B. S-a atestat apartenența tulpinilor de virus gripal A(H1N1)pdm la grupul genetic 6C,

- tulpinilor de virus gripal A(H3N2) – grupul genetic 3C.3 și a tulpinilor de virus gripal de tip B – grupurile genetice 2 și 3 – grupuri genetice frecvent întâlnite la nivel global.
3. Analiza fenotipică a demonstrat faptul că tulpinile de virusuri gripale A(H3N2) și A(H1N1)pdm la nivelul genei M al genomului viral posedă substituția S31N care conferă tulpinilor de virusuri gripale menționate rezistență la amantadină și remantadină. Investigațiile privind sensibilitatea la inhibitorii neuraminidazei a virusurilor gripale izolate și identificate în perioada interepidemică au demonstrat că tulpinile de virusuri gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B circulante în Republica Moldova sunt sensibile la remediile antivirale de ultimă generație – oseltamivir și zanamivir.
  4. Valorificarea sistemului de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI de tip sentinelă racordat la exigențele OMS, ECDC și CDC prin implementarea algoritmului de investigații care include studierea tulpinilor de virusuri gripale cu evidențierea particularităților antigenice, genotipice și fenotipice au permis de integra Centrul Național de Gripă, acreditat și recunoscut de OMS, în rețeaua WHO GISN prin intermediul GISRS.
  5. Monitorizarea circulației virusurilor gripale în cadrul rețelei WHO GISN contribuie la: depistarea precoce a noilor substituții de aminoacizi care ar putea influența patogenitatea, tropismul și capacitatea de transmisie a virusurilor gripale de la o specie la alta; evidențierea factorilor determinanți ai reasortării virusurilor, în special în apariția de noi virusuri cu potențial pandemic, inclusiv apariția de tulpini de virusuri gripale rezistente la remediile antivirale aflate în uz – circumstanțe extrem de importante pentru identificarea de noi remedii antivirale cu efect antigripal.

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Teza de doctorat „Studierea și evaluarea virusurilor gripale în perioadele pandemică și interepidemică” prezintă o sinteză a rezultatelor obținute la realizarea studiului dat în scopul valorificării sistemului de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI, parte componentă a Sistemului Global de Supraveghere și Răspuns la Gripă al OMS întru identificarea cât mai precoce a variațiilor antigenice minore (drift antigenic) și majore (shift antigenic) ale virusurilor gripale, a mutațiilor genetice, în special la nivelul genelor HA, NA, inclusiv la nivelul genei M, precum și a particularităților de susceptibilitate a virusurilor gripale față de remediile antivirale de ultimă generație. Aportul personal al autoarei constă în analiza literaturii de specialitate, planificarea și executarea investigațiilor de laborator, prelucrarea statistică, generalizarea și interpretarea rezultatelor, expunerea materialelor la diverse forumuri științifice de talie națională și internațională, expoziții și publicații.

În rezultatul cercetărilor efectuate s-au concluzionat următoarele:

1. Virusurile gripale izolate și identificate în Republica Moldova fac parte din cladele virusurilor vaccinale specifice fiecărei perioade incluse în studiu: virusul A(H1N1)pdm – clada virusului A/California/7/2009, virusul A(H3N2) – clada virusului A/Perth/16/2009 și virusul gripal de tip B – clada virusului B/Brisbane/60/2008 – grupări caracteristice majorității virusurilor gripale circulante atât în țările europene, cât și la nivel global în perioadele pre-pandemică, pandemică și post-pandemică.
2. Perioada pandemică (2009-2010) s-a caracterizat prin circulația preponderentă a tulpinilor de virus gripal A(H1N1)pdm, care reprezintă un virus reasortat de o nouă combinație a genelor virusurilor gripale umane, porcine și aviare eurasiatice, fapt ce confirmă producerea unei variații antigenice majore.
3. Analiza cu evaluarea caracteristicilor tulpinilor de virus gripal A(H1N1)pdm izolate și identificate în Republica Moldova, studiate prin tehnici de secvențiere și incluse în arborele filogenetic global, a pus în evidență apariția substituției aminoacidului D222G în gena HA, detectată în special în cazuri de boală cu evoluție severă a infecției gripale, cât și în cazuri soldate cu deces.
4. În perioada post-pandemică, sezonul epidemic 2010-2011 practic s-a demonstrat substituirea din circulație a virusului gripal sezonier A(H1N1) de către virusul gripal A(H1N1)pdm. Tulpinile de virus gripal A(H3N2) identificate în perioada nominalizată nu s-au deosebit antigenic semnificativ de tulpina de referință A/Perth/16/2009 – componentă a vaccinului antigripal recomandat de OMS pentru sezonul 2010-2011. Virusurile gripale de tip B au fost

- antigenic similare cu tulpina vaccinală B/Brisbane/60/2008 linia B/Victoria, recomandată de OMS pentru a fi inclusă în coctailul vaccinal antigripal trivalent pentru sezonul 2011-2012.
5. În perioada interepidemică (sezoanele 2011-2012, 2012-2013 și 2013-2014) s-a atestat circulația a trei virusuri gripale: A(H1N1)pdm – tulpină dominantă în sezonul 2012-2013 cu o pondere de 48,1%, A(H3N2) – dominant în sezoanele 2011-2012 (96%) și 2013-2014 (99,2%) și virusul gripal de tip B – aflat în circulație în sezoanele 2011-2012 și 2012-2013 (tulpină codominantă cu ponderea de 40,8%). De asemenea, s-a atestat prezența de coinfecții cu virusurile gripale A(H1N1)pdm și B în sezonul 2012-2013 cu o pondere de 1,7%.
  6. Evaluarea particularităților antigenice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în perioada interepidemică a pus în evidență similaritatea antigenică a acestor tulpini cu tulpinile vaccinale: A/California/7/2009 (2012-2013) pentru tulpinile A(H1N1)pdm, grupul genetic 6C; A/Victoria/361/2011 (2011-2012, 2012-2013) și A/Texas/50/2012 (2013-2014) pentru tulpinile A(H3N2), grupul genetic 3C.3 și B/Brisbane/60/2008 linia B/Victoria (2011-2012) și B/Massachusetts/2/2012 linia B/Yamagata (2013-2014) pentru tulpinile de virus gripal de tip B, grupurile genetice 2 și 3.
  7. Studiarea la susceptibilitatea inhibitorilor neuraminidazei a virusurilor gripale circulante în Republica Moldova din perioadele nominalizate a demonstrat sensibilitatea lor la remediile antivirale de ultimă generație – oseltamivir și zanamivir. Totodată, prezența substituției de aminoacizi S31N specifică pentru virusurile gripale A(H1N1)pdm și A(H3N2) la nivelul genei M2 le conferă acestor virusuri proprietatea de rezistență la adamantane (amantadina și remantadina).
  8. Monitorizarea circulației virusurilor gripale în cadrul rețelei WHO GISN contribuie la: depistarea precoce a noilor substituții de aminoacizi care ar putea influența patogenitatea, tropismul și capacitatea de transmisie a virusurilor gripale de la o specie la alta; evidențierea factorilor determinanți ai reasortării virusurilor, în special în apariția de noi virusuri cu potențial pandemic, inclusiv apariția de tulpini de virusuri gripale rezistente la remediile antivirale aflate în uz – circumstanțe extrem de importante pentru identificarea de noi remedii antivirale cu efect antigripal.

Soluționarea problemei științifice prin identificarea și evaluarea particularităților antigenice, genotipice și fenotipice ale virusurilor gripale circulante în Republica Moldova a fost realizată conform scopului și obiectivelor acestui studiu, fapt ce a permis elaborarea unui pachet de documente cu caracter aplicativ întru implementarea următoarelor **recomandări**:

1. Completarea cu noi poziții privind investigarea la gripă a cazurilor cu evoluție severă la pacienții cu patologii preexistente, copiii cu vârsta de până la 5 ani, femeile gravide, precum și investigarea materialului cadaveric în cazurile de deces la prezența virusurilor gripale în cadrul sistemului de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI la nivel național.
2. Aprecierea și identificarea categoriilor de pacienți, în baza definițiilor de caz de Gripă, IACRS și SARI pentru monitorizarea circulației virusurilor gripale, inclusiv cu caracterizarea tulpinilor de virusuri gripale izolate de la acești pacienți în cadrul sistemului sentinelă de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la gripă, IACRS și SARI.
3. Perfecționarea sistemului sentinelă de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică la SARI în cadrul sistemului de supraveghere la gripă, cu actualizarea definiției de caz SARI, aprecierea grupei-țintă pentru detecția substituțiilor de aminoacizi la nivelul genelor HA și NA, stabilirea factorilor ce determină patogenitatea virusurilor gripale, inclusiv întru detectarea reasortărilor ce țin de dezvoltarea rezistenței la remediile antivirale, în special, în cazul evoluției sporadice drept răspuns la tratament.
4. Inițierea, sistematizarea și promovarea cercetărilor la nivel antigenic, fenotipic și genetic ale tulpinilor de virusuri gripale în cadrul Rețelei GIHSN întru aprecierea poverii cazurilor de boală cu evoluție severă atribuite fiecărui tip/subtip de virus gripal.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ciufecu E.S. Virusologie medicală. București: Național, 2003. 942 p.
2. Scoferța P. ș.a. Evoluția morbidității prin gripă și infecții respiratorii virale acute pe parcursul ultimilor 14 ani. În: Medicina preventivă – strategia oportună a sistemului de sănătate. Volum de articole ale Conferinței științifico-practice consacrate jubileului de 60 ani a serviciului Sanitaro-epidemiologic de Stat și 10 ani de activitate a CNȘPMP, Chișinău, 2005, p. 187- 188.
3. Spînu C. ș.a. Gripa pandemică A(H1N1) în Republica Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale, 2010, Vol. 5 (28), pp. 109-119.
4. Киселев О.И. и др. Грипп А/Н1N1 как типичная эмерджентная инфекция (вирусологические, клинико-эпидемиологические особенности, вопросы терапии и профилактики). Пособие для врачей. Санкт-Петербург-Харьков-Ужгород 2009. [http://www.base.polysan-ru.com/arxiv/ah1n1\\_emerjentnaya\\_inf.pdf](http://www.base.polysan-ru.com/arxiv/ah1n1_emerjentnaya_inf.pdf) (vizitat 20.04.2012).
5. Kamps B., Hoffmann Ch. And Preiser W. Influenza Report 2006. Flying Publisher. 225 p. [http://www.ops.org.bo/multimedia/cd/2010/sri-2010-5/files/bib/Influenza\\_Report\\_2006\\_Sebastian\\_2006.pdf](http://www.ops.org.bo/multimedia/cd/2010/sri-2010-5/files/bib/Influenza_Report_2006_Sebastian_2006.pdf) (vizitat 07.06.2011).
6. Spînu C. ș. a. Infecția cu virusuri gripale umane. Aspecte epidemiologice, clinice, de laborator, tratament și profilaxie. Ghid practic nr.1. MS RM, Chișinău, 2009, 99 p.
7. Yu Xiaoyan et al. Etiology and clinical characterization of respiratory virus infections in adult patients attending an Emergency Department in Beijing. PLoS ONE 7(2), 2012: e32174. Doi: 10.1371 /journal.pone.0032174. <http://www.plosone.org/article/info:Doi/10.1371/journal.pone.0032174> (vizitat 20.04.2012).
8. Spînu C. ș. a. Evoluția gripei pandemice A(H1N1) în Republica Moldova. În: Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, A – II-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, Sinaia, 14-16 octombrie 2010, Vol. 55, Nr. 3, p. 38.
9. Barlett J.G. and Hayden F.G. Influenza A(H5N1): Will it be the next pandemic influenza? Are we ready? In: Annals of Internal Medicine 2005, Vol. 143, no. 6, pp. 460-462 <http://birdflubook.com/resources/Bartlett460.pdf> (vizitat 12.07.2009).
10. Ng E.K. et al. Influenza A H5N1 Detection. In: Emerg Infect Dis, 2005, Vol. 11, No. 8, p. 1303-1305. Doi: [10.3201/eid1108.041317](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320469). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320469> (vizitat 20.07.2009).
11. Жирнов О.П., Манькин А.А. рН-зависимые перестройки в структуре вируса гриппа А. В: Вопросы вирусологии, 2014, № 3, стр.41-46.

12. Osterholm M.T. Preparing for the next pandemic. In: N Eng J Med 2005, V 352, pp. 1839-1842. DOI:10.1056/NEJMp058068. <http://www.nejm.org/Doi/full/10.1056/NEJMp058068> (vizitat 08.08.2009).
13. Esposito Susanna et al. Viral shedding in children infected by pandemic A/H1N1/2009 influenza virus. In: Virology Journal 2011, Vol. 8, no. 349. Doi: 10.1186 /1743-422X-8-349. <http://www.virologyj.com/content/8/1/349> (vizitat 24.09.2012).
14. Pere G. et al. Surveillance for influenza (H1N1) 2009 in Catalonia: results and implications. In: [Rev Esp Salud Publica](#), 2011, 85 (1), p. 37-45. Doi: 10.1590/S1135-57272011000100005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750841> (vizitat 20.04.2012).
15. Гендон Ю.З. Свиной грипп H1N1/Калифорния – страсти и факты. В: Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 2010, №4, стр. 105-114
16. Львов Д.К., Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю. Грипп: история, клиника, патогенез. В: Лечащий врач (Москва), 2011, стр. 33-38 <http://www.lvrach.ru/2011/10/15435275> (vizitat 18.09.2012).
17. Spînu C. ș. a. Gripa aviară. Aspecte epidemiologice, clinice, de laborator, tratament și profilaxie. Ghid practic nr.2. MS RM, Chișinău, 2009, 91 p.
18. Киселев О.И., Маринич И.Г., Соминина А.А. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия. Санкт-Петербург, 2003, 245 стр.
19. Takeshi N. Native morphology of influenza virions. In: *Frontiers in Microbiology* 2012, Vol. 2, pp. 1-5. Published: 03 January 2012. Doi: 10.3389/fmicb.2011.00269. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249889/> (vizitat 15.06.2012).
20. Lakdawala S.S. et al. Eurasian-origin gene segments contribute to the transmissibility, aerosol release, and morphology of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. In: *PLoS Pathog* 7(12), 2011: e1002443. Doi: 10.1371/journal.ppat.1002443. <http://www.plospathogens.org/article/info%3ADoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002443> (vizitat 19.07.2012).
21. Bashir Aamir U. et al. Molecular Epidemiology of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses from Pakistan in 2009-2010. In: *PLOS ONE* 2012, 7(8): e41866. Doi: 10.1371/journal.pone.0041866. <http://www.plosone.org/article/info%3ADoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0041866> (vizitat 12.07.2012).



