

MONITORIZAREA VIRUSOLOGICĂ  
ȘI CARACTERISTICA ANTIGENICĂ  
ȘI FILOGENETICĂ A TULPINILOR GRIPALE  
IZOLATE ÎN PERIOADA POSTPANDEMICĂ

Veronica DUBALARI, Petru SCOFERȚA,  
Radu COJOCARU, Victoria GHIDIRIM, Igor SPĂNU,  
Mariana APOSTOL, Marina VLAS, Constantin SPĂNU  
Centrul Național de Sănătate Publică

### Summary

#### ***Virological monitoring of the antigenic and phylogenetic characteristics of influenza strains isolated in the postpandemic period***

*Continuous monitoring of influenza morbidity by clinical-epidemiological and virological surveillance elements allows to control the epidemiological situation in the country. Thus, monitoring of influenza viral strains in the postpandemic period (epidemic season 2010-2011) has shown the circulation of influenza type A viruses with H1N1, H3N2 subtypes and type B viruses. Also, were carried out antigenic, sequence and phylogenetic analyses of part of the positive samples.*

**Key words:** *influenza, viral strains, antigenic, sequence and phylogenetic analyses.*

### Резюме

#### ***Вирусологический мониторинг, антигенная и филогенетическая характеристика штаммов гриппа, выделенных в постпандемический период***

*Непрерывный мониторинг заболеваемости гриппом элементами клинико-эпидемиологического и вирусологического надзора позволяет контролировать эпидемиологическую ситуацию в стране. Таким образом, мониторинг вирусных штаммов гриппа в постпандемический период (эпидемический сезон 2010-2011 гг.) выявил циркуляцию вирусов гриппа типа А с подтипами H1N1, H3N2 и вирусов типа В. Кроме того, были проведены антигенный анализ, секвенирование и филогенетический анализ части положительных проб.*

**Ключевые слова:** *грипп, вирусные штаммы, антигенный анализ, секвенирование и филогенетический анализы.*

Monitorizarea permanentă a morbidității prin gripă prin elemente de supraveghere clinico-epidemiologică și virusologică asigură controlul situației epidemiologice din țară. Astfel, monitorizarea virusologică a tulpinilor gripale în perioada postpandemică (sezonul epidemic 2010-2011) a pus în evidență circulația virusurilor gripale de tip A cu subtipurile H1N1 și H3N2 și de tip B.

### Materiale și metode

Lavajele nazofaringiene au fost colectate de la pacienții cu forme clinice severe, copii cu vârsta până la 5 ani, gravide, primele cazuri suspecte din localitățile în care nu au fost înregistrate cazuri de gripă, cazurile inițiale la copiii instituționalizați și la lucrătorii medicali, conform Ordinului Ministerului Sănătății nr. 399 din 16.11.2009, fiind transportate cu asigurarea lanțului de frig (4-8°C) către laboratorul *Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale* al CNSP.

Materialul recoltat a fost supus investigațiilor de laborator prin tehnici de biologie moleculară (*Real Time RT-PCR*), utilizând echipamentul *Real Time System CFX 96* (Bio-Rad) cu truse de amplificare *Real Time RT-PCR*, elaborate de CDC (Atlanta, SUA) și recomandate de OMS pentru laboratoarele de referință din lume [1]. De asemenea, pentru decelarea tulpinilor de virus gripal din materialul patogen s-a folosit metoda de izolare a virusurilor gripale pe culturi celulare MDCK [2].

Analiza antigenică a virusurilor gripale izolate s-a efectuat în reacția de hemaglutino-inhibare (HAI) în Institutul de Cercetări în Medicină din Londra, Laboratorul de Referință al OMS, conform metodei descrise [2]. În baza datelor investigațiilor de laborator s-a determinat evoluția sezonului epidemic 2010-2011, fiind evidențiate virusurile gripale circulante.

### Rezultate

Diagnosticul de laborator este o verigă importantă în supravegherea infecției gripale în sezonul rece al anului. Diagnosticul rapid și precis al infecției gripale facilitează gestionarea medicală prin administrarea tratamentului antiviral la timp, implementarea strategiilor corespunzătoare de control și profilaxie a infecției gripale.

Astfel, prin tehnici de biologie moleculară RT-PCR, în perioada ianuarie-martie 2011 au fost investigate 1045 de probe de la persoanele suspecte de gripă. În 611 probe (58,4%) examinate au fost depistate virusurile gripale, inclusiv virusul gripal B – în 163 cazuri, virusul gripal A(H1N1) 2009 – în 360 și A(H3N2) – în 88 de cazuri, iar în 4 cazuri s-au depistat virusurile gripale B+A(H1N1) 2009.

Așadar, gripa în anul 2011 a fost cauzată de trei tipuri de virusuri gripale, cu predominarea virusului A(H1N1) 2009, cu o pondere de 34,4%, virusului gripal de tip B – 15,6%, virusului gripal de tip A cu subtipul H3N2 îi revin 8%, iar cea mai mică pondere a fost stabilită în cazul coinfecției cu virusurile gripale de tip A(H1N1) 2009 și de tip

B – doar 0,4% (tabelul 1). O situație similară în perioada postpandemică s-a atestat în majoritatea țărilor din Europa.

