

- zidine during coronary artery graft surgery. *J. Cardiovasc. Surg.* 1992;33(4):486-491.
22. Rebrova T, Lasukova T, Afanasev S, et al. Cardioprotective effect of trimetazidine during thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. *Exper. Biol. Med.* 2002;134(6):647-649.
  23. Dong X, Hu D, Jia S, et al. Clinical study of trimetazidine for myocardial protection in acute myocardial infarction. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2007;46(8):633-636.
  24. Akkal Z, Olson R. Effect of 48-h intravenous trimetazidine on short- and long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction, with and without thrombolytic therapy. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Eur. Heart J.* 2000;21(18):1537-1546.
  25. Steg P, Grollier G, Gallay P, et al. A randomized double-blind trial of intravenous trimetazidine as adjunctive therapy to primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiology* 2001;77(2-3):263-273.
  26. Belardinelli K. Efficacy of metabolic approach in ischemic heart diseases. *Heart and Metabolism.* 2007;34:24-27.
  27. Di Napoli P. Anti-ischemic cardioprotection with trimetazidine. *Heart Metab.* 2008;41:25-29.
  28. Kokov A, Tarasov I, Barbarash L. Trimetazidine effects on postinfarction remodeling of the left ventricle. *Ter. Arkh.* 2005;77(8):10-14.
  29. Ruixing Y, Wenwu L. Trimetazidine inhibits cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia-reperfusion. *J. Lab. Clin. Med.* 2007;149(3):152-160.
  30. Liu F, Yin L, Zhang L, et al. Trimetazidine improves right ventricular function by increasing miR-21 expression. *Intern. J. Mol. Med.* 2012;30(4):849-855.
  31. Zhou X, Li C, Xu W, et al. Trimetazidine protects against smoking-induced left ventricular remodeling via attenuating oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Plos One.* 2012;7(7): doi:10.1371/journal.pone.0040424.
  32. Martins G, Siqueira F, Santos J, et al. Trimetazidine and inflammatory response in coronary artery bypass grafting. *Arq. Bras. Cardiol.* 2012;99(2):688-696.
  33. Lopatin Y, Dronova E. Beneficial effects of long-term trimetazidine modified release therapy in patients having undergone coronary artery bypass grafting and percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J.* 2010-2011;31-32: abstr. 58, 569.
  34. Gao D, Ning N, Niu X, et al. Trimetazidine: a meta-analysis of randomised controlled trials in heart failure. *Heart.* 2011;97(4):278-286.
  35. Zhang L, Lu Y, Jiang H, et al. Additional use of trimetazidine in patients with chronic heart failure: a meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiology* 2012;59(10):913-922.
  36. Vitale C, Wajngaten M, Sposato B, et al. Trimetazidine improves left ventricular function and quality of life in elderly patients with coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 2004;25:1814-1821.
  37. Gunes Y, Guntekin U, Tuncer M. Improved left and right ventricular functions with trimetazidine in patients with heart failure: a tissue Doppler study. *Heart Vessels.* 2009;24:277-282.
  38. Fragasso G, Perseghin G, De Cobelli F, et al. Effects of metabolic modulation by trimetazidine on left ventricular function and phosphocreatine/adenosine triphosphate ratio in patients with heart failure. *Eur. Heart J.* 2006;27:942-948.
  39. Hu B, Li W, Xu T, et al. Evaluation of trimetazidine in angina pectoris by echocardiography and radionuclide angiography: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Clin. Cardiol.* 2011;34(6):395-400.
  40. Palaniswamy C, Mellana W, Selvaraji D, et al. Metabolic modulation: a new therapeutic target in treatment of heart failure. *Am. J. Ther.* 2011;18(6):e197-201.
  41. Walters AM, Porter GA Jr, Brookes PS. Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy. *Circ. Res.* 2012;111(9):1222-1236.