22. Ferguson N.M., Galvani A.P., Bush R.M. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. In: Nature, 2003, 422, p. 428-433. <http://amedeo.com/lit.php?id=12660783> (vizitat 16.07.2012).
23. Neumann G., Takeshi N., and Yoshihiro K. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. In: Nature, 2009; 459 (7249), p. 931-939. Doi: 10.1038/nature08157. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2873852/> (vizitat 27.07.2012).
24. Nguyen-Van-Tam J.S., Hampson A.W. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. In: Vaccine, 2003, 21, p. 1762-1768. Doi: 10.1016/S0264-410X(03)00069-0. [http://www.researchgate.net/publication/10813306\\_The\\_epidemiology\\_and\\_clinical\\_impact\\_of\\_pandemic\\_influenza](http://www.researchgate.net/publication/10813306_The_epidemiology_and_clinical_impact_of_pandemic_influenza) (vizitat 12.07.2009).
25. Kilbourne E. Influenza pandemics of the 20<sup>th</sup> century. In: Emerg. Infect. Dis., 2006, 12, p. 9-14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3291411/> (vizitat 22.09.2012).
26. Eder V. Aspecte etiologice și morfostructurale ale virusurilor gripale (Revista literaturii). În: Buletinul AȘM, 4(36)/2012, Chișinău, p. 264-268.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Update: novel influenza A(H1N1) virus infection. In: MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 2009, 58, p. 585-589. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5821a2.htm> (vizitat 17.06.2013).
28. Ducatez M.F. et al. Multiple Reassortment between Pandemic (H1N1) 2009 and Endemic Influenza Viruses in Pigs, United States. In: EID 2011, Vol. 17, No. 9, ISSN 1080-6059. [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/9/11-0338\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/9/11-0338_article.htm) (vizitat 17.06.2013).
29. Taubenberger J.K. The origin and Virulence of the 1918 "Spanish" Influenza Virus. In: Proc Am Philos Soc, 2006, 150 (1), p. 86-112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2720273/> (vizitat 20.07.2012).
30. Guang-Wu Chen and Shin-Ru Shin. Genomic Signatures of Influenza A Pandemic (H1N1)2009 Virus. In: EID, 2009, Vol. 15, No. 12, p. 1897-1903. Doi: 10.3201/eid1512.090845 [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) (vizitat 23.05.2012).
31. Vijaykrishna D. et al. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. In: Science, 2010, 328 (5985), p. 1529-1533. Doi: 10.1126/science.1189132. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569847/pdf/nihms440159.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569847/pdf/nihms440159.pdf) (vizitat 02.12.2013).
32. WHO. Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 viruses.

- [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_d222g/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_d222g/en/) (vizitat 02.12.2013).
33. Mak G.C. et al. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. In: Euro Surveill, 2010, 15 (14): pii=19534. [www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N14/art19534.pdf](http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N14/art19534.pdf) (vizitat 02.12.2013).
34. Ryvkin R. et al. Within-patient emergence of the influenza A(H1N1)pdm09 HA1 222G variant and clear association with severe disease, Norway. In: Euro Surveill, 2013, 18 (3): pii=20369. [www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V18N03/art20369.pdf](http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V18N03/art20369.pdf) (vizitat 02.12.2013).
35. Бурцева Е.И. и др. Особенности социркуляции вирусов гриппа в постпандемический период 2010-2011 гг. по итогам деятельности Центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России. В: Вопросы вирусологии, 2012, №1, стр. 20-33.
36. Skowronski D.M. et al. Cross-reactive and Vaccine-Induced Antibody to an Emerging Swine-Origin Variant of Influenza A Virus Subtype H3N2 (H3N2v). In: JID, 2012. Doi: 10.1093/infdis/jis500. <http://jid.oxfordjournals.org/content/206/12/1852.full.pdf+html> (vizitat 06.09.2012).
37. Pappas C. et al. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. In: PNAS, 2008, Vol. 105, No. 8, p. 3064-3069 [www.pnas.org/cgi/Doi/10.1073/pnas.0711815105](http://www.pnas.org/cgi/Doi/10.1073/pnas.0711815105) (vizitat 20.07.2012).
38. Peiris M., Poon L., Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) (H1N1) virus in humans. In: J Clin Vir, 2009, 45, p. 169-173. Doi:10.1016/j.jcv.2009.06.006. [http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532\(09\)00255-8/abstract](http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532(09)00255-8/abstract) (vizitat 20.07.2012).
39. Сулопаров И.М. и др. Генетические особенности штамма вируса гриппа А (H1N1), вызвавшего пандемию 2009 г. В: Журнал Эпидемиологии и Микробиологии, 2011, № 5, стр. 107-110.
40. Соминина А.А. и др. Развитие надзора за гриппом в России в системе национального центра ВОЗ по гриппу. В: Вопросы вирусологии, 2012, № 6, стр. 17-21.
41. Онищенко Г.Г. Эпидемическая ситуация по гриппу, вызванному высокопатогенным вирусом типа А(H1N1), в Российской Федерации и в мире. В: Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2010, № 1, стр. 3-9.
42. Garten R.J. et al. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. In: Science 2009, Vol. 325. 197-201.

- Doi:10.1126/science.1176225. <http://www.sciencemag.org/content/325/5937/197.full.pdf>  
(vizitat 09.02.2012).
43. Guarnaccia T. et al. Antigenic Drift of the Pandemic 2009 A(H1N1) Influenza Virus in a Ferret Model. In: PLoS Pathog, 2013, 9 (5): e1003354. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003354. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3649996/pdf/ppat.1003354](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3649996/pdf/ppat.1003354) (03.12.2013).
44. Dhiman N. et al. Evidence for Amino Acid Changes in a 57-Base-Pair Region of the Highly Conserved Matrix Gene of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Virus. In: J. Clin. Microbiol., 2010, 48 (10), p. 3817-3819. <http://jcm.asm.org/> (vizitat 25.09.2012).
45. de la Rosa-Zamboni D. et al. Molecular Characterization of the Predominant Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Mexico, December 2011 – February 2012. In: PLoS ONE, 2012, Vol. 7, Issue 11: e50116. Doi: 10.1371/journal.pone.0050116. [www.plosone.org](http://www.plosone.org) (vizitat 02.12.2013).
46. Hause B.M. et al. Genetic and antigenic characterization of recent human-like H1 ( $\delta$ -cluster) swine influenza virus isolates. In: J Swine Health Prod, 2011, 19 (5), p. 268-276. [www.aasv.org/shap/issues/v19n5/v19n5p268.pdf](http://www.aasv.org/shap/issues/v19n5/v19n5p268.pdf) (vizitat 09.12.2013).
47. Piralla A. et al. Segregation of virulent influenza A(H1N1) variants in lower respiratory tract of critically ill patients during the 2010-2011 seasonal epidemic. In: PLoS ONE, 2011, 6 (12): e28332. Doi: 10.1371/journal.pone.0028332. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0028332> (vizitat 14.08.2011).
48. Slinporn P. et al. Serological analysis of human pandemic influenza (H1N1) in Thailand. In: J Health Popul Nutr, 2010, Vol. 28, no. 6, p. 537-544. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995021/> (vizitat 14.08.2011).
49. Львов Д.К. и др. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09, изолированных в 2009-2011 гг., структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. В: Вопросы вирусологии 2012, №1, стр. 14-20
50. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1V-2009. Москва: «Дмитрейд График Групп», 2011, 164 стр.
51. Киселев О.И. Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. Санкт-Петербург: Росток, 2012, 272 стр.
52. Fouchier R.A. et al. Characterization of a novel Influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. In: J Virol, 2005, 79, p. 2814-2822. <http://amedeo.com/lit.php?id=15709000> (vizitat 15.07.2011).

53. Даниленко Д.М. Пандемический грипп 2009 г. в России. Особенности выделения и биологические свойства вирусов. В: Вопросы вирусологии №2, 2011, стр. 4-8
54. Киселев О.И. и др. Пандемический грипп 2009 г. в России. Диагностика и молекулярно-биологические характеристики вируса. В: Вопросы вирусологии 2011, №1, стр. 17-21
55. Bolton K.J. et al. Likely effectiveness of pharmaceutical and non-pharmaceutical interventions for mitigating influenza virus transmission in Mongolia. In: Bulletin of the World Health Organization, 2012, 90, p. 264-271. Doi: 10.2471/BLT.11.093419. [www.who.int/bulletin/volumes/90/4/11-093419/en/#](http://www.who.int/bulletin/volumes/90/4/11-093419/en/#) (vizitat 09.07.2014).
56. Lorusso A. et al. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. In: Journal of General Virology, 2011, 92, p. 919-930. <http://vir.sgmjournals.org/content/92/4/919.full.pdf.html> (vizitat 15.07.2013).
57. Bedford T. et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. Cornell University Library, 12 Apr 2013. [arXiv:1304.3637v1](https://arxiv.org/abs/1304.3637v1) [q-bio.PE] (vizitat 31.07.2013).
58. Shu B. et al. Genetic analysis and antigenic characterization of swine origin influenza viruses isolated from humans in the United States, 1990-2010. Virology, 2012, 422 (1), 151-160. Doi:10.1016/j.virol.2011.10.016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078166> (vizitat 19.06.2013).
59. Furuse Y., Suzuki A., Oshitani H. Reassortment between swine influenza A viruses increased their adaptation to humans in pandemic H1N1/09. In: Infection, Genetics and Evolution, 2010, Vol. 10, Issue 4, p. 569-574. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134810000146](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134810000146) (vizitat 02.12.2013).
60. Portela A. and Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. In: Journal of General Virology, 2002, 83, p. 723-734. <http://vir.sgmjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=11907320> (vizitat 09.11.2013).
61. Furuse Y. et al. Comparison of selection pressures on the HA gene of pandemic (2009) and seasonal human and swine influenza A H1 subtype viruses. In: Virology, 2010, 405, p. 314-321. Doi: 10.1016/j.virol.2010.06.018. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682210004009](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682210004009) (vizitat la 02.12.2013).
62. de Jong, J. C. et al. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A(H3N2) viruses in Europe. In: Journal of Virology, 2007, 81 (8), p. 4315-4322. Doi:10.1128/JVI.02458-06 <http://jvi.asm.org/> (vizitat 24.04.2013).
63. Lekcharoensuk P. et al. First whole genome characterization of swine influenza virus subtype H3N2 in Thailand. In: Veterinary Microbiology, 2010, 145(3-4), p. 230-244.

Doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.008.

[www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510001896](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510001896) (vizitat 24.04.2013).

64. Salin C. et al. Genetic characterization of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza virus in Thailand. In: Archive of Virology, 2008, 153, p. 1049-1056. Doi:10.1007/s00705-008-0097-7. <http://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-36871-4/page/1> (vizitat 25.04.2013).
65. Thacker E. and Janke B. Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas. In: The Journal of Infectious Diseases, 2008, 197, p. S19-S24. Doi: 10.1086/524988. <http://jid.oxfordjournals.org/> (vizitat 17.07.2013).
66. FluView, CDC. 2008-2009 influenza season. Week 23 ending June 13, 2009. [www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2008-2009/08-09summary.htm](http://www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2008-2009/08-09summary.htm) (vizitat 08.08.2013).
67. Centers for Disease Control and Prevention. 2008-2009 Influenza Season Summary. [www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2008-2009/08-09summary.htm](http://www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2008-2009/08-09summary.htm) (vizitat 08.08.2013).
68. Members of the Western Pacific Region GISRS. Epidemiological and Virological Characteristics of Influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010. In: PLoS ONE, 2012, 7 (5): e37568. Doi: 10.1371/journal.pone.0037568. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366627/pdf/pone.0037568](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366627/pdf/pone.0037568) (vizitat 03.12.2013).
69. Rajão D.S. et al. Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype. In: Influenza and Other Respiratory Viruses, 2013, 7 (5), p. 783-790. Doi: 10.1111/irv.12072. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23280098> (vizitat 24.04.2013).
70. van den Brand J. et al. Comparison of Temporal and Spatial Dynamics of Seasonal H3N2, Pandemic H1N1 and Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus Infections in Ferrets. In: PLoS ONE, 2012, 7 (8): e42343. Doi: 10.1371/journal.pone.0042343. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3414522/> (vizitat 09.11. 2013).
71. Brockwell-Staats C., Webster R., Webby R. Diversity of Influenza Viruses in Swine and the Emergence of a Novel Human Pandemic Influenza A (H1N1). In: Influenza resp Viruses, 2009, 3 (5), p. 207-2013. [www.medscape.com/viewarticle/708377](http://www.medscape.com/viewarticle/708377) (vizitat 24.04.2013).
72. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Лаврищева В.В. Информация Центра экологии и эпидемиологии гриппа Института вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН об итогах эпидемического сезона 2009-2010 гг. по гриппу и ОРВИ (с 40-й недели 2009 г.

