https://doi.org/10.52326/ismv2024.18
CZU: 619:616.98:578.832.1:636.5(478

DATE CU REFERIRE LA INCIDENȚA CAZURILOR DE GRIPĂ AVIARĂ ÎN REPUBLICA MOLDOVA

Oxana GROZA, Nicolae STARCIUC, Serghei ARSENIEV
Universitatea Tehnică a Moldovei

Abstract. This paper reviews the situation in the Republic of Moldova regarding avian influenza infections in wild and domestic birds from January 2022 to September 2024. The study reflects that during the 3 years, were examinated 38210 samples to establish predominantly serotype combination H5N1 of the influnece virus. The basis of the undertaken study were the results of laboratory tests of biological samples of pathological material, collected from domestic birds from private households, kept in captivity or free and from birds from wildlife from various geographical areas of the Republic of Moldova. The results of study demonstrates the interaction between wild and domestic migratory birds, the spread of HPAI H5N1 leading to high mortalities and economic losses in the private sector. The conducted research demonstrated a incidence of spreading of avian flu on the territory of the Republic of Moldova, constituting in 2022 with 23 outbreaks of avian flu, 89 outbreaks in 2023, and in the first 9 months of the 2024 year were identified 38 new outbreaks.

Keywords: avian flu, evolution H5N1, real time RT-PCR, highly pathogenic avian influenza.

INTRODUCERE

Influența aviară, cunoscută și sub denumirea de gripa aviară, este o boală infecțioasă provocată de virusurile de tip A din familia Orthomyxoviridae [1]. Influența aviară a fost identificată pentru prima dată la sfârșitul secolului al XIX-lea. De-a lungul timpului, au fost reportate focare sporadice, dar severe în rândul păsărilor domestice. Virusurile de tip A au fost identificate ca fiind responsabile pentru aceste focare, iar cercetările ulterioare au arătat că păsările acvatice, în special rațele și gâștele, sunt gazdele naturale ale acestor virusuri. Influența aviară este o boală gravă și foarte contagioasă care afectează păsările de curte și din fauna sălbatică. Boala este provocată de diverse tipuri al virusului influenței, cu potențial de a contamina în aceeași măsură mamiferele, în special porcinele și oamenii [2].

Virusurile gripei aviară pot fi clasificate în două categorii principale: virusuri de înaltă patogenitate (HPAI) și virusuri de patogenitate joasă (LPAI). Până la moment s-a stabilit că, doar virusurile din subtipurile H5 și H7 produc infecții înalt patogene HPAI [3]. Virusurile influenței A conțin nucleoproteine și proteine matriciale înrudite antigenic, dar sunt clasificate în subtipuri în funcție de caracterele antigenice ale glicoproteinelor de suprafață: hemaglutinină (HA) și neuraminidază (NA) [4]. Până în prezent au fost identificate șaisprezece subtipuri de HA (H1-H16) și nouă subtipuri de NA (N1-N9) [5,6]. Fiecare virus al influenței A conține un antigen HA și un antigen NA, aparent combinate în toate modurile posibile [7].

Virusul H5N1 a fost identificat pentru prima dată în 1997 în Hong Kong, de atunci a continuat să fie izolat în mod sporadic în diverse regiuni, inclusiv China și Asia de Sud-Est. Acest virus a fost responsabil pentru evoluția unor focare severe în rândul păsărilor domestice și sălbatice, având un impact semnificativ asupra sănătății păsărilor. Cazurile de infectare umane cu H5N1 sau stabilit pentru prima dată în Vietnam în 2003, marcând începutul unei noi epidemii în Asia de Sud-Est. Din acest moment au fost raportate cazuri sporadice în Europa, Africa și Orientul Mijlociu, ce subliniază pericolul și riscurile pe care le prezintă virusul pentru sănătatea umană [2, 8]. Virusul H5N1 a fost izolat în rândul populației umane, la unele specii de păsări, inclusiv domestice și la rațele sălbatice, dar și la unii vectori naturali: câini, pisici, porci și mustelide [4]. Această diversitate a gazdelor receptive complică eforturile de control și prevenire a răspândirii virusului. Efectele virusului H5N1 nu se limitează doar la sănătatea păsărilor și a oamenilor, dar are un impact economic semnificativ asupra industriei avicole la nivel global [5, 9]. Focarele de gripă aviară au dus la restricții comerciale, pierderi economice și la scăderea încrederii consumatorilor în produsele avicole.