**Tabelul 1**

Rezultatele identificării subtipurilor de virusuri gripale A și B în probe biologice recoltate de la pacienții cu gripă și alte infecții respiratorii virale acute în anul 2011 în R. Moldova

Nr. probe	Total probe pozitive		Ponderea subtipurilor de virus gripal identificate prin RT-PCR în timp real							
			A(H1N1)v		A(H3N2)		B		A(H1N1)v + B	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
1045	611	58,4	360	34,4	88	8	163	15,6	4	0,4

Din cele 611 probe detectate ca pozitive la diferite tipuri/subtipuri ale virusurilor gripale prin metoda molecular-biologică RT-PCR, au fost investigate 127 de probe pe culturi celulare MDCK. Din ele au fost izolate 5 tulpini de virusuri gripale, care în testul de hemaglutino-inhibare au fost identificate ca virusuri gripale A(H1N1) (1 tulpină) și B (4 tulpini).

În adresa Laboratorului de Referință pentru Gripă al OMS din Londra au fost expediate 93 de specimene clinice pozitive la prezența ARN virusurilor gripale determinate în Laboratorul *Epidemiologia infecțiilor respiratorii virale* din cadrul CNSP. Au fost izolate 9 tulpini de virus gripal A(H1N1)2009, 15 tulpini de virus gripal A(H3N2) și 2 tulpini de virus gripal tip B.

**Virusul gripal pandemic A(H1N1).** În tabelul 2 se poate observa că toate virusurile au reacționat bine cu un panel de seruri, deși tulpina virală A/Moldova/448/2011 a prezentat o activitate ușor redusă în testul HAI efectuat.

Rezultatele obținute în cadrul Laboratorului de Referință din Londra în baza tulpinilor și serurilor de referință demonstrează că izolatele din Republica Moldova reacționează totalmente cu serurile-standard (A/Cal 7/09 F05/10, A/Eng 195/09 F06/10, A/Auck 3/09 F17/09, 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), ceea ce reprezintă o caracteristică fenotipică comparabilă cu tulpinile din alte țări.

Face excepție diferența nesemnificativă în titrele evidențiate caracteristice pentru unele devieri antigenice ale tulpinilor izolate, care nu se încadrează în noțiunea-standard de subtip „nou” al virusului gripal cercetat.

**Tabelul 2**

Analiza antigenică a virusurilor gripale pandemice A(H1N1)

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titru de inhibare a hemaglutinării						
			Seruri de referință						
			A/Cal 7/09 F05/10	A/Eng 195/09 F06/10	A/Auck 3/09 F17/09	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

Notă: 1 <= 40

Secvențierea genelor HA și NA s-a efectuat pentru virusurile gripale pandemice A(H1N1) izolate și a atestat că două virusuri s-au atribuit diferit clusterelor în analiza filogenetică a fiecărei gene. Pentru gena HA un virus a fost în subgrupe genetice definite de substituția aminoacizilor S185T și D97N, pe când alt virus – într-un subgrup definit de aminoacizii A134T și S183P. Recent au fost recunoscute cinci clase genetice emergente (nou formate) ale genei HA de virusuri H1N1: 1) grupul Emisferei Sudice (SH) (modificările-cheie N125D, altele cu V250A etc.); 2) grupul Hong Kong (modificările-cheie S128P, V199A, I295V etc. – K163T și P271S), 3) un grup definit de aminoacizii A134T, S183P, observat în cel puțin în 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 substituție D97N [3]. Virusurile în fiecare grup genetic sunt considerate similare antigenic.

Inițial modificările genotipice evidențiate pentru virusurile gripale izolate în Republica Moldova au fost apreciate ca posibil „spontane”, dar pentru clarificare definitivă se cer studii suplimentare.

**Virusul gripal A(H3N2).** În tabelul 3 se poate observa că toate virusurile prezintă un model foarte asemănător de reactivitate. Este important faptul că ele au reacționat bine cu serurile specifice față de tulpinile virale A/Wisconsin/15/2009, A/Alabama/5/2010 și A/Perth/10/2010 și oarecum au fost reduse cu ser specific față de virusul de vaccin A/Perth/16/2009, dar aceste variații sunt neesențiale, necaracteristice pentru un „nou” subtip de virus gripal A(H3N2). În testul de hemaglutino-inhibare au fost identificate 15 izolate de virus gripal A(H3N2).

**Tabelul 3**

*Analiza antigenică a virusurilor gripale A(H3N2)\**

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a hemaglutinării <sup>1</sup>							
			Seruri de referință							
			A/Wis 67/05 F18/08	A/ Bris10/07 F29/09	A/ Perth16/09 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/C' church 16/2010 F30/10
<b>Virusuri de referință</b>										
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
<b>Virusuri testate</b>										
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

Notă: 1 <=<40.