- по 22-ю неделю 2010г.) в мире и в России. В: Вопросы вирусологии, 2011, № 1, стр.44-49.
73. Грудинин М.П. и др. Генетическое разнообразие и молекулярная эволюция вирусов гриппа А в России в 2006-2012 гг. В: Вопросы вирусологии № 6, 2012, стр.37-42
74. Ren X.W. et al. Antigenic and genetic variation in the hemagglutinins of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses in the Shanghai area from 2005-2008. In: J Med Virol, 2011, 83(7), p.1113-1120. Doi: 10.1002/jmv.22078.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.22078/abstract> (vizitat 09.12.2013).
75. Steinbrück L., McHardy A. Inference of Genotype-Phenotype Relationships in the Antigenic Evolution of Human Influenza A (H3N2) Viruses. In: PLoS Comput Biol, 2012, 8 (4): e1002492. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1002492.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3330098/> (vizitat 09.12.2013).
76. Gulati S. et al. Human H3N2 Influenza Viruses Isolated from 1968 To 2012 Show Varying Preference for Receptor Substructures with No Apparent Consequences for Disease or Spread. In: PLoS ONE, 2013, 8 (6): e66325. Doi: 10.1371/journal.pone.0066325.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689742/> (vizitat 03.12.2013).
77. Ferreira L. et al. Sequence analysis of the 2009 pandemic influenza A H1N1 virus haemagglutinin gene from 2009-2010 Brazilian clinical samples. In: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2011, 106 (4), p. 613-616. [www.bioline.org.br/request?oc11102](http://www.bioline.org.br/request?oc11102) (vizitat 26.04.2013).
78. Лаврищева В.В. и др. Этиология летальных пневмоний в период развития пандемии, вызванной вирусом гриппа А(H1N1)pdm2009 в России. В: Вопросы вирусологии, 2013, № 3, стр. 17-21.
79. Lin Y.P. et al. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. In: PNAS, 2012. [www.pnas.org/cgi/Doi/10.1073/pnas.1218841110](http://www.pnas.org/cgi/Doi/10.1073/pnas.1218841110) (vizitat 12.02.2013).
80. Nelson M.I. et al. Evolution of Novel Reassortant A/H3N2 Influenza Viruses in North American Swine and Humans, 2009-2011. In: Journal of Virology, 2012, 86 (16), p. 8872-8878. Doi: 10.1128/JVI.00259-12. <http://jvi.asm.org/> (vizitat 24.04.2013).
81. Лобова Т.Г. и др. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г. В: Вопросы вирусологии, 2012, № 6, стр.22-26.

82. FluView, CDC. 2009-2010 Influenza Season Summary. [www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2009-2010/09-10Summary.htm](http://www.cdc.gov/flu/weekly/weeklyarchives2009-2010/09-10Summary.htm) (vizitat 11.11.2013).
83. FLU FOCUS. Issue No.3, July 2011. <http://www.euro.who.int/flufocus> (vizitat 15.09.2012).
84. Community Network of Reference Laboratories (CNRL) for Human Influenza in Europe. Technical Document. Influenza virus characterisation. Summary Europe, July 2011. [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1108\\_SUR\\_Influenza\\_virus\\_characterisation\\_July.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1108_SUR_Influenza_virus_characterisation_July.pdf) (vizitat 15.09.2012).
85. Furuse Y. et al. Occurrence of Mixed Populations of Influenza A Viruses That Can Be Maintained through Transmission in a Single Host and Potential for Reassortment. In: J. Clin. Microbiol., 2010, 48 (2), p. 369. Doi: 10.1128/JCM.01795-09 <http://jcm.asm.org/content/48/2/369.full.pdf+html> (vizitat 13.11.2013).
86. Nguyen H.T., Fry A.M., Gubareva L.V. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. In: Antivir Ther, 2012, 17 (1 Pt B): 159-173. Doi: 10.3851/IMP2067. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311680) (vizitat 03.12.2013).
87. Garcia Vanessa and Aris-Brosou Stéphane. Comparative Dynamics and Distribution of Influenza Drug Resistance Acquisition to Protein M2 and Neuraminidase Inhibitors. In: Mol. Biol. Evol., 2013. Doi: 10.1093/molbev/mst204. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2013/11/07/molbev.mst204.full.pdf+html> (vizitat 13.11.13)
88. Wang J. et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. In: PNAS, 2013, vol. 110, no. 4, p. 1315-1320. Doi: 10.1073/pnas.1216526110. [www.pnas.org/content/110/4/1315.full.pdf+html](http://www.pnas.org/content/110/4/1315.full.pdf+html) (vizitat 13.11.13).
89. Sharma M. et al. Drug sensitivity, drug-resistant mutations, and structures of three conductance domains of viral porins. In: Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1808 (2011), p. 538-546. Doi: 10.1016/j.bbame.2010.07.015. [www.physics.fsu.edu/](http://www.physics.fsu.edu/) (vizitat 20.11.13).
90. Rossman J.S. et al. Influenza Virus M2 Ion Channel Protein Is Necessary for Filamentous Virion Formation. In: Journal of Virology, 2010, vol. 84, no. 10, p. 5078-5088. Doi: 10.1128/JVI.00119-10. <http://jvi.asm.org/content/84/10/5078> (vizitat 20.11.13).
91. Stouffer A.L. et al. The Interplay of Thermodynamic Stability, Functional Tuning, and Drug Resistance in the Evolution of the M2 Proton Channel From the Influenza A Virus. In: Structure, 2008, 16 (7), p. 1067-1076. Doi:10.1016/j.str.2008.04.011. [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (vizitat 20.11.13).

92. Cady S.D. et al. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. In: *Nature*, 2010, vol. 463, p. 689-693. Doi:10.1038/nature08722. [www.public.iastate.edu/](http://www.public.iastate.edu/) (vizitat 20.11.13).
93. Rosenberg M.R. and Casarotto M.G. Coexistence of two adamantane binding sites in the influenza A M2 ion channel. In: *PNAS Early Edition*, 2010, 1-6. Doi: 10.1073/pnas.1002051107 [www.pnas.org/content/early/2010/07/14/1002051107.full.pdf](http://www.pnas.org/content/early/2010/07/14/1002051107.full.pdf) (vizitat 20.11.13)
94. Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza drug resistance. In: *Semin Respir Crit Care Med*, 2011, 32 (4), p. 409-422. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858746](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858746) (vizitat 09.12.2013).
95. Hurt A.C. et al. Oseltamivir resistance and the H274Y neuraminidase mutation in season, pandemic and highly pathogenic influenza viruses. In: *Drugs*, 2009, 69 (18), p. 2523-2531. Doi: 10.2165/11531450-000000000-00000. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943705](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943705) (vizitat 13.11.13).
96. Chao D.L. et al. The global spread of drug-resistant influenza. In: *J. R. Soc. Interface* 2012, 9, p. 648-656. Doi: 10.1098/rsif.2011.0427. <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/9/69/648.full.pdf+html> (vizitat 13.11.13).
97. Sheu T.G. et al. Dual Resistance to Adamantanes and Oseltamivir Among Seasonal Influenza A(H1N1) Viruses: 2008-2010. In: *JID*, 2011, 203, p. 13-17. Doi: 10.1093/infdis/jiq005. <http://jid.oxfordjournals.org/content/203/1/13.full.pdf+html> (vizitat 20.11.13).
98. Daput I.C. et al. Genetic Characterization of Human Influenza Viruses in the Pandemic (2009-2010) and Post-Pandemic (2010-2011) Periods in Japan. In: *PLoS ONE* 2012, 7 (6): e36455. Doi: 10.1371/journal.pone.0036455. [www.plosone.org/article/info%3ADoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0036455](http://www.plosone.org/article/info%3ADoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0036455) (vizitat 24.04.2013).
99. Leang S.K. et al. Influenza antiviral resistance in the Asia-Pacific region during 2011. In: *Antiviral Research*, 2013, Vol. 97, Issue 2, p. 206-210. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354212002963](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354212002963) (vizitat 09.12.2013).
100. Takayama I. et al. Rapid detection of the SN neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. In: *Journal of Virological Methods*, 2013, Vol. 188, Issues 1-2, p.73-75. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093412004417](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093412004417) (vizitat 09.12.2013).
101. Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network (NISN). An Overview of Antiviral Drug Resistance. Data presented at Options for the Control of Influenza VII. Hong Kong, September 2010.



[www.isirv.org/site/images/stories/avg-documents/Publications/nisn\\_options\\_report\\_dec2010.pdf](http://www.isirv.org/site/images/stories/avg-documents/Publications/nisn_options_report_dec2010.pdf)

(vizitat 13.11.13).

102. LeGoff J. et al. I223R Mutation in Influenza A(H1N1)pdm09 Neuraminidase Confers Reduced Susceptibility to Oseltamivir and Zanamivir and Enhanced Resistance with H275Y. In: PLoS ONE 2012, 7 (8): e37095. Doi:10.1371/journal.pone.0037095. [www.plosone.org/article/info%253ADoi%252F10.1371%252Fjournal.pone.0037095](http://www.plosone.org/article/info%253ADoi%252F10.1371%252Fjournal.pone.0037095) (vizitat 24.04.2013).
103. Okomo-Adhiambo M. et al. Detection of E119V and E119I Mutations in Influenza A(H3N2) Viruses Isolated from an immunocompromised Patient: Chlanhes in Diagnosis of Oseltamivir Resistance. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, p. 1834-1841. Doi: 10.1128/AAC.01608-09. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863645/pdf/1608-09.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863645/pdf/1608-09.pdf) (vizitat 03.12.2013).
104. Ciancio B.C. et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007-2008 had epidemiologic and clinical characteristics similar to circulating susceptible A(H1N1)viruses. In: Euro Surveill., 2009, 14 (46): pii=19412. [www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N46/art19412.pdf](http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N46/art19412.pdf) (vizitat 13.11.2013).
105. Janies D.A. et al. Selection for resistance to oseltamivir in seasonal and pandemic H1N1 influenza and widespread co-circulation of the lineages. In: International Journal of Health Geographics 2010, 9:13. Doi: 10.1186/1476-072X-9-13 [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882220/pdf/1476-072X-9-13.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882220/pdf/1476-072X-9-13.pdf) (vizitat 12.11.2013)
106. Triana-Baltzer G. et al. Phenotypic and genotypic characterization of influenza virus mutants selected with the sialidase fusion protein DAS181. In: J Antimicrob Chemother, 2011, 66, p. 15-28, doi: 10.1093/jac/dkq387. <http://jac.oxfordjournals.org/> (vizitat 10.06.2013).
107. Arellano-Galindo J. et al. Point Mutations and Antiviral Drug Resistance. 2012 [www.intechopen.com/pdfs/33172/InTech\\_Point\\_mutations\\_and\\_antiviral\\_drug\\_resistance.pdf](http://www.intechopen.com/pdfs/33172/InTech_Point_mutations_and_antiviral_drug_resistance.pdf) (vizitat 12.11.2013).
108. Hurt A.C. et al. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: public health, laboratory, and clinical perspectives. In: The Lancet Infectious Diseases, 2012, Vol. 12, Issue 3, p. 240-248. [www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(11\)70318-8/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(11)70318-8/fulltext) (vizitat 08.12.2013).

109. Doyle T. et al. Universal anti-neuraminidase antibody inhibiting all influenza A subtypes. In: Antiviral Research, 2013, 100, p. 567-574. Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.018. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354213002660](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354213002660) (vizitat 02.12.2013).
110. Hurt A. Influenza antivirals and resistance: the next 10 years? In: Expert Rev. Anti Infect. Ther., 2012, 10 (11), p. 1221-1223. Doi: 10.1586/ERI.12.125. [www.expert-reviews.com/toc/eri/10/11](http://www.expert-reviews.com/toc/eri/10/11) (vizitat 03.12.2013).
111. Poland G.A., Jacobson R.M., and Ovsyannikova I.G. Influenza Virus Resistance to Antiviral Agents: A Plea for Rational Use. In: Clinical Infectious Diseases, 2009, 48, p. 1254-1256. Doi: 10.1086/598989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831648/> (vizitat 02.08.2012).
112. Monto A.S. Implications of Antiviral Resistance of Influenza Viruses. In: Clinical Infectious Diseases, 2009, 48, p. 397-399. Doi: 10.1086/596312. <http://cid.oxfordjournals.org/content/48/4/397.full.pdf+html> (vizitat 02.08.2012).
113. Hayden F.G. and de Jong M. Emerging Influenza Antiviral Resistance Threats. In: The Journal of Infectious Diseases, 2011, 203, p. 6-10. Doi: 10.1093/infdis/jiq012. <http://jid.oxfordjournals.org/content/203/1/6.full.pdf+html> (vizitat 13.11.2013).
114. ECDC Interim Guidance. Public health use of influenza antivirals during influenza pandemics. [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu) (vizitat 13.11.13).
115. Mak P.W.Y., Jayawardena Sh., and Poon L.L.M. The Evolving Threat of Influenza Viruses of Animal Origin and the Challenges in Developing Appropriate Diagnostics. In: Clinical Chemistry, 2012, 58:11, p. 1527-1533. Doi: 10.1373/clinchem.2012.182626. [www.clinchem.org/content/58/11/1527.full.pdf](http://www.clinchem.org/content/58/11/1527.full.pdf) (vizitat 02.12.2013).
116. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Role of Laboratory Diagnosis of Influenza. Seasonal Influenza (Flu), 2009. <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrole.htm> (vizitat 21.07.2011).
117. Zambon M. et al. Diagnosis of Influenza in the Community. Relationship of Clinical Diagnosis to Confirmed Virological, Serologic, or Molecular Detection of Influenza. In: Arch Intern Med, 2001, 161, p. 2116-2122. <http://archinte.jamanetwork.com/> (vizitat 02.04.2013).
118. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rapid Diagnostic Testing for Influenza: Information for Health Care Professionals, 2009. <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/rapidclin.htm#table> (vizitat 02.12.2013)
119. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance for Clinicians on the Use of Rapid Influenza Diagnostic Tests, 2011.