## Antigenic and genetic characteristic of influenza viruses identified in pre-pandemic, pandemic and post-pandemic periods in the Republic of Moldova

V. Eder

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

Corresponding author: creatacrea@yahoo.com. Manuscript received July 17, 2013; accepted February 05, 2014

### Abstract

**Background:** The influenza infection continues to be the main cause of serious infections of the upper respiratory tract, having a negative impact on the public health, health system as well as on the national economy, provoking considerable efforts of control and responsibility.

**Material and methods:** The samples of biological material (naso-pharyngeal exudates, tracheal-bronchial lavage and cadaveric material in the cases of death) have been collected from the patients with a clinical diagnosis of alleged flu, acute respiratory infection and heavy acute viral respiratory infection (pneumonia, bronchopneumonia and acute bronchitis), through the influenza surveillance system and the routine were used. The material collected during a pandemic and post-pandemic periods has been subjected to the laboratory research using molecular biology techniques. We have used the method of isolation of influenza viruses in the cell cultures MDCK and MDCK-SIAT and, accordingly, there have been a hemagglutinating reaction of stems isolated from influenza viruses with the corresponding serums and antigens in accordance with the requirements and recommendations of WHO.

**Results:** The results of antigenic and phylogenetic analysis of influenza viruses circulating in the Republic of Moldova in pre-pandemic (2008-2009), pandemic (2009-2010) and post-pandemic (2010-2011) periods are presented. The findings suggest that the displacement of the circulating seasonal influenza virus A(H1N1) by the A(H1N1)pdm virus occurred in the post-pandemic period.

**Conclusions:** The substitution of D222G in the hemagglutinin gene of influenza virus A(H1N1)pdm, which has been identified by the phylogenetic analysis in the patients with severe acute respiratory infections and/or in dead bodies of the people, who died in the pandemic period, may be the first "virulence marker" of the A(H1N1)pdm virus.

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

## Caracteristica antigenică și genotipică a virusurilor gripale identificate în perioadele prepandemică și postpandemică în Republica Moldova

### Introducere

Capacitatea unică a virusurilor gripale la variabilitate pe calea mutațiilor, recombinărilor și reasortărilor genelor, însoțită de modificarea proprietăților biologice ale agentului patogen reprezintă cauza răspândirii necontrolate a infecției gripale cu o viteză extremă de transmisie globală. Evoluția continuă a virusurilor gripale conduce la reapariția anuală a epidemiilor de gripă și, periodic, a pandemiilor de gripă care se înregistrează la un interval de 10-40 de ani [1, 2].

Astfel, infecția gripală, cunoscută încă de pe timpurile lui Hipocrate, și în prezent continuă să fie cauza majoră a infecțiilor tractului respirator, având un impact negativ asupra sănătății populației, sistemului de sănătate, cât și asupra economiei naționale, impunând eforturi considerabile de control și răspuns.

**Actualitatea problemei.** Epidemiile de gripă se declanșează în fiecare an și se înregistrează pretutindeni pe glob ca urmare a variabilității continue ale virusurilor gripale, atât de tip A, cât și de tip B. Acumularea mutațiilor cauzează *drift*-ul antigenic și apariția variantelor noi de virus, fapt care asigură eterogenitatea populației virale și stă la baza formării diverselor linii genetice. Apariția în 2009 a virusului gripal de tip nou A(H1N1)pdm confirmă potențialul variabilității evolutive a virusurilor gripale [2].

Variația antigenică și circulația virusurilor gripale între specii constituie cauza izbucnirilor epidemice, îmbolnăvirile fiind favorizate de răspunsul imun neadecvat, chiar în acele segmente de populație care au fost expuse anterior infecției gripale. Variația antigenică este particularitatea fundamentală a virusurilor gripale A și B, care are loc la nivelul antigenelor de suprafață, hemaglutinina (HA) și neuraminidaza (NA), reprezentând astfel un mecanism evolutiv de adaptare a virusurilor pentru asigurarea supraviețuirii lor ca specie [1, 3].

Monitorizarea variației antigenice (caracteristica antigenică și genetică) prezintă o importanță deosebită pentru formularea vaccinală, dar și pentru o înțelegere mai bună a patternului de transmisie și a evoluției virusurilor gripale.