\*Au fost efectuate 18 testări HI a 15 virusuri, deoarece din ele 3 virusuri (A/Moldova/176/2011, A/Moldova/214/2011, A/Moldova/225/2011) au fost analizate la diferit număr de pasaje.

Pentru virusurile gripale A(H3N2) analiza secvențelor nucleotidice a genelor HA și NA a demonstrat apartenența genei HA la clasa genetică A/Victoria/208/2009 sau virusurile au fost atribuite în subgrupa genetică componentă a acestei clase. Această subgrupă este definită de aminoacizii cu substituțiile D53N, Y94H, I230V și E280A. Tulpinile de referință A/Alabama/5/2010 și A/Perth/10/2010 se încadrează în această subgrupă. Rezultă că nici o subgrupă genetică menționată nu se deosebește semnificativ antigenic de virusul A/Perth/16/2009.

### Virusul gripal de tip B.

În reacția de hemaglutino-inhibare au fost identificate 2 izolate de virus gripal B. Tulpinile virale au arătat același model general de reactivitate: fiecare dintre ele a prezentat reactivitate scăzută cu serul specific față de tulpina vaccinală B/Brisbane/60/2008 cultivate pe ouă embrionate, însă au arătat o reactivitate bună cu serurile specifice față de virusurile strâns legate genetic de această tulpină vaccinală cultivată pe culturi celulare. În tabelul 4 sunt prezentate rezultatele acestui studiu. Posibil aceste devieri nesemnificative pot fi considerate o urmare a unor diferențe de reproducere a virusului gripal B în culturi celulare și ouă embrionate.

**Tabelul 4**

Analiza antigenică a virusului gripal de tip B

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titru de inhibare a hemaglutinării <sup>1</sup>						
			Seruri de referință						
			B/Bris 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/Malaysia/2506/2004	2004-12-06	E3/E3	640	640	160	80	<	<	<
B/England/393/2008	2008-08-29	E1/E6	640	160	320	320	40	40	40
B/Brisbane/60/2008	2008-08-04	E4/E4	640	160	160	320	40	20	40
B/Paris/1762/2008	2009-02-09	C2/MDCK4	640	10	<	20	80	160	80
B/Hong Kong/514/2009	2009-10-11	MDCK1/ MDCK1	640	<	<	20	80	160	80
B/Odessa/3886/2010	2010-03-19	C2/MDCK3	640	10	<	40	80	320	160
<b>Virusuri testate</b>									
B/Moldova/141/2011	2011-01-25	MDCK2	640	20	<	40	160	320	160
B/Moldova/284/2011	2011-02-02	MDCK3	640	10	<	40	160	160	160

Notă: <sup>1</sup><=<10; <sup>2</sup> ser hiperimun de oaie.

Analiza de secvențiere a fost efectuată pentru genele HA și NA doar pentru unul dintre izolate – B/Moldova/284/2011. Virusul analizat se referă la clasa genetică B/Brisbane/60/2008 pentru ambele gene. Comparativ cu tulpina vaccinală B/Brisbane/60/2008, tulpina virală B/Moldova/284/2011 se atribuie subgrupeii genetice definite de substituțiile aminoacizilor I146V și L58P.

### Analiza sensibilității la antivirale

Au fost analizate virusurile cu un nivel suficient de activitate a sialidazei, întru determinarea rezistenței la preparatele antivirale de ultimă generație – oseltamivir și zanamivir – în testul de inhibare a sialidazei. Virusurile cercetate (2 tulpini de virus gripal B, 9 tulpini de virus gripal A(H3N2) și 9 tulpini de virusul gripal pandemic H1N1) au fost toate sensibile la ambii inhibitori.

### Concluzii

Așadar, a fost stabilit etiologic că gripa în anul 2011 a fost cauzată de trei virusuri gripale – A(H1N1)

2009, A(H3N2) și B – cu predominarea virusului gripal A(H1N1) 2009, o situație similară fiind atestată și în Europa. Analiza arborelui filogenetic al tulpinilor virale izolate în Republica Moldova a prezentat substituiri de aminoacizi în HA și NA, fenomen stabilit și la alte virusuri gripale izolate în țările europene. Toate tulpinile de virus gripal investigate, caracterizate ca posibil spontane, au fost sensibile la remediile antivirale oseltamivir și zanamivir. În ansamblu, caracteristica tulpinilor de virus gripal izolate în anul 2011 demonstrează o coincidență comparabilă (feno- și genotipică) cu tulpinile de virusuri incluse în vaccinul gripal recomandat de OMS pentru sezonul rece 2011-2012.

### Bibliografie

1. CDC Real-Time RT-PCR Protocol for detection and characterization of swine influenza (version 2009).
2. Influenza Laboratory Course Atlanta, Georgia, USA, May 5-9, 2003, 939 p.
3. Influenza virus characterization, Summary Europe, July 2011 (technical document).