- [http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/clinician\\_guidance\\_ridt.htm#Figure1](http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/clinician_guidance_ridt.htm#Figure1) (vizitat 02.12.2013).
120. WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1)2009 virus in humans – revised. 23.11.2009.  
[www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO\\_Diagnostic\\_RecommendationsH1N1\\_20090521.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf) (vizitat 15.05.2010).
121. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Influenza Symptoms and the Role of Laboratory Diagnostics, 2011. <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrole.htm> (vizitat 25.03.2012).
122. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Interim Recommendations for Clinical Use of Influenza Diagnostic Tests During the 2009-2010 Influenza Season, 2009. <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrole.htm> (vizitat 25.05.2010).
123. Petric M., Comanor L., and Petti C. Role of the Laboratory in Diagnosis of Influenza during Seasonal Epidemics and Potential pandemics. In: The Journal of Infectious Diseases 2006, 194 (Suppl 2), p. S98-110.  
[http://jid.oxfordjournals.org/content/194/Supplement\\_2/S98.full.pdf+html](http://jid.oxfordjournals.org/content/194/Supplement_2/S98.full.pdf+html) (vizitat 02.12.2013).
124. Kumar S. and Henrickson K. Update on Influenza Diagnostics: Lessons from the Novel H1N1 Influenza A Pandemic. In: Clinical Microbiology Reviews, 2012, Vol. 25, No. 2, p. 344-361. Doi: 10.1128/CMR.05016-11.  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346302/pdf/zcm344.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346302/pdf/zcm344.pdf) (vizitat 02.12.2013).
125. Katz J.M., Hancock K., Xu X. Serologic assays for influenza surveillance, diagnosis and vaccine evaluation. In: Expert Rev Anti Infect Ther., 2011, 9 (6), p. 669-83. Doi: 10.1586/eri.11.51. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692672](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692672) (vizitat 23.12.2013).
126. Hancock K. et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. In: The New England Journal of Medicine 2009, 361, p. 1945-52. Doi: 10.1056/NEJMoa0906453. [www.nejm.org/Doi/pdf/10.1056/NEJMoa0906453](http://www.nejm.org/Doi/pdf/10.1056/NEJMoa0906453) (vizitat 24.12.2013).
127. Сборник методических рекомендаций по выделению вирусов, ИФ и ПЦР-диагностике гриппа и вводу данных сигнального надзора в системе on-line. Министерство Здравоохранения и Социального Развития ФГБУ Научно-Исследовательский Институт Гриппа, Национальный Центр по Гриппу ВОЗ, Санкт-Петербург, 2011, 68 стр.

128. Krauss S., Walker D., Webster R.G. Influenza virus isolation. In: *Methods Molecular Biology*, 2012, 865, p. 11-24. Doi: 10.1007/978-1-61779-621-0\_2. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528151](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528151) (vizitat 09.12.2013).
129. Даниленко Д.М. и др. Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1vб вирусам гриппа птиц, свиней и человека. В: *Вопросы вирусологии*, 2011, № 6, стр. 14-19.
130. WHO Global Influenza Surveillance Network. *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*. World Health Organization, 2011, 139 p.
131. Ramakrishnan M.A. et al. The Feasibility of Using High Resolution Genome Sequencing of Influenza A Viruses to Detect Mixed Infections and Quasispecies. In: *PLoS ONE*, 2009, 4 (9): e7105. Doi: 10.1371/journal.pone.0007105. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007105> (vizitat 09.12.2013).
132. Dwyer D.E. et al. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. Supplement. In: *The Medical Journal of Australia*, 2006, Vol. 185, No. 10, p. S48-S53. [www.mja.com.au/journal/2006/185/10](http://www.mja.com.au/journal/2006/185/10) (vizitat 18.01.2011).
133. Lindsay L.L. et al. Avian Influenza: Mixed Infections and Missing Viruses. In: *Viruses*, 2013, 5, p. 1964-1977. Doi: 10.3390/v5081964. [www.mdpi.com/1999-4915/5/8/1964](http://www.mdpi.com/1999-4915/5/8/1964) (vizitat 09.12.2013).
134. CHP molecular diagnostic protocols for the detection of human swine influenza virus type A (subtype H1) revision 2 (16 December 2009). The Virology Division, Public Health Laboratory Services Branch, Centre for Health Protection (CHP), Department of Health, Hong Kong SAR, China. [http://www.chp.gov.hk/files/pdf/CHP\\_Protocols\\_for\\_the\\_Detection\\_of\\_Human\\_Swine\\_influenza.pdf](http://www.chp.gov.hk/files/pdf/CHP_Protocols_for_the_Detection_of_Human_Swine_influenza.pdf) (vizitat 12.03.2010).
135. Steininger Ch. et al. Effectiveness of Revers Transcription-PCR, Virus Isolation, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Influenza A Virus Infection in Different Age Groups. In: *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (6), p. 2051-2056. Doi: 10.1128/JCM.40.6.2051-2056.2002. <http://jcm.asm.org/content/40/6/2051.full.pdf+html> (vizitat 09.12.2013).
136. Ellis J.S. and Zambon M.C. molecular diagnosis of influenza. In: *Reviews in Medical Virology*, 2002, 12: 375-389. Doi: 10.1002/rmv.370. [www.interscience.wiley.com/Doi/10.1002/rmv.370/pdf](http://www.interscience.wiley.com/Doi/10.1002/rmv.370/pdf) (vizitat 18.01.2011).

137. Beck E.T., Henrickson K.J. Molecular Diagnosis of Respiratory Viruses. In: Future Microbiology, 2010, 5 (6), p. 901-916. [www.medscape.com/viewarticle/723583\\_print](http://www.medscape.com/viewarticle/723583_print) (vizitat 01.12.2013).
138. Poon L. et al. Rapid Detection of Reassortment of Pandemic H1N1/2009 Influenza Virus. In: Clinical Chemistry, 2010, 56:8, p. 1340-1344. [www.clinchem.org/content/56/8/1340.full.pdf+html](http://www.clinchem.org/content/56/8/1340.full.pdf+html) (vizitat 02.12.2013).
139. Poon L. et al. Molecular Detection of a Novel Human Influenza H1N1 of Pandemic Potential by Conventional and Real-Time Quantitative RT-PCR Assays. In: Clinical Chemistry, 2009, 55:8, p. 1555-1558. [www.clinchem.org/content/55/8/1555.full.pdf+html](http://www.clinchem.org/content/55/8/1555.full.pdf+html) (vizitat 01.12.2013).
140. Ребриков Д.В. и др. ПЦР «в реальном времени». Москва, «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2009, 216 стр.
141. Mak P. et al. Rapid Genotyping of Swine Influenza Viruses. In: Emerg Infect Dis, 2011, 17 (4), p. 691-694. Doi: 10.3201/eid1704.101726. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377423/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377423/) (vizitat 02.12.2013).
142. Raboni S.M. et al. Laboratory Diagnosis, Epidemiology, and Clinical Outcomes of Pandemic Influenza A and Community Respiratory Viral Infections in Southern Brazil. In: Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49 (4), p. 1287-1293. <http://jvi.asm.org/content/49/4/1287.full.pdf+html> (vizitat 02.12.2013).
143. Wang R. and Taubenberger J.K. Methods for molecular surveillance of influenza. In: Expert Rev Anti Infect Ther., 2010, 8 (5), p. 517-527. Doi: 10.1586/eri.10.24. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882197/pdf/nihms205258.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882197/pdf/nihms205258.pdf) (vizitat 02.12.2013).
144. Inoue E. et al. Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus using a single set of universal primers. In: Microbiol Immunol, 2010, 54, p. 129-134. Doi: 10.1111/j.1348-0421.20009.00193.x. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236422](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236422) (vizitat 02.12.2013).
145. Deng Y., Cladwell N., Barr I. Rapid Detection and Subtyping of Human Influenza A Viruses and Reassortants by Pyrosequencing. In: PLoS ONE, 2011, 6 (8):e23400. Doi: 10.1371/journal.pone.0023400. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0023400> (vizitat 02.12.2013).
146. World Health Organization and Centers for Disease Control and Prevention, Influenza Laboratory Course Manual. Atlanta, Georgia, USA, May 5-9, 2003, 300 p.

147. van Zyl G. Laboratory Findings. In: Influenza Report by Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W., 2006, p. 150-158. <http://www.influenzareport.com/ir/lab.htm> (vizitat 12.03.2010).
148. Beaman M., Leung M. Pandemic influenza testing at the coalface: time for reassessment? In: Med J Aust, 2010, 192 (2), p. 102-104. [www.mja.com.au/journal/2010/192/2](http://www.mja.com.au/journal/2010/192/2) (vizitat 29.11.2013).
149. Kaore N.M. et al. Laboratory Diagnosis of Novel H1N1 Virus. In: JK Science, Oct-December 2009, Vol. 11, No. 4, p. 172-174. <http://www.jkscience.org/current/6+Swine+Flu+Emerging+Threats.pdf> (vizitat 12.03.2010).
150. Matrosovich M. et al. Overexpression of the  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase in MDCK Cells Increases Influenza Virus Sensitivity to Neuraminidase Inhibitors. In: Journal of Virology, 2003, 77 (15), p. 8418-8425. Doi: 10.1128/JVI.77.15.8418-8425.2003. <http://jvi.asm.org/content/77/15/8418.full.pdf> (vizitat 10.10.2013).
151. Govorkova E.A. et al. African Green Monkey Kidney (vero) cells provide an alternative host system for influenza A and B viruses. In: Journal of Virology, 1996, 70 (8), p. 5519-5524. <http://jvi.asm.org/content/70/8/5519.full.pdf> (vizitat 06.02.2014).
152. Жирнов О.П. и др. Патогенетическое действие пандемического вируса гриппа H1N1 при размножении в культурах клеток человека. В: Вопросы вирусологии, 2013, №4, стр.20-28.
153. Zhirnov O.P. et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. In: J Clin Virol, 2009, no.45 (4), p. 322-333. Doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.030. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546028](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546028) (vizitat 09.12.2013).
154. Li D. et al. In Vivo and In Vitro Alterations in Influenza A/H3N2 Virus M2 and Haemagglutinin Genes: Effect of Passage in MDCK-SIAT1 Cells and Conventional MDCK Cells. In: J. Clin. Microbiol., 2009, 47 (2), p.466-468. Doi: 10.1128/JCM.00892-08. <http://jcm.asm.org/content/47/2/466.full.pdf+html> (vizitat 13.11.2013).
155. Dubalari V. ș.a. Monitorizarea virusologică cu caracteristica antigenică și filogenetică a tulpinilor gripale izolate în perioada postpandemică. În: Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină, Materialele Conferinței a VII-a a medicilor-infecționiști din Republica Moldova, nr.5(44), 2012, p. 95-98.
156. Spînu C. ș.a. Măsurile de control și răspuns la gripă realizate prin actualul sistem de supraveghere. În: Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, Conferința Națională de Epidemiologie, Iași, 10-12 noiembrie 2011, Vol. 56, C09.

157. Eder V. Caracteristica antigenică și genotipică a virusurilor gripale identificate în perioadele prepandemică, pandemică și postpandemică în Republica Moldova. În: Curierul Medical, ISSN 1857-0666, April 2014, Vol. 57, No. 2, p. 50-59.
158. Spînu C. ș.a. Gripa pandemică A(H1N1) în Republica Moldova. În: Buletinul AȘM, Științe medicale, Nr. 5 (28), 2010, p. 109-119.
159. Инструкция по применению иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сухих (ИФ-Г); утв. Главным Государственным врачом Российской Федерации, 30.01.2009 г. №01-11/4-09.
160. Масалова О.В. и др. Выявление консервативных и вариабельных эпитопов гемагглютинаина штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с помощью моноклональных антител. В: Вопросы вирусологии, 2014, №3, стр. 34-40.
161. Dubalari V. ș.a. Rezultate privind investigarea bolnavilor cu gripă prin tehnici de biologie moleculară. În: Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, Conferința Națională de Epidemiologie, Iași, 10-12 noiembrie 2011, Vol. 56, P38.
162. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва, Практика, 1999 г, 460с.
163. Pandemic influenza preparedness planning. Report on the second joint WHO/European Commission workshop, Copenhagen, 24-26 October 2005. WHO 2006. [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0019/90451/E88206.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0019/90451/E88206.pdf) (vizitat 01.11.2014).
164. WHO Influenza Center Report September 2009. MRC National Institute for Medical Research. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_sep\\_2009.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_sep_2009.pdf) (vizitat 01.11.2014).
165. WHO Influenza Center. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of the influenza vaccine for the Northern Hemisphere. February 2010. MRC National Institute for Medical Research. [http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_feb\\_2010.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_feb_2010.pdf) (vizitat 03.11.2014).
166. Tse H. et al. Structural basis and sequence co-evolution analysis of the hemagglutinin protein of pandemic influenza A/H1N1 (2009) virus. Original Research. In: Experimental Biology and Medicine, 2011, 236, p. 915-925. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21727184> (vizitat 09.12.2013).
167. WHO Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1)2009 viruses. 28 December 2009. [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/cp165\\_2009\\_2812\\_review\\_d222g\\_a\\_mino\\_acid\\_substitution\\_in\\_ha\\_h1n1\\_viruses.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/cp165_2009_2812_review_d222g_a_mino_acid_substitution_in_ha_h1n1_viruses.pdf) (vizitat 03.11.2012).

168. ECDC Influenza virus characterization, Summary Europe, January 2011 (Technical Document).  
[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/influenza/epidemiological\\_data/Pages/Influenza\\_virus\\_characterisation.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/influenza/epidemiological_data/Pages/Influenza_virus_characterisation.aspx) (vizitat 03.11.2012).
169. Chutinimitkul S. al. Virulence-Associated Substitution D222G in the Hemagglutinin of 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Affects Receptor Binding. In: Journal of Virology, Nov. 2010, p. 11802-11813 (Doi:10.1128/JVI.01136-10).  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844044> (vizitat 03.11.2012).
170. Daput I.C. et al. Genetic Characterization of Human Influenza Viruses in the Pandemic (2009-2010) and Post-Pandemic (2010-2011) Periods in Japan. In: PloS ONE 2012, 7(6): e36455. Doi:10.1371/journal.pone.0036455.  
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0036455> (vizitat 03.11.2012).
171. Pandemic (H1N1)2009 in the European Region. WHO, 2010.  
<http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/pandemic-h1n1-2009> (vizitat 04.11.2014).
172. Summary of the first post-pandemic influenza season in the WHO European region: 2010-2011. WHO, 2011.  
[www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0010/153379/flu\\_2010-2011\\_summary.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0010/153379/flu_2010-2011_summary.pdf?ua=1) (vizitat 04.11.2014).
173. WHO/Europe interim recommendations on influenza vaccination during the 2010/2011 winter season.  
[http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0004/122467/Flu\\_vaccine\\_recom.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0004/122467/Flu_vaccine_recom.pdf) (vizitat 06.11.2014).
174. Spînu C. et al. The significance of the influenza, ARI and SARI surveillance system in Republic of Moldova. Poster. 3rd International Influeza Meeting, Muenster, Germany. September 2nd-4th, 2012, P88.
175. Спыну К.И., П.Г. Скоферца, Едер В.А., и др. Результаты внедрения системы эпиднадзора за гриппом, ОРВИ и ТОРИ в Республике Молдова. В: Тези Доповідей: Науково-практична конференція «СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПРОБЛЕМИ ІНФЕКЦІЙНОЇ ЗАХВОРЮВАНОСТІ В УКРАЇНІ», Київ, 10 жовтня 2012, стр. 24-25.
176. Cojocar R. et al. Improvement of the influenza, ARI and SARI surveillance system in Republic of Moldova. Poster. European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), 24-26 October 2012, Edinburgh, UK. Abstract book, p. 99.