**Scopul studiului.** Evaluarea caracteristicilor antigenice și genotipice ale tulpinilor de virusuri gripale izolate și identificate în perioadele prepandemică (2008-2009), pandemică (2009-2010) și postpandemică (2010-2011), în Republica Moldova.

### Material și metode

Probele cu material biologic (exsudate nazofaringiene, lavaje traheo-bronhice și material cadaveric în cazuri de deces) au fost colectate de la pacienții cu diagnosticul clinic prezumtiv de gripă, infecție respiratorie virală acută și infecție respiratorie acută severă (pneumonie, bronhopneumonie și bronșiolite acute), atât în cadrul sistemului santinelă de supraveghere la gripă, cât și a celui de rutină, conform Ordinului MS nr.824 din 31.10.2011 și transportate cu asigurarea lanțului frig (4-8°C) spre laboratorul Epidemiologia in-

fecțiilor respiratorii virale al Centrului Național de Sănătate Publică.

În perioada prepandemică, depistarea antigenilor virusurilor gripale s-a efectuat prin metoda imunofluorescență (MIF) cu utilizarea imunoglobulinelor fluorescente specifice, produse de Institutul de Cercetări Științifice în domeniul Gripei al Academiei de Științe Medicale din Federația Rusă (Sankt-Petersburg). Montarea reacțiilor și interpretarea rezultatelor s-au efectuat în conformitate cu instrucțiunile producătorului [4].

Materialul recoltat în perioadele pandemică și postpandemică a fost supus investigațiilor de laborator prin tehnici de biologie moleculară. Extragerea ARN virusurilor gripale s-a efectuat cu kiturile *Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit* (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea) și *Пу́бо-копó* (Amplisens, Federația Rusă). *Primer*-ii pentru identificarea tipurilor și subtipurilor virusurilor gripale (*Influenza A, Influenza A/pdm, Influenza A/H1pdm, Influenza A/H1, Influenza A/H3, Influenza A/H5a, Influenza A/H5b, Influenza B și RNaseP*) și enzima *Ambion Ag Path One Step* au fost elaborate și oferite de CDC (Center for Diseases Control, Atlanta, SUA) și recomandate de OMS (Organizația Mondială a Sănătății) pentru laboratoarele de referință din lume [5]. Amplificarea s-a efectuat cu utilizarea echipamentului Rotorgene 6000 Corbett (QIAGEN, Germania) și CFX 96 Real Time System (Bio-Rad, SUA).

Pentru decelarea tulpinilor de virus gripal din materialul patogen, s-a folosit metoda de izolare a virusurilor gripale în culturile celulare MDCK și MDCK-SIAT și, respectiv, s-a efectuat reacția de hemaglutino-inhibare (RHAI) a tulpinilor izolate de virusuri gripale cu seruri și antigene de referință în conformitate cu cerințele și recomandările OMS [6].

Analiza antigenică (RHAI), analiza genotipică (tehnici moleculare de secvențiere) și determinarea sensibilității la antivirale (reacția de inhibare a neuraminidazei) ale virusurilor gripale izolate s-au efectuat în Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare în Microbiologie și Imunologie "Cantacuzino", București și în Institutul de Cercetări în Medicină din Londra, Laboratorul de Referință al OMS, conform metodei descrise [6].

### Rezultate și discuții

Monitorizarea permanentă a virusurilor gripale circulante prin efectuarea cercetărilor, care includ detectarea ARN viral, izolarea și identificarea tulpinilor de virus gripal, determinarea proprietăților antigenice și molecular-genetice este necesară pentru efectuarea analizei variabilității evolutive a virusurilor gripale cu scop de a elabora mijloace eficiente de diagnostic și profilaxie a infecțiilor gripale.