177. WHO Influenza Center. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of the influenza vaccine for the Northern Hemisphere. February 2012. MRC National Institute for Medical Research.  
[http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim\\_report\\_feb\\_2012.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim_report_feb_2012.pdf) (vizitat 03.11.2014).
178. Spînu C., Eder V., Bahnarel I. et al. Evaluation of ILI, ARI and SARI surveillance system in the Republic of Moldova in the 2012-2013 season. In: Romanian Archives of Microbiology and Immunology, July – September 2013, Vol. 72, Issue 3, p. 183-185.
179. Cojocaru R., Spînu C., Eder V. et al. Strengthening of the surveillance system for influenza, ARI and SARI in the Republic of Moldova. In: Options for the Control of Influenza, Cape Town, South Africa, 5-10 September 2013, Abstract LBA-P2-017, p. 643.
180. Spînu C., Grama O., Eder V. et al. Studying and evaluating of influenza, ARI and SARI morbidity evolution with control and response measures achieving in 2012-2013 epidemic season in the Republic of Moldova. In: Archives of the Balkan Medical Union, ISSN 0041-6940, September 2013, Vol. 48, No. 3-Supplement, p.487-491.
181. Spînu C. et al. The results of the implementation epidemiological surveillance system and control and response measures to influenza, acute viral respiratory infections (ARI) and severe acute respiratory infection (SARI). В: Актуальные Вопросы Эпидемиологии, Материалы Научно-Практической Конференции с Международным Участием, Посвященной 90-летию Института НИИ Эпидемиологии, Вирусологии и Медицинской Паразитологии им. А.Б. Алексаняна, Ереван, 2013, стр. 237-239.
182. Spînu C., Scoferta P., Eder V. et al. Evaluation of the influenza, acute respiratory infections and severe acute respiratory infections by the surveillance system in the Republic of Moldova. In: Curierul Medical, ISSN 1857-0666, October 2013, Vol. 56, No. 5, p. 133-137.
183. WHO. Weekly epidemiological record. No. 10, 2012, 87, 81-96  
<http://www.who.int/wer/2012/wer8710.pdf?ua=1> (vizitat 13.11.2014).
184. Joint WHO Regional Office for Europe/ECDC meeting on Influenza Surveillance. Report. 29-31 May, 2013, Istanbul, Turkey.  
[http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0007/155509/e96072.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0007/155509/e96072.pdf) (vizitat 09.12.2013).
185. WHO Influenza Center. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of the influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2014. September 2013. MRC National Institute for Medical Research.

- <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Sep2013final.pdf> (vizitat 13.11.2014).
186. Spînu C., Scoferța P., Eder V. et al. Gripa, infecțiile respiratorii virale acute și infecțiile respiratorii acute severe în Republica Moldova, sezonul 2013-2014: măsuri de control și răspuns. Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină, Materialele Conferinței Centrul de Sănătate Publică din Municipiul Chișinău – 70 ani de ani la straja sănătății, nr. 6 (57), 2014, p. 57-61.
187. ECDC. Surveillance report. Influenza virus characterisation. Summary Europe, May 2014. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/influenza-characterisation-report-may-2014.pdf> (vizitat 24.11.2014).
188. Spinu C. Eder V., Scoferts P. et al. Phenotypic and genotypic significance of influenza viruses identified in the Republic of Moldova. Poster. 4th International Influenza Meeting, Muenster, Germany, 21-23 September, 2014, P98, p.145.
189. WHO Influenza Center. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of the influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2014/15. February 2014. MRC National Institute for Medical Research. London, UK. <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Feb2014-web.pdf> (vizitat 24.11.2014).
190. Spinu C., Eder V., Scoferta P. et al. Clinical and epidemiological importance of genotypic and phenotypic characteristic of influenza viruses identified in the Republic of Moldova. In: Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia și Epidemiologia. A VII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, 2014. Vol. 59, nr. 3-4, p.31.
191. Broberg E. et al. Start of the 2014/15 influenza season in Europe: drifted influenza A(H3N2) viruses circulate as dominant subtype. În: Euro Surveill. 2015; 20(4):pii=21023. IF = 4.659. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21023>

# ANEXE

## ANEXA 1 ACTE DE IMPLEMENTARE



### MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

str. Vasile Alexandri 2, MD-2000, mun. Chișinău  
tel. +373 22 729 907, +373 22 26 88 18; fax +373 22 738 781; e-mail: [office@ms.gov.md](mailto:office@ms.gov.md)  
[www.ms.gov.md](http://www.ms.gov.md)

Ed. ed. 2015 nr. 01-10/21  
la nr. \_\_\_\_\_ din \_\_\_\_\_

#### Act de implementare

Prin prezenta confirmăm implementarea rezultatelor, obținute de dna Veronica Eder competitoră a CNSP de comun cu alți autori pe parcursul realizării temei de doctor în științe biologice „Studierea și evaluarea virusurilor gripale în perioadele pandemică și interepidemică” (2012-2014), în activitatea Serviciului de Supraveghere de Stat a Sănătății Publice, după cum urmează:

1. Plan-cadru intersectorial gradual pentru combaterea efectelor pandemiei cu virusul gripal nou A(H1N1) în Republica Moldova, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 824 din 15.12.2009
2. Dispoziția Guvernului RM nr.15-d din 20 ianuarie 2011 „Cu privire la situația epidemiologică prin gripă în Republica Moldova”
3. Hotărârea Colegiului MS din 22 septembrie 2011 „Privind situația epidemiologică prin gripă, IACRS și pneumonii în perioada sezonului 2010-2011 în RM: măsuri de control și răspuns”
4. Hotărârea Comisiei Naționale Extraordinare de Sănătate Publică nr. 1 din 23 decembrie 2011 „Privind situația epidemiologică prin gripă, IACRS și pneumonii în perioada sezonului 2010-2011 în RM: măsuri de control și răspuns”
5. Hotărârea Comisiei Naționale Extraordinare de Sănătate Publică nr. 4 din 1 noiembrie 2012 „Privind situația epidemiologică la gripă, infecții acute ale căilor

respiratorii superioare (IACRS), infecții respiratorii acute severe (SARI) și asigurarea gradului de pregătire către sezonul rece (2012-2013).

6. Hotărârea Comisiei Naționale Extraordinare de Sănătate Publică nr. 1 din 28 ianuarie 2013 „Privind situația epidemiologică la gripă, infecții acute ale căilor respiratorii superioare și infecții respiratorii acute severe și realizarea măsurilor de control și răspuns în sezonul 2012-2013”
7. Hotărârea Comisiei Naționale Extraordinare de Sănătate Publică nr. 1 din 27 februarie 2013 „Privind evoluția situației epidemiologice la gripă, infecții acute ale căilor respiratorii superioare și infecții respiratorii acute severe: măsuri de control și răspuns”
8. Hotărârea Comisiei Naționale Extraordinare de Sănătate Publică nr. 6 din 13 decembrie 2013 „Privind situația epidemiologică la gripă, infecțiile acute ale căilor respiratorii superioare (IACRS) și infecțiile respiratorii acute severe (SARI) cu realizarea măsurilor de control și răspuns în sezonul 2013-2014”

Șef Direcție Sănătate Publică



Carolina Cerniciuc



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ

MD 2028, mun. Chișinău, str. Gh. Asachi 67A, Tel. +373 22 574 501; Fax. +373 22 729 725,  
<http://www.cnsp.md>, e-mail: [anticameră@cnsp.md](mailto:anticameră@cnsp.md), [cnsp@cnsp.md](mailto:cnsp@cnsp.md)

31.01.2015 Nr. 01-3/184

La nr. \_\_\_\_\_ din \_\_\_\_\_

**Act de implementare**

Prin prezenta confirmăm implementarea rezultatelor, obținute de dna Veronica Eder competitoră a CNSP de comun cu alți autori pe parcursul realizării temei de doctor în științe biologice „Studierea și evaluarea virusurilor gripale în perioadele pandemică și interepidemică” (2012-2014), în activitatea CNSP și Serviciului de Supraveghere de Stat a Sănătății Publice, după cum urmează:

1. Ordinul MS nr. 366 din 30.10.2009 „Cu privire la măsurile de vigilență și răspuns la pandemia cu noul virus gripal A(H1N1)”
2. Ordinul MS nr. 399 din 16.11.2009 „Cu privire la modificarea ordinului MS nr. 366 din 30.10.2009 (capitolul I, p. 6 și capitolul IV, anexa nr. 4)”
3. Ordinul MS nr. 495 din 15.12.2009 „Privind vaccinarea împotriva gripei pandemice a contingentelor cu risc sporit de îmbolnăvire cu vaccinul CANTGRIP”
4. Ordinul MS nr. 65 din 29.01.2010 „Cu privire la planul de acțiuni al Ministerului Sănătății pentru realizarea Planului-cadru intersectorial gradual pentru combaterea efectelor pandemiei cu virusul gripal nou A(H1N1) în Republica Moldova”
5. Ordinul MS nr. 316 din 12.05.2010 „Privind vaccinarea împotriva gripei pandemice cu vaccinul PANENZA”
6. Ordinul MS nr. 824 din 31.10.2011 „Cu privire la perfectarea sistemului de supraveghere la gripă și infecțiile acute ale căilor respiratorii în Republica Moldova”
7. Ordinul MS nr. 1088 din 30.10.2012 „Privind vaccinarea contra gripei sezoniere către sezonul gripal 2012-2013”



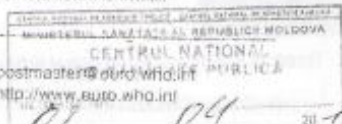
8. Ordinul CNSP nr. 116 din 28.11.2012 „Cu privire la fortificarea sistemului național de supraveghere și sentinelă a bolilor transmisibile cu potențial epidemic”
9. Ordinul MS nr. 1249 din 06.11.2013 „Privind vaccinarea contra gripei sezoniere către sezonul gripal 2013-2014”
10. Ordinul MS nr. 701 din 17.06.2013 „Cu privire la petrecerea seminarului zonal privind implementarea Programului Național de combatere a hepatitelor virale B, C și D și perfecționarea sistemului de supraveghere la gripă, IACRS și SARI”
11. Ordinul MS nr. 1248 din 10.11.2014 „Privind vaccinarea contra gripei sezoniere către sezonul gripal 2014-2015”
12. Dispoziția MS nr. 615-d din 27.12.2010 „Cu privire la unele măsuri de profilaxie a gripei în sezonul rece al anilor 2010-2011”
13. Dispoziția MS nr. 19-d din 25.01.2011 „Cu privire la situația epidemiologică prin gripă în Republica Moldova”
14. Dispozițiile MS nr. 151-d din 08.04.2011, nr. 202-d din 18.05.2012, nr. 162-d din 03.05.2013, nr. 244-d din 17.05.2014 „Cu privire la suspendarea prezentării informației săptămânale privind morbiditatea prin gripă și IRVA de către CSP teritoriale”
15. Dispozițiile Ministerului Sănătății nr. 356-d din 28.09.2012 „Cu privire la prezentarea informației săptămânale privind morbiditatea prin gripă, IACRS și SARI de către CSP teritoriale”, nr. 325-d din 27.09.2013 și nr. 498-d din 29.09.2014 „Cu privire la prezentarea informației săptămânale privind morbiditatea prin gripă, IACRS și SARI de către CSP teritoriale, inclusiv monitorizarea virusologică în cadrul sistemului de supraveghere sentinelă”

**Director general**



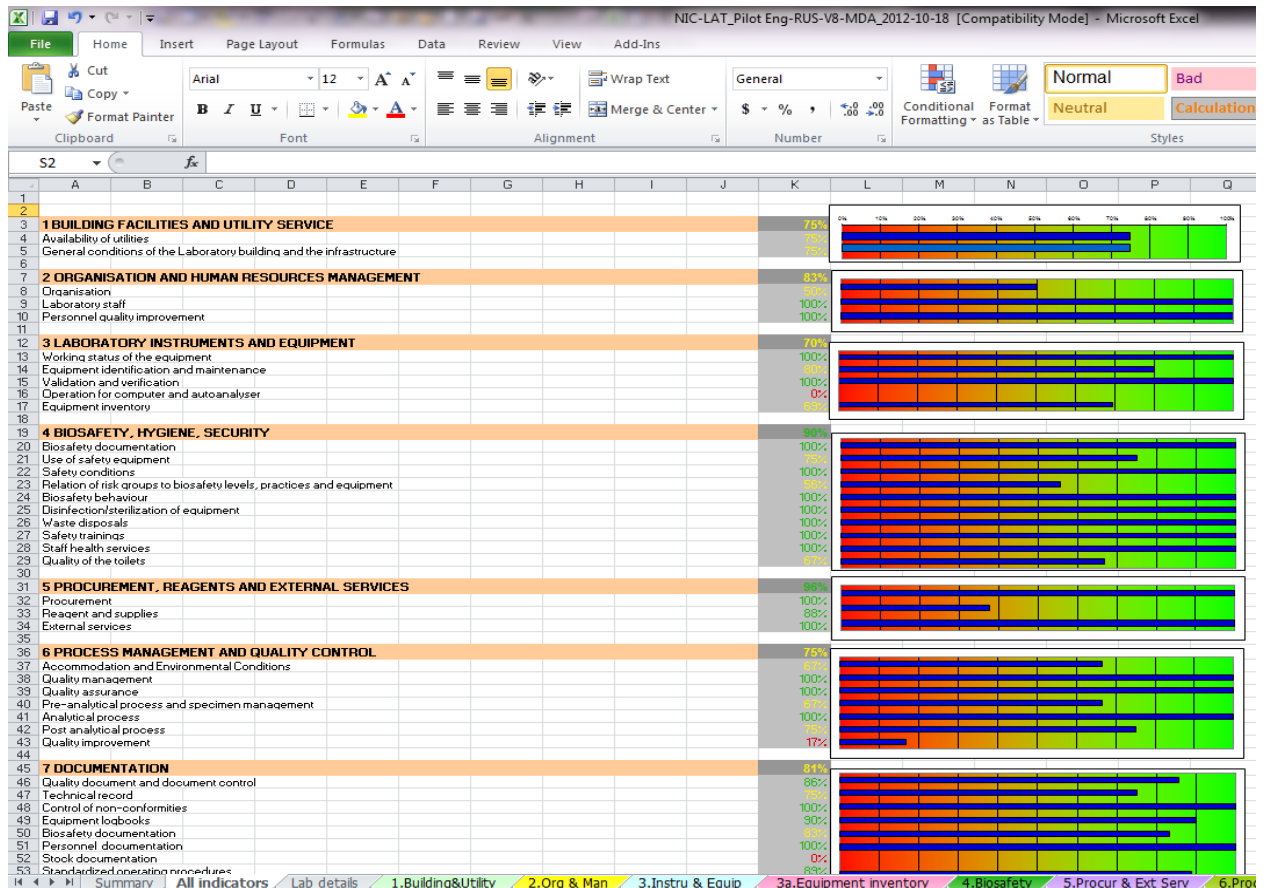
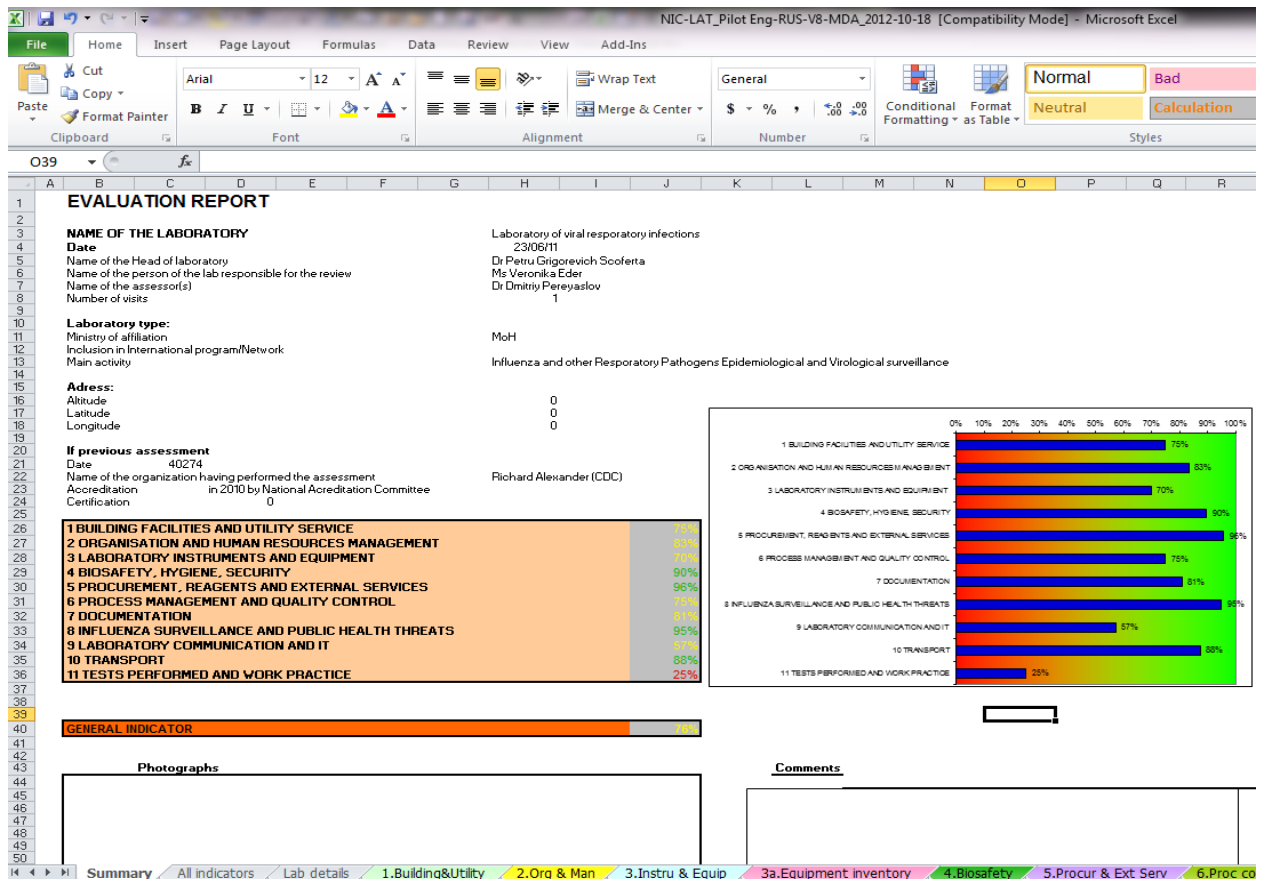
**Mihail Pîsla**

**ANEXA 2 ACREDITAREA LABORATORULUI EPIDEMIOLOGIA INFECȚIILOR  
RESPIRATORII VIRALE A CNSP DE CĂTRE OMS (scrisoare)**

 WORLD HEALTH ORGANIZATION ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE WELTGESUNDHEITSORGANISATION ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ	Date: 18 March 2013	
REGIONAL OFFICE FOR EUROPE BUREAU REGIONAL DE L'EUROPE REGIONALBÜRO FÜR EUROPA ЕВРОПЕЙСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ БЮРО	Dr Andrei Usatii Minister of Health Ministry of Health 2, Alexandri Str. MD-2009 Chisinau Republic of Moldova	
Head office: 8, Scheffgøvej, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark Telephone: +45 39 17 17 17; Fax: +45 39 17 18 18; E-mail: postmaster@euro.who.int Web site: http://www.euro.who.int	<i>Dr. Berzan</i> <i>Prof. Dr. Spina</i> <i>Dr. Usatii</i>	
Our reference: PDMA/ha      Your reference: Notre référence:              Votre référence: Unser Zeichen:                Ihr Zeichen: См. наш номер:                На Ваш номер:		
Dear Sir,		
<b>WHO National Influenza Centre (NIC)          Virology Laboratory at the National Centre of Public Health</b>		
<p>I have the honour to inform you that, following the request of the Ministry for Health, the Virology Laboratory at the National Centre of Public Health in the Republic of Moldova headed by Professor Constantin Spina in Chisinau, the Republic of Moldova has been recognized as a WHO National Influenza Centre (NIC) and a member of the WHO Global Influenza Surveillance and Response System.</p> <p>Please find the enclosed Terms of Reference for the National Influenza Centres. Official recognition by WHO is for one year and will be annually reviewed based on criteria for maintaining WHO recognition and annual review of NIC compliance with the Terms of Reference.</p> <p>I hope that it will be possible for the WHO to call upon the Virology Laboratory at National Centre of Public Health, Chisinau, for expertise on influenza whenever necessary and participation in the activities of the WHO Global Influenza Surveillance and Response System.</p>		
Yours very truly,  Zsuzsanna Jakab Regional Director		
<b>Enclosures:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Terms of Reference for National Influenza Centres</li> <li>• How to become a WHO-recognized National Influenza Centre: Description of the process for influenza laboratories in the WHO European Region</li> </ul>		
<b>Copy for information to:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dr Eugenia Berzan, Head, Foreign Relations, Ministry of Health, 2, Alexandri Str., MD-2009 Chisinau, Republic of Moldova</li> <li>• Dr Jarmo Habicht, WHO Representative, WHO Country Office, Republic of Moldova, 29, Stefan Tariu Street, MD-2012 Chisinau, Republic of Moldova</li> <li>• Ms Nicola Harrington, Resident Coordinator of the UN and Resident Representative of UNDP in the Republic of Moldova</li> <li>• United Nations Development Programme, 31 August 1989 str. - Building 131, MD-277012 Chisinau, Republic of Moldova</li> <li>• Prof Constantin Spina, Deputy Director, National Centre for Public Health, Cuzaia 3 str. MD-02009 Chisinau Republic of Moldova</li> </ul>		
8, Scheffgøvej DK-2100 Copenhagen Ø Denmark	Telephone: +45 39 17 17 17 Fax: +45 39 17 18 18	E-mail: postmaster@euro.who.int Web site: http://www.euro.who.int
		



# ANEXA 3 CHESTIONARUL PRIVIND ACREDITAREA DE CĂTRE OMS



**ANEXA 4 CERTIFICATE DE REALIZARE A PROGRAMELOR DE CONTROL  
EXTERN DE CALITATE**

WHO External Quality Assessment Programme for the Detection of Influenza Virus Type A by PCR

**WHO External Quality Assessment Programme for the  
Detection of Influenza Virus Type A by PCR  
Panel 5 (January-February 2009)**

Your lab code:	253
Date panel sent: (dd/mm/yyyy)	19/01/2009
Date panel received:	23/01/2009
Date results reported:	30/03/2009
Turn-around time (day):	66

**Summary of your reported results:**

Sample No.	Intended result	Your results
2009-01	H1 positive	H1N1
2009-02	H5 positive	H5
2009-03	Nil	FluA Neg
2009-04	H5 positive	H5N1
2009-05	H3 positive	H3N2
2009-06	H5 positive	H5
2009-07	H5 positive	H5N1
2009-08	H5 positive	H5
2009-09	H5 positive	H5N1
2009-10	H1 positive	H1N1

**Comments:**

You have reported all correct influenza A subtyping results.

**WHO External Quality Assessment Programme for the  
Detection of Influenza Virus Type A by PCR  
Panel 6 (June-August 2009)**

Your lab code:	253
Date panel sent: (dd/mm/yyyy)	22/06/2009
Date panel received:	04/07/2009
Date results reported:	27/07/2009
Turn-around time (day):	23

**Summary of your reported results:**

Sample No.	Intended result	Your results
2009-11	H5 positive	H5N1
2009-12	H1v positive	H1v
2009-13	H1 positive	H1N1
2009-14	H5 positive	H5N1
2009-15	H5 positive	H5N1
2009-16	H1v positive	H1v
2009-17	H5 positive	H5
2009-18	H3 positive	H1N2 (A/M gene Pos, H3 gene Neg)
2009-19	H5 positive	H5N1
2009-20	H5 positive	H5N1

**Comments:**

You have failed to detect H3 sample.

**WHO External Quality Assessment Programme for the  
 Detection of Influenza Virus Type A by PCR  
 Panel 7 (January-March 2010)**

Your lab code:	253
Date panel sent: (dd/mm/yyyy)	18/01/2010
Date panel received:	22/01/2010
Date results reported:	22/02/2010
Turn-around time (day):	31

Sample No.	Intended result	Your result	Remarks <sup>d</sup>
2010-01	A/H1	H1N1	
2010-02	A/H5	H5N1	
2010-03	A/H3	H3N2	
2010-04	A/H5	H5N1	
2010-05	A/H1pdm	H1N1pdm	
2010-06	A/H5	H5N1	
2010-07	Flu B	FluB	
2010-08	A/H5	H5N1	
2010-09	Negative	FluA Neg, FluB Neg	
2010-10	A/H1pdm	H1N1pdm	

<sup>a</sup> A/H1pdm refers to pandemic influenza A(H1N1) 2009

<sup>d</sup> No Remarks will be given for all correct results

**Remarks:**

1. failing to detect H5 samples and/or reporting the results as non-H5 subtype were recorded as an incorrect response.
2. failing to detect H1 samples and/or reporting the results as non-H1 subtype were recorded as an incorrect response.
3. failing to detect H3 samples and/or reporting the results as non-H3 subtype were recorded as an incorrect response.
4. failing to detect H1pdm samples and/or reporting the results as non-H1pdm subtype were recorded as an incorrect response.
5. failing to report correct influenza A test results for H1/H3/H1pdm samples if H1/H3/H1pdm subtyping was not performed was recorded as an incorrect response.
6. failing to detect influenza B sample and/or reporting the results as influenza A type were recorded as an incorrect response.
7. failing to report negative influenza A test results for influenza B sample if influenza B test was not performed was recorded as an incorrect response.
8. reporting 'H1pdm and H5' for H5 samples was recorded as correct response if using 'CDC real-time RT-PCR 5-in-1 H1 Assay'.
9. reporting positive results for a sample that did not contain any influenza viral RNA was recorded as an incorrect response.

**WHO External Quality Assessment Programme for the  
 Detection of Influenza Virus Type A by PCR  
 Panel 8 (June - August 2010)**

Your lab code:	253
Date panel sent: (dd/mm/yyyy)	14/06/2010
Date panel received:	18/06/2010
Date results reported:	01/07/2010
Turn-around time (day):	13

Sample No.	Intended result	Your result	Remarks <sup>#</sup>
2010-11	Flu B	Flu B	
2010-12	A/H1pdm *	H1pdm, N1	
2010-13	A/H5	H5N1	
2010-14	A/H3	H3N2	
2010-15	A/H5	H5N1	
2010-16	Negative	Flu A Neg, Flu B Neg	
2010-17	A/H1	H1N1	
2010-18	A/H5	H5N1	
2010-19	A/H5	H5N1	
2010-20	A/H1pdm *	H1pdm, N1	

\*A/H1pdm refers to pandemic influenza A(H1N1) 2009

#No remarks will be given for all correct results

**Remarks:**

1. failing to detect H5 samples and/or reporting the results as non-H5 subtype were recorded as an incorrect response;
2. failing to detect H1 samples and/or reporting the results as non-H1 subtype were recorded as an incorrect response;
3. failing to detect H3 samples and/or reporting the results as non-H3 subtype were recorded as an incorrect response;
4. failing to detect H1pdm samples and/or reporting the results as non-H1pdm subtype were recorded as an incorrect response;
5. failing to report correct influenza A test results for H1/H3/H1pdm samples if H1/H3/H1pdm subtyping was not performed was recorded as an incorrect response;
6. failing to detect influenza B samples and/or reporting the results as influenza A type were recorded as an incorrect response;
7. failing to report negative influenza A test results for influenza B samples if influenza B tests were not performed were recorded as an incorrect response;
8. reporting 'H1pdm and H5' for H5 samples was recorded as correct response if using 'CDC real-time RT-PCR Swine H1 Assay'
9. reporting positive results for a sample that did not contain any influenza viral RNA was recorded as an incorrect response

Any queries about this report can be sent to [eqap@dh.gov.hk](mailto:eqap@dh.gov.hk)



**Centre for Health Protection**  
Department of Health  
The Government of the Hong Kong Special Administrative Region

## CERTIFICATE OF COMPLETION

This certificate is awarded to

**National Center for Public Health, Moldova**

In recognition of the completion of  
**EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT PROGRAMME FOR THE DETECTION OF  
INFLUENZA VIRUS TYPE A BY PCR  
PANELS 9 AND 10**

January — March 2011 and June — July 2011

*Supported by:*  
World Health Organization, (WHO)

*Organized by:*  
Centre for Health Protection, Hong Kong SAR

Dr Willina Lim – CHP

Signature

31 October 2011  
Date



**Centre for Health Protection**  
Department of Health  
The Government of the Hong Kong Special Administrative Region

## CERTIFICATE OF COMPLETION

This certificate is awarded to

**National Center for Public Health, Moldova**

In recognition of the completion of  
**EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT PROGRAMME FOR THE DETECTION OF  
INFLUENZA VIRUS TYPE A BY PCR**  
of the World Health Organization Global Influenza Surveillance and Response System  
Panel 11 with attainment of full score  
2012

*Supported by:*  
World Health Organization

*Organized by:*  
Centre for Health Protection (CHP), Department of Health (DH),  
The Government of the Hong Kong Special Administrative Region (HKSAR Government)

Signature (Dr. Janice Lo, CHP, DH, HKSAR Government)

31 October 2012  
Date



This is to certify that  
MOH - National Influenza Laboratory  
CNSP: National Centre for Public Health  
Chisinau  
Moldova

has participated in the  
WHO 2011 Influenza virus Culture EQA Programme



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. van Loon'.