Prin investigații de laborator s-a stabilit că gripa, în perioada prepandemică (2008-2009), a fost etiologic cauzată de virusul gripal A(H3N2). Din totalul de 377 de probe investigate prin metoda imunofluorescență directă, doar în 7 probe

(1,9%) a fost detectat antigenul virusului gripal A(H3N2), iar antigenii virusurilor gripale A(H1N1) și B nu au fost detectați (tab. 1).

Totodată, în perioada nominalizată, în culturi celulare MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) au fost izolate 9 tulpini de virusuri gripale, din care a fost subtipată 1 tulpină – A(H3N2). Aceste 9 tulpini de virusuri gripale, împreună cu 3 probe pozitive la antigenii virusurilor gripale au fost expediate în adresa Institutului de Cercetări în Medicină din Londra pentru reconfirmarea, izolarea, identificarea și caracterizarea tulpinilor de virusuri gripale unde, în culturile celulare linia MDCK au fost recuperate 3 tulpini de virus gripal A/H3, însă cu un titru slab la antiserurile de referință. Acest fapt a fost similar tulpinilor virale de referință cu replicare pe MDCK cum ar fi: A/Trieste/25c/07 și A/Johannesburg/15/08 (tab. 2). Așa rezultate au fost similare pentru alte numeroase tulpini de virus gripal A/H3 din perioada dată [7].

Tulpinile de virus gripal tip B, izolate din 4 probe aparți-

nând la linia B/Victoria au fost antigenic similare cu tulpina virală B/Brisbane/60/08 și, practic, similare cu majoritatea tulpinilor de virusuri gripale de tip B, izolate în perioada pre-pandemică în diferite părți ale lumii (tab. 3).

În baza rezultatelor obținute, atât prin detecția antigenilor 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) și B, cu predominarea virusului A(H3N2), tulpinile virale fiind similare cu tulpinile circulante în lume [7].

Detectarea în sezoanele epidemice a variantelor, precum și a subtipurilor 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

Tabelul 1

## Rezultatele detecției antigenilor de virusuri gripale în probe biologice în perioada pre-pandemică (2008-2009)

Perioada	Probe examinate	Total probe pozitive		Ponderea antigenilor de virusuri gripale detectați prin metoda imunofluorescență directă					
				A(H1N1)		A(H3N2)		B	
		abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
08-2009	377	7	1,9	0	0	7	1,9	0	0

Tabelul 2

## Analiza antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) identificate în perioada pre-pandemică (2008-2009)

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titru de inhibare a hemaglutinării <sup>1</sup>								
			Seruri de referință (seruri de dihone)								
			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
Virusuri de referință											
A/Wisconsin/67/2005	8/31/2005	SpfCk3E3\3	2560	2560	640	1280	5120	1280	1280	160	2560
A/Trieste/25c/2007	Jan-07	MDCKx\2	<	80	160	160	160	80	80	80	80
A/Wisconsin/3/2007	1/21/2007	Ex\2	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	spfck1, E3\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	MDCKx\2	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
Virusuri testate											
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

Tabelul 3

## Analiza antigenică a virusurilor gripale tip B (linia Victoria) identificate în perioada pre-pandemică (2008-2009)

Virusuri	Data	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 2506/04 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
Virusuri de referință											
B/Shandong/7/97		Ex	640	160	80	80	80	80	40	20	80
B/Brisbane/32/2002	7/2/2002	E2\6	640	80	160	80	160	80	40	20	40
B/HK/45/2005	2/7/2005	MDCK2\4	640	160	80	160	320	80	20	20	40
B/Malaysia/2506/2004	12/6/2004	E3\3	320	160	160	80	160	80	40	20	80
B/Victoria/304/2006	6/6/2006	E2\2	320	80	80	80	160	160	40	40	160
B/England/393/2008	29/08/2008	E1\2	160	40	80	<	80	80	160	320	320
B/Brisbane/33/2008	13/07/2008	E3\1	160	80	80	<	80	160	160	320	320
B/Brisbane/60/2008	04/08/2008	E4\1	160	80	80	<	160	160	160	320	320
Virusuri testate											
B/Moldova/168/2009	3/4/2009	MDCK2\1	320	<	<	<	<	<	<	<	320
B/Moldova/173/2009	3/4/2009	MDCK2\1	320	<	<	<	10	<	<	<	320
B/Moldova/174/2009	3/4/2009	MDCK2\1	320	<	<	<	10	<	<	<	320
B/Moldova/175/2009	3/5/2009	MDCK2\1	320	<	<	<	<	<	<	<	320

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

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, primind denumirea de "quadruplu reasortant". 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.