Dr Anton van Loon  
QCMD Co-ordinator

Thank you for going green

CRT003/01





**Centre for Health Protection**  
Department of Health  
The Government of the Hong Kong Special Administrative Region

## CERTIFICATE OF COMPLETION

This certificate is awarded to

**National Center for Public Health, Moldova**

In recognition of the completion of  
**EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT PROGRAMME FOR THE DETECTION OF  
INFLUENZA VIRUS TYPE A BY PCR**  
of the World Health Organization Global Influenza Surveillance and Response System  
Panel 12 with attainment of full score  
2013

*Supported by:*  
World Health Organization

*Organized by:*  
Centre for Health Protection (CHP), Department of Health (DH),  
The Government of the Hong Kong Special Administrative Region (HKSAR Government)

Signature (Dr. Janice Lo, CHP, DH, HKSAR Government)

28 October 2013  
Date



**Centre for Health Protection**  
Department of Health  
The Government of the Hong Kong Special Administrative Region

## CERTIFICATE OF COMPLETION

This certificate is awarded to

**National Center for Public Health, Moldova**

In recognition of the completion of  
**EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT PROGRAMME FOR THE DETECTION OF  
INFLUENZA VIRUSES BY RT-PCR**  
of the World Health Organization Global Influenza Surveillance and Response System  
Panel 13 with attainment of full score  
2014

*Supported by:*  
World Health Organization

*Organized by:*  
Centre for Health Protection (CHP), Department of Health (DH),  
The Government of the Hong Kong Special Administrative Region (HKSAR Government)

Signature (Dr. Janice Lo, CHP, DH, HKSAR Government)

6 November 2014  
Date



## ANEXA 5 BREVET DE INVENȚIE



REPUBLICA MOLDOVA

Agenția de Stat pentru  
Proprietatea Intelectuală

**BREVET**  
DE INVENȚIE  
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. 782

Eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Metodă de vaccinare contra gripei**

Titular: **CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL  
MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII  
MOLDOVA, MD**

Data depozit: 2013.07.16

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte  
integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată



Director General  


CHIȘINĂU



MD 782 Z 2015.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **782** (13) **Z**  
(51) Int.Cl: *A61K 31/56* (2006.01)  
*A61K 35/76* (2006.01)  
*C07J 71/00* (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE  
DE SCURTĂ DURATĂ

<p>(21) Nr. depozit: s 2014 0008 (22) Data depozit: 2013.07.16 (67)* Nr. și data transformării cererii: a 2013 0047; 2014.01.21</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.06.30, BOP1 nr. 6/2014</p>
<p>(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: SPĂNU Constantin, MD; SCOPERȚA Petru, MD; SPĂNU Igor, MD; EDER Veronica, MD; DONOS Alu, MD (73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

(54) Metodă de vaccinare contra gripei

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la medicină, în special la boli infecțioase, și poate fi utilizată pentru profilaxia gripei.


Conform invenției, metoda revendicată constă în aceea că se administrează vaccinul gripal și concomitent se administrează un remediu ce include la o capsulă: (tomatozida-5α furostan-3α, 22,26triol-3[O-β-

2  
galactopiranozî(1→2)β-D-glucopirano-  
zil(1→4)-β-D-galactopiranozid]-26-O-β-D  
glucopiranozid) – 0,05 g; celuloză  
microcristalină – 0,147 g; amidon de porumb –  
0,100 g; stearat de magneziu – 0,003 g, câte o  
capsulă, cu 30 min înainte de masă, timp de 30  
zile.

Revendicări: 1

MD 782 Z 2015.01.31

## ANEXA 6 DIPLOMA CUPA MARELE PREMIU



INSTITUTUL NAȚIONAL  
DE INVENTICĂ,  
IAȘI, ROMANIA

# Diploma

## CUPA MARELE PREMIU AL INSTITUTULUI NAȚIONAL DE INVENTICĂ, IAȘI

Se ofera  
Prof. univ., Dr. hab. med., Constantin SPINU  
cu echipa


Igor SPINU, Vladimir GURIEV, Petru SCOFERTA, Maria ISAC, Octavian SAJEN,  
Veronica EDER, Olga BURDUNIUC, Radu COJOCARU, Stela GHEORGHITA,  
Ludmila BIRCA, Ala DONOS, Tatiana JURAVLIOV, Stela CORNILOV.

pentru invențiile prezentate în cadrul celei de  
A XII-A EDIȚIE A SALONULUI INTERNAȚIONAL  
AL CERCETĂRII, INOVĂRII ȘI INVENTICII

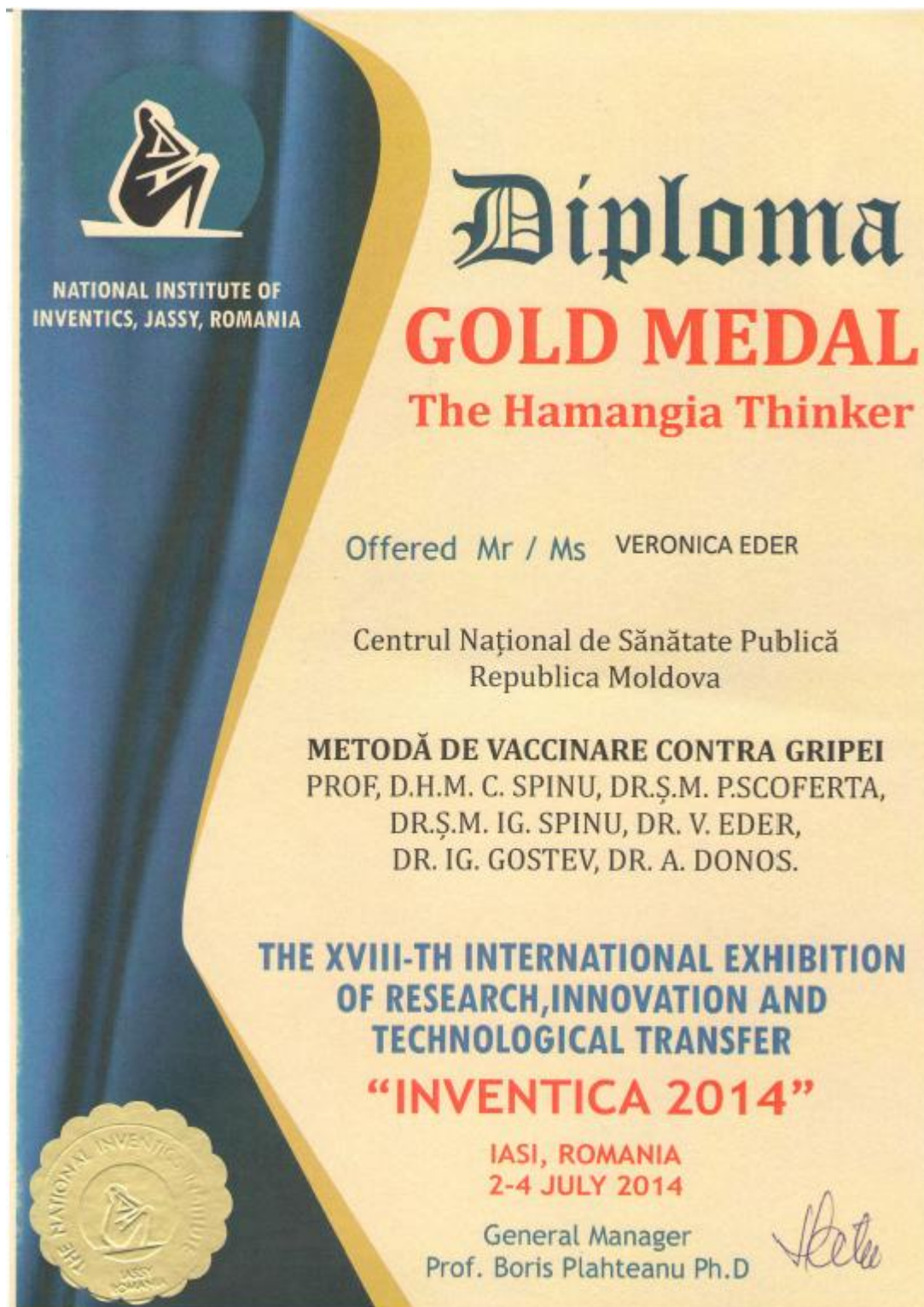
### “PRO INVENT 2014”

Cluj - Napoca, ROMANIA  
19-21 MARTIE 2014

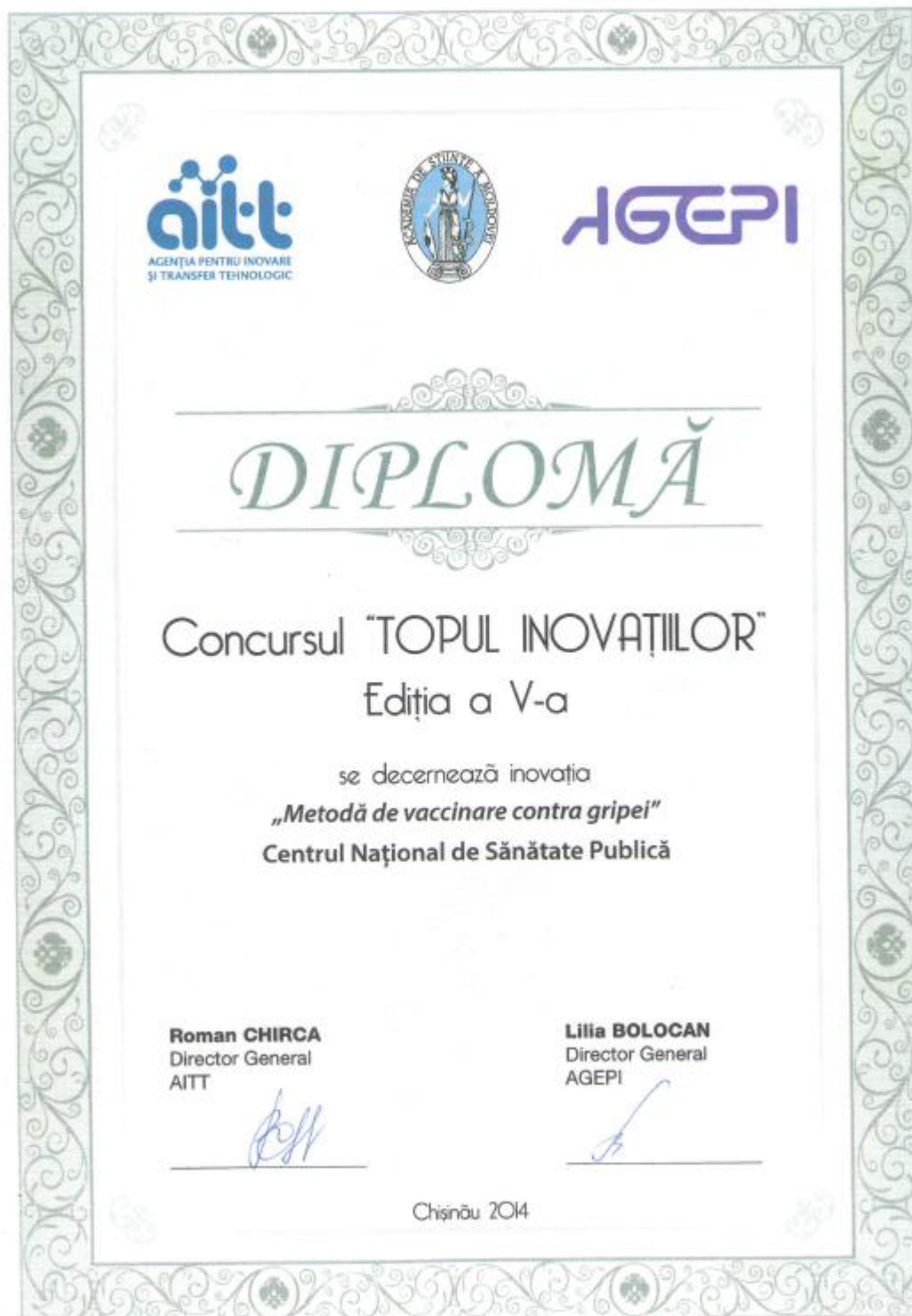
General Manager  
Prof. Boris Plahteanu Ph.D



**ANEXA 7 DIPLOMA MEDALIA DE AUR**



## ANEXA 8 DIPLOMA DE DECERNARE



## ANEXA 9 DIPLOMA DE EXCELENȚĂ ȘI MEDALIA DE AUR



**UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN CLUJ-NAPOCA**  
sub egida MINISTERULUI EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE  
ȘI ACADEMIEI DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMÂNIA, FILIALA CLUJ

**SALONUL INTERNAȚIONAL DE INVENTICĂ**  
**PRO INVENT**, Ediția a XIII-a, 2015, Cluj-Napoca, România

**DIPLOMA**  
DE EXCELENȚĂ  
ȘI MEDALIA DE AUR CU MENȚIUNE SPECIALĂ

Se acordă **C. SPINU, P.SCOFERTA, IG. SPINU, V. EDER, IG. GOSTEV, A. DONOS**  
CENTRUL NAȚIONAL DE SANATATE PUBLICA, REPUBLICA MOLDOVA

Pentru **METODA DE VACCINARE CONTRA GRIPEI**

PREȘEDINTELE SALONULUI,  
Prof. dr. ing. **AUREL VLAICU**  
Rector al  
Universității Tehnice din Cluj-Napoca

PREȘEDINTELE JURIULUI,  
Prof. dr. ing. **RADU MUNTEANU**



## ANEXA 10 DIPLOMA GALA PREMIILOR ÎN SĂNĂTATE



GALA  
PREMIILOR  
ÎN SĂNĂTATE,  
ediția a III-a,  
2014

# CERTIFICAT

## Veronica Eder

cercetător științific, Centrul Național de Sănătate Publică

Premiul pentru „Cea mai reușită activitate în domeniul sănătății publice”. Se acordă pentru inovație, profesionalism, impact și dedicație în domeniul de activitate.