Astfel, în perioada pandemică (2009-2010), prin tehnici de biologie moleculară (RT-PCR) în timp real – 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 6926 de probe, din care în 2660 (38,41%) a fost detectat ARN virusului gripal A(H1N1)pdm și doar în 1 probă s-a detectat ARN virusului gripal tip B (0,01%) (tab. 4).

În conformitate cu convenția de colaborare cu Centrul Regional de Referință pentru Gripă al OMS din Londra – parte componentă a Sistemului European de Supraveghere epidemiologică și virusologică a gripei un număr statistic

reprezentativ de probe pozitive la prezența ARN virusurilor gripale se expediază pentru reconfirmare. În perioada pandemică (2009-2010), în adresa Institutului de Cercetări în Medicină din Londra, Laboratorul de Referință al OMS, au fost expediate 221 de probe pozitive reprezentative atât pentru reconfirmare, izolarea tulpinilor de virusuri gripale, caracterizarea antigenică, studierea lor privind originea tulpinilor de virusuri gripale identificate în Republica Moldova prin tehnici de secvențiere, cât și pentru determinarea sensibilității lor la preparatele antivirale. Din ele a fost posibil de a izola și identifica 33 de tulpini de virus gripal A(H1N1) pdm.

Analiza antigenică a demonstrat că 31 de tulpini de virusuri gripale au prezentat o reactivitate înaltă cu panelurile de seruri standard utilizate (A/NJ<sup>2</sup> 8/76 R15/79; A/NJ 8/76 F34/82; A/Cal 4/09 C4/F14/09; A/Cal7/09 C4/31/09; A/Eng 195/09 NIBSC F18/09; A/Auck 3/09 C4/17/09 și A/Cal 4/09 C4/F14/09; A/Cal 7/09 C4/31/09; A/Eng 195/09 NIBSC F17/09; A/Auck 3/09 C4/17/09; A/Bayern 69/09 C4/33/09; A/Lviv N6/2009 C4/34/09), pe când 2 tulpini de virus gripal

Tabelul 4

## Rezultatele detecției ARN virusurilor gripale în perioada pandemică (2009-2010)

Perioada	Probe examinate	Total probe pozitive		Ponderea subtipurilor de virus gripal identificate prin RT-PCR în timp real					
				A(H1N1)pdm		A(H3N2)		B	
		abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
2009-2010	6926	2661	38,42	660	38,41	0	0	1	0,01

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 (tab. 5, 6). Reactivitatea alterată a acestor două virusuri pare a fi asociată cu schimbările la reziduurile 154-156 de 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.

Toate tulpinile de virusuri gripale izolate (identificate în Republica Moldova) au fost studiate în ceea ce privește rezistența la inhibitorii neuraminidazei (sialidazei) – oseltamivir și zanamivir. Analiza fenotipică a demonstrat că toate viru-

surile identificate în Republica Moldova au fost sensibile la ambele remedii antivirale (oseltamivir, zanamivir).

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 din poziția D222E. Această poziție s-a dovedit a fi similară cu poziția glicinei în unele virusuri identificate în cazuri soldate cu deces, însă nu s-a

Tabelul 5

**Analiza antigenică a tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm identificate la începutul pandemiei în anul 2009 în Republica Moldova**

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titru de inhibare a hemaglutinării <sup>1</sup>					
			Seruri de referință (seruri de dihone)					
			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
Virusuri de referință								
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
Virusuri testate								
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

Tabelul 6

**Analiza antigenică a tulpinilor de virusuri gripale A(H1N1)pdm identificate pe parcursul și la finele pandemiei (2009-2010)**

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a hemaglutinării <sup>1</sup>					
			Seruri de referință (seruri de dihore)					
			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
Virusuri de referință								
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
Virusuri testate								
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. &lt; = 40

găsit niciun argument întru susținerea ideii, că aceasta este asociată cu virulența sporită a virusului A(H1N1)pdm, deși este foarte aproape de substituția D222G. Substituția dată pare a avea un efect neînsemnat asupra antigenicității, fapt care poate fi observat în interpretarea rezultatelor analizei antigenice.