*Andrei Usatii*

*Jarno Habicht*

*Mircea Buga*

*Lilia Onea*



## DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctor sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Eder Veronica



Data

24.04.2015



## CV-ul AUTORULUI



**Nume/Prenume** Eder Veronica

**Data și locul nașterii** 5 septembrie 1974, or. Chișinău, Republica Moldova

**Cetățenia** Republica Moldova

### Studii

- 2006-2010 Studii postuniversitare prin doctorat, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM, Chișinău, Republica Moldova
- 2002-2003 Studii postuniversitare prin masterat, Specialitatea Biologie moleculară, USM, Chișinău, Republica Moldova
- 1997-2002 Studii universitare, Facultatea de Biologie și Pedologie, Specialitatea Biologie, Specializarea Genetică, USM, Chișinău, Republica Moldova
- 1997-1999 Facultatea de Arte frumoase, USM, Chișinău, Moldova
- 1991-1993 Studii medii de specialitate, Facultatea Asistente medicale, Colegiul Orășenesc de Medicină din Chișinău, Republica Moldova
- 1981-1991 Liceul teoretic român-francez „Gh. Asachi”, Chișinău, Republica Moldova

### Stagii

1. WHO course for National Influenza Centres “Principles of PCR assays development and validation”, WHO-recognized National Influenza Centre, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, The Russian Federation, 25-29 May 2015
2. CDC/APHL International Advanced Influenza Real-time RT-PCR Workshop, Atlanta, Georgia, SUA, 02-05.03.2015
3. Formarea formatorilor în managementul calității laboratoarelor, OMS, CNSP, KIT/Biomedical Research, Chișinău, Republica Moldova, 10-14.11.2014 (certificat nr. 2073)
4. Metode imunologice și molecular-genetice în microbiologie clinică, USMF „N. Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova, 09-24.06.2014
5. South Eastern European Influenza Laboratory Management

- Course, CDC, APHL, Istanbul, Turkey, 19-23.05.2014
6. Managementul riscului biologic și utilizării duble a biotehnologiilor, International Network of Universities and Institutes for Raising Awareness on Dual-Use Concerns in Bio-Technology, CNSP, Chișinău, Republica Moldova, 5-6.05.2014 (certificat nr. 1912)
  7. CSTE-CDC Influenza Data Management and Epidemiological Analysis Course, Athens, Greece, 07-11.04.2014
  8. Techniques and research on the isolation, grow and the characterization of influenza viruses isolated in Moldova, WHO Influenza Centre, National Institute for Medical Research, London, UK, 07-25.10.2013
  9. Fortificarea capacităților de supraveghere și răspuns la riscurile pentru sănătatea publică de origine biologică, MS, CNSP, Chișinău, Republica Moldova, 10.10.2013 (certificat nr. 14159)
  10. Problemele actuale al serviciului de laborator. Standardizare în medicina de laborator clinic. Tehnologii moderne, Asociația Medicilor de laborator, Chișinău, Republica Moldova, 12.09.2013 (certificat nr. 952)
  11. Seminar zonal Implementarea Programului Național de combatere a hepatitelor virale B, C și D pentru anii 2012-2016 și perfectarea sistemului de supraveghere la gripă, IACRS și SARI, Comrat, Republica Moldova, 26.06.2013
  12. Практические аспекты молекулярных методов исследования вирусов гриппа, Национальный центр по гриппу ВОЗ, ФГБУ «НИИ гриппа», Санкт-Петербург, Российская Федерация, 28.05.2012-01.06.2012
  13. Improving Influenza Laboratory Management Practices Training Course, CDC, APHL, Bangkok, Thailand, 27.02.2012 – 02.03.2012
  14. Actualități în Supravegherea și Controlul Gripei Aviare, CONFLUTECH, INCDMI „Cantacuzino”, București, România, 26-27.09.2011
  15. Bazele economice ale activității laboratoarelor în condițiile actuale. Tehnologii analitice progresive în medicina de laborator. Asociația Medicilor de laborator, Chișinău, Republica Moldova, 14.09.2011 (certificat nr. 170)
  16. Supravegherea epidemiologică a bolilor infecțioase și organizarea măsurilor de răspuns, Ministerul Sănătății al Republicii Moldova, Chișinău, 21-23.12.2010
  17. Metode de cercetări în domeniul imunologiei, USMF „N. Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova, 25.10.2010 – 25.11.2010
  18. Diagnosticul de laborator ale gripei (virologic și molecular), INCDMI „Cantacuzino”, București, România, 13-16.09.2010 (certificat nr. 1 din 16.09.2010)
  19. Aspecte ale diagnosticului virologic și molecular al gripei în sistem santinelă, INCDMI „Cantacuzino”, București, România, 28.06-02.07.2010 (certificat nr. 3 din 02.07.2010)
  20. Stagiu de pregătire teoretică și practică pentru operarea

instrumentului de PCR în timp real Bio-Rad CFX 96 (programul Bio-Rad CFX Manager Software 1.6) și a sistemului de electroforeză Bio-Rad Sub-Cell 192 cu PowerPac Universal și Bio-Rad GelDoc XR (programul Quantity One), Bio-Rad România, CNSP, Chișinău, 22-24.03.2010

21. Diagnosticul de laborator al gripei. Diagnostic molecular prin RT-PCR al gripei A/H1N1/2009, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie „Cantacuzino”, București, România, 14-18.12.2009 (certificat nr. 9 din 17.12.2009)
22. Medicina de laborator, Specializare de competență în activitate, USMF „N. Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova, 01.09.2008 – 31.12.2008
23. Seminar „Perspectives and Opportunities for Youth in Informational Technologies in Moldova”, National Commission of the Republic of Moldova for UNESCO, Moldovan Research and Development Association, March 20, 2007 (Certificate nr. 000178)
24. Seminar „Standardizarea în medicina de laborator. Aspecte organizatorice și metrologice”, Asociația Medicilor de laborator, Chișinău, Republica Moldova, 14.09.2006
25. Seminar „Teoria și practica imunomodulatorilor contemporani”, USMF „N. Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova, 03-07.10.2005

**Domeniile de activitate științifică** Microbiologie, Virusologie, Sănătate publică

**Activitatea profesională**

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 2012            | Specialist în Microbiologie, Categoria I  |
| 2011-prezent    | Cercetător științific, Laboratorul Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale, Centrul Controlul Bolilor virale, Centrul Național de Sănătate Publică, Chișinău, Republica Moldova         |
| 2011            | Membră a Societății Epidemiologilor, Microbiologilor și Parazitologilor, Republica Moldova  |
| 2009-2011       | Cercetător științific stagiar, Laboratorul Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale, Centrul Controlul Bolilor virale, Centrul Național de Sănătate Publică, Chișinău, Republica Moldova |
| 2006-2010       | Doctorandă, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM, Chișinău, Republica Moldova   |
| 2006, 2008-2009 | Cercetător științific, Laboratorul Neurosanocreatologie, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM, Chișinău, Republica Moldova  |
| 2004-2006       | Cercetător științific stagiar, Laboratorul Imunogenetică și Imunofenotipare, Institutul Oncologic, Chișinău, Republica Moldova  |
| 2004            | Laborant cu studii superioare, ÎI „IMUNOTEHNOMED” SRL, Chișinău,  |

Republica Moldova

2003 Laborant cu studii superioare, Laboratorul Bacteriologic, Institutul Oncologic, Chișinău, Republica Moldova

1993-2003 Asistentă medicală, Blocul Operator ginecologic și obstetrical, Spitalul Clinic Municipal Nr. 1, Chișinău, Republica Moldova

**Participări la  
foruri științifice  
internaționale**

1. Conferința Științifico-Practică cu Participare Internațională „CMP Chișinău trecut, prezent și viitor”, Chișinău, 23 octombrie 2009
2. A doua Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, Sinaia, România, 14-16 octombrie 2010
3. Congresul Național de Microbiologie și Conferința Națională de Epidemiologie, Iași, România, 10-12 noiembrie 2011
4. International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, Georgia, USA, March 11-14, 2012
5. Conferința a VII-a a medicilor-infecționiști din Republica Moldova, Chișinău, 2012
6. 3rd International Influenza Meeting, Muenster, Germany, September 2<sup>nd</sup> – 4<sup>th</sup>, 2012
7. Науково-практична конференція «СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПРОБЛЕМИ ІНФЕКЦІЙНОЇ ЗАХВОРЮВАНОСТІ В УКРАЇНІ», Київ, Україна, 10 жовтня 2012
8. European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), Edinburgh, UK, 24-26 October 2012
9. The second isirv-Antiviral Group Conference in conjunction with NIHE. Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, Hanoi, Viet Nam, 29th – 31st October 2012
10. 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel, Germany, 6-9 March 2013
11. Options for the Control of Influenza, Cape Town, South Africa, 5-10 September 2013
12. The XIX-th Session of the Balkan Medical Days and the Second Congress of Emergency Medicine of the Republic of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova, 22-24 September 2013
13. Научно-Практическая Конференция с Международным Участием, Посвященная 90-летию Института НИИ Эпидемиологии, Вирусологии и Медицинской Паразитологии им. А.Б. Алексаняна, Ереван, 2013
14. Congresul specialiștilor din domeniul Sănătății Publice și Management Sanitar din Republica Moldova, Chișinău 25-26 octombrie 2013
15. A XII-a Ediție a Salonului Internațional al Cercetării, Inovării și Inventicii „PRO INVENT 2014”, Cluj-Napoca, România, 19-21 martie 2014
16. Third ISIRV-AVG Conference Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management 4th- 6th June 2014, Tokyo, Japan
17. The XVIII-th International Exhibition of Research, Innovation and Technological Transfer „INVENTICA 2014”, Iasi, Romania, 2-4 July 2014
18. 4th International Influenza Meeting, Muenster, Germany,

September 21-23, 2014

19. Conferința cu participare internațională Centrul de Sănătate Publică din municipiul Chișinău – 70 de ani la Straja Sănătății, Chișinău, Republica Moldova, 22 octombrie 2014

20. A VII-a Conferință Națională de Microbiologie și Epidemiologie, București, România, 12-14 Noiembrie 2014.

**Lucrări științifice publicate**

Au fost publicate 32 lucrări științifice (din ele 4 fără coautori). La tema tezei rezultatele cercetărilor sunt reflectate în 27 de publicații (din ele 2 fără coautori), 2 articole în reviste internaționale (cotate ISI IF = 4.659 și SCOPUS), 6 articole în reviste științifice recenzate, 1 teză a comunicării la nivel național, 17 teze ale comunicărilor internaționale, 1 brevet de invenție MD 782 Z publicat în „Buletinul Oficial de Proprietate Industrială” (BOPI) nr. 6, 30 iunie 2014.

**Participări în proiecte științifice naționale și internaționale**

1. 2009-2010 - Proiectul instituțional 09.817.09.009A „Studierea și evaluarea particularităților epidemiologice și eficacitatea măsurilor de combatere a gripei și infecțiilor respiratorii virale acute”.

2. 2010-2013 – Proiectul internațional CDC-RFA-IP09-902 „Enhancing Pandemic Preparedness and Response Capacity in the Republic of Moldova”.

3. 2011-2014 – Proiectul instituțional 09.817.09.29A „ Evidențierea și evaluarea particularităților epidemiologice ale gripei sezoniere, pandemice și IRVA cu perfectarea sistemului de supraveghere ”.

4. 2014 – curent Continuarea proiectului internațional CDC-RFA-IP09-902 „Enhancing Pandemic Preparedness and Response Capacity in the Republic of Moldova”.

5. 2015 – curent - Proiectul instituțional 14.04.050A „Studierea particularităților clinico-epidemiologice ale infecțiilor respiratorii virale acute cu optimizarea măsurilor de control și răspuns”.

**Premii și mențiuni**

1. Diplomă de excelență și Medalia de Aur cu mențiune specială, Salonul Internațional de invenție „PRO INVENT”, Ediția a XIII-a, Cluj-Napoca, 2015

2. Cupa Marele Premiu al Institutului Național de Invenție, Iași, Salonul Internațional „PRO INVENT 2014”, Cluj-Napoca, 2014

3. Medalia de Aur „The Hamangia Thinker”, Salonul internațional „INVENTICA 2014”, Iași, 2014

4. Premiul pentru „Cea mai reușită activitate în domeniul sănătății publice”, Gala Premiilor în Sănătate, Ediția a III-a, Chișinău, 2014

**Date de contact**

**Adresa** MD 2009, str. Cosmescu 3, Chișinău, Republica Moldova, Centrul Controlul Bolilor Virale al CNSP, Laboratorul Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale.

**Telefon** (+373 022) 72-81-16, 069960916

**E-mail** [influenza@cnspl.md](mailto:influenza@cnspl.md), [creatacrea@yahoo.com](mailto:creatacrea@yahoo.com)