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, fapt care poate indica la semnificația epidemiologică a acestor virusuri. Similar lotului anterior, au fost observate virusuri ce prezentau schimbări la nivelul aminoacidului 222 în HA. Două virusuri au prezentat o substituție clară la nivelul D222G (virusurile 3163/2009 și 3245/2009), iar altele două conțineau mixul sau D sau G (virusurile 351/2010 și 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 glicină) 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.

Semnificația substituției D222G a fost și este discutată de către cercetători [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Astfel, substituția D222G în gena HA poate fi primul "marker 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 receptorice spre acidul  $\alpha$ 2-3 sialic (similar celui aviar) expresate de celulele epiteliale ale tractului respirator inferior [11, 12]. 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 [12]. Totodată, este necesar de

menționat, că substituția D222G nu afectează proprietățile antigenice ale virusului A(H1N1)pdm, fapt care a fost stabilit prin reacții de hemaglutinoinhibare (RHAI) cu seruri de referință atât de dihone, cât și de iepure [8, 9, 10, 11]. 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) – virus recomandat de OMS pentru formula vaccinului gripal. 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 [11, 12].

Comparația filogenetică a genelor de NA a virusurilor gripale analizate nu a prezentat substituția la nivelul H275Y, asociată cu rezistența virusurilor la preparatul antiviral oseltamivir, fapt ce poate fi considerat benefic în aspectul sensibilității tulpinilor de virusuri gripale identificate în Republica Moldova ca fiind sensibile la remediul antiviral nominalizat. Totodată, 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 urma cu pierderea site-ului de glicozilare în tetramerul de NA, aparte de locusul enzimatic activ. Însă, semnificația acesteia nu este încă cunoscută.

În perioada postpandemică (2010-2011), prin metoda RT-PCR în timp real au fost investigate 1095 de probe, din care în 611 probe (56,4%) a fost detectat ARN al virusurilor gripale: A(H1N1)pdm – în 360 de probe, A(H3N2) – în 88 de probe, virusul gripal B – în 163 de probe, iar în 4 probe s-a detectat ARN al virusurilor gripale B și A(H1N1)pdm. Așadar, gripa în perioada postpandemică a fost cauzată de trei tipuri de virusuri gripale cu predominarea virusului gripal A(H1N1)pdm cu o pondere de 33%, virusului gripal de tip B – 15%, virusului gripal de tip A cu subtipul H3N2 – 8%, 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% (tab. 7). O situație similară în perioada postpandemică s-a atestat în majoritatea țărilor din Europa.

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

În adresa Laboratorului de Referință pentru Gripă a OMS din Londra, în perioada postpandemică, au fost expediate 93 de specimene clinice pozitive la prezența ARN virusurilor gripale din care au fost izolate 9 tulpini de virus gripal A(H1N1)pdm, 15 tulpini de virus gripal A(H3N2) și 2 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/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 izolate, identificate și caracterizate din perioada nominalizată, deși tulpina virală A/Moldova/448/2011 a prezentat o activitate ușor redusă în RHAI (tab. 8).

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. Pentru gena HA un virus s-a găsit în subgrupurile genetice definite de substituția aminoacizilor S185T și D97N, pe când al doilea virus – în subgrupul 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 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 [14]. În fiecare grup genetic, virusurile sunt considerate antigenic similare.

Analiza antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) (15 tulpini) reprezintă un pattern similar de reactivitate. 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, au avut o reactivitate redusă cu serul specific față de virusul vaccinal A/Perth/16/2009, aceste variații fiind neesențiale (tab. 9). Analiza secvențelor nucleotidice a genelor HA și NA ale virusurilor gripale A(H3N2) a demonstrat similaritatea virusurilor, precum și apartenența genei HA la subgrupul cladei genetice A/Victoria/208/2009. Acest subgrup este definit de aminoacizii cu substituțiile D53N, Y94H, I230V și E280A.

Tabelul 7

## Rezultatele detecției ARN virusurilor gripale în probe biologice în perioada postpandemică (2010-2011)

Perioada	Probe examinate	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	%
2010-2011	1095	611	56,4	360	33	88	8	163	15	4	0,4

Tabelul 8

## Analiza antigenică a virusurilor gripale A(H1N1)pdm identificate în perioada postpandemică

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a hemaglutinării <sup>1</sup>						
			Seruri de referință (seruri de dihoze)						
			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
Virusuri de referință									
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
Virusuri testate									
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. &lt; = 40

Tulpinile de referință A/Alabama/5/2010 și A/Perth/10/2010 s-au încadrat în acest subgrup. De menționat, că niciun subgrup genetic menționat nu s-a deosebit antigenic semnificativ de virusul vaccinal A/Perth/16/2009.

Tulpinile de virus gripal B (2 izolate) au prezentat același model general de reactivitate în analiza antigenică: fiecare din ele a prezentat reactivitate redusă cu serul specific față de tulpina vaccinală B/Brisbane/60/2008 cultivate pe ouăle embrionate. Cu toate acestea, tulpinile de virus gripal B au demonstrat o reactivitate înaltă cu serurile specifice față de virusurile străns legate genetic de tulpina vaccinală cultivată în culturi celulare (tab. 10). Posibil aceste devieri nesemnificative pot fi considerate drept urmare a unor diferențe de reproducere a virusului gripal B în culturi celulare și ouă embrionate. Analiza de secvențiere a izolatului B/Moldova/284/2011 pentru genele HA și NA a demonstrat că 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 subgrupului genetic definit de substituțiile aminoacizilor I146V și L58P, fiind stabilit că aceste substituții nu afectează antigenicitatea virusurilor.

Așadar, sezonul epidemic 2010-2011, perioada postpandemică 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 perioada postpandemică 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 [13, 14]. 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 [15]. 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 – grupare caracteristică majorității virusurilor gripale circulante în țările europene.

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.



Tabelul 9

## Analiza antigenică a virusurilor gripale A(H3N2) identificate în perioada postpandemică

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titrul de inhibare a hemaglutinării <sup>1</sup>							
			Seruri de referință (seruri de dihone)							
			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/E1	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. &lt; = &lt;40

Tabelul 10

## Analiza antigenică a virusurilor gripale de tip B identificate în perioada postpandemică

Virusuri	Data	Istoricul pasajelor	Titrul 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
Virusuri de referință									
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
Virusuri testate									
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

1. &lt; = &lt; 0; 2. Ser hiperimun de oi

Analiza sensibilității fenotipice la antivirale (oseltamivir și zanamivir) a virusurilor gripale A și B, izolate și identificate în Republica Moldova în perioadele nominalizate, cu un nivel suficient de activitate a sialidazei a fost efectuat în testul de inhibare a sialidazei. Tulpinile de virusuri gripale A(H1N1)pdm, A(H3N2) și B 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 grupul adamantanelor, dar susceptibil la ambii inhibitori ai neuraminidazei – zanamivir și oseltamivir [16].

### Concluzii

1. Infecțiile gripale în perioada prepandemică (2008-2009) au fost etiologic cauzate de virusurile gripale A(H3N2) și B, cu predominarea virusului A(H3N2), tulpinile virale identificate în Republica Moldova fiind similare cu tulpinile circulante în lume.

2. Perioada pandemică (2009-2010) s-a caracterizat prin circulația preponderentă a virusului gripal A(H1N1)pdm, caracteristica filogenetică a căruia 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.

3. În perioada postpandemică (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.

4. Virusurile gripale izolate și identificate în Republica Moldova fac parte din cladele virusurilor vaccinale: 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 – grupare caracteristică majorității virusurilor gripale circulante în țările europene.

5. Cercetarea la susceptibilitatea inhibitorilor neuraminidazei a virusurilor gripale circulante în Republica Moldova în perioadele nominalizate a demonstrat sensibilitatea lor la remediile antivirale de ultimă generație – oseltamivir și zanamivir.

6. Analizele antigenică și filogenetică 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.

### References

1. Kiselev OI, Marinich IG, Sominina AA. Gripp i drugie respiratornye virusnye infektsii: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika i terapiya [Influenza and other viral respiratory infections: epidemiology, prophylaxis, diagnostics and treatment]. Sankt-Petersburg, 2003;245.
2. Grudin MP, Komissarov AB, Pisareva MM, et al. Geneticheskoe raznoobrazie i molekulyarnaya evolyutsia virusov grippa A v Rossii v 2006-2012 gg [Genetic diversity and molecular evolution of the influenza A viruses in Russia during 2006-2012]. *Voprosy virusologii [Questions of Virology]*. 2012;6:37-42.
3. Kamps BS, Hoffmann Ch, Preiser W. Influenza Report. Flying Publisher, 2006;225.
4. Instruktzia po primeneniю immunoglobulinov fluorestsiriuschikh antitel sukhikh dlya bystroy diagnostiki grippa i drugikh ORZ [Instruction of fluorescent antibody dry immunoglobulin using for rapid diagnosis of influenza and other acute respiratory diseases]. Gosudarstvennyi Komitet Sanitarno-Epidemiologicheskogo Nadzora Rossiiskoi Federatsii [State Committee for Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Russian Federation]. Moscow, 1994.
5. CDC Real-Time RT-PCR Protocol for detection and characterization of swine influenza (version 2009).
6. Influenza Laboratory Course Atlanta, Georgia, USA, May 5-9. 2003;939.
7. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/technical\\_reports/influenza/Pages/influenza.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/publications/technical_reports/influenza/Pages/influenza.aspx).
8. Tse Herman, Kao Richard YT, Wu Wai Lan, et al. Structural basis and sequence co-evolution analysis of the hemagglutinin protein of pandemic influenza A/H1N1 (2009) virus. Original Research. *Experimental Biology and Medicine*. 2011;236:915-925.
9. 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\\_amino\\_acid\\_substitution\\_in\\_ha\\_h1n1\\_viruses.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/cp165_2009_2812_review_d222g_amino_acid_substitution_in_ha_h1n1_viruses.pdf)
10. European Center for Disease Prevention and Control. Influenza virus characterization, Summary Europe, January 2011 (Technical Document).
11. Chutinimitkul S, Herfst S, Steel J et al. Virulence-Associated Substitution D222G in the Hemagglutinin of 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Affects Receptor Binding. *Journal of Virology*. 2010;11802-11813. (doi:10.1128/JVI.01136-10)
12. Mak GC, Au KW, Tai LS, et al. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) with severe disease. *Euro Surveill*. 2010;15(14):pii19534. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19534>
13. Dapat IC, Dapat C, Baranovich T, et al. Genetic Characterization of Human Influenza Viruses in the Pandemic (2009-2010) and Post-Pandemic (2010-2011) Periods in Japan. *PloS ONE*. 2012;7(6):e36455. Doi:10.1371/journal.pone.0036455
14. European Center for Disease Prevention and Control. Influenza virus characterization, European Summary, April 2011 (Technical Document).
15. Sominina AA, Grudin MP, Erokin M, et al. Razvitie nadzora za grippom v Rosii v sisteme natsionalnogo tsentra VOZ po grippu [Development of influenza surveillance in Russia in the system of the WHO National Influenza Center]. *Voprosy virusologii [Questions of Virology]*. 2012;6:17-21.
16. Ciancio BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007 – 8 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. Surveillance and outbreak reports. [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)