Pentru eradicarea focarelor de H5N1, au fost implementate diverse politici de control, inclusiv măsuri de biosecuritate în întreprinderile avicole, care au inclus vaccinarea păsărilor și monitorizarea sănătății avicole. Măsurile sanitar veterinare de supraveghere au fost intensificate chiar și în țările în care nu sau raportat cazuri de boală, pentru a preveni o posibilă epidemie [8].

Republica Moldova ca și alte țări, s-a confruntat cu multiple cazuri de influența aviară în ultimii ani. În acest articol, vom trece în revistă apariția, evoluția și diagnosticul gripei aviare în Republica Moldova pe parcursul ultimii 3 ani.

MATERIAL ȘI METODE

Studiul s-a efectuat în incinta Laboratorului Diagnostic Sănătate Animală din cadrul IP Centrului Național Sănătatea Animalelor, Plantelor și Siguranța Alimentelor (anterior IP CRDV) în colaborare cu Laboratorul de Referință UE (IZSVe), Legnaro, Italia și Laborator Național de Referință (IDSA), București, România, cu respectarea algoritmul de laborator și aplicarea unor metode de diagnostic actuale.

La baza studiului întreprins au stat rezultatele încercările de laborator al probelor biologice de material patologic, recoltat de la păsările domestice din gospodării particulare, întreținute în captivitate sau liber şi de la păsări din fauna sălbatică, din diverse zone geografice ale Republicii Moldova.

Pentru stabilirea incidența influenței aviare pe teritoriul Republicii Moldova, rezultatele încercărilor de laborator sau prelucrat statistic în programul EXEL.

În incinta LDSA, secția Virusologie și Biologie Moleculară, probele recepționate sau analizat prin aplicare următoarelor metode de diagnostic:

- Determinarea anticorpilor anti-virus influența aviară prin reacția de inhibare a hemaglutinării (RIHA), cu utilizarea reagenților de referință, elaborați de Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Italia, care include următoarele componente:

Antigen inactivat, tulpină de referinţă internaţională: H5N8-A/turkey/Italy/7898/2014; H5N1-A/mallard/Italy/3401/05; H5N3-A/duck/Italy/775/04; H7N7-A/macaw/England/626/80; H7N1-A/turkey/Italy/1067/99;Ser pozitiv de referinţă internaţional - H5N1, H5N8, H7N1, H7N7;Ser negativ de referinţă international.

- Determinarea anticorpilor specifici virusului influenței aviare prin metoda ELISA, cu utilizarea kitului de diagnostic ”ID Screen Influenza a Antibody Competicion Multispecies (IdVet)”, Franța.

- Identificarea genomului virusului influenței aviare (proteina matrix) prin real time PCR, utilizându-se kituri de diagnostic pentru etapa de izolare- „RNeasy®Mini Kit” QIAGEN, Germania și pentru etapa de amplificare- „ VetMAX™- Gold AIV Detection Kit”, SUA și Virotype® Influenza A RT-PCR Kit”, Germania.

- Identificarea subtipului de hemaglutinină H5/H7 și neuraminidază N1 a virusului influenței aviare prin Real Time PCR, cu folosirea unor kituri de diagnostic și reagenți, care au inclus: *pentru etapa de purificarea* a ARN-ului total, a fost folosit kitul de diagnostic-„RNeasy®Mini Kit” QIAGEN și pentru purificarea ARN-ului și ADN-ului viral „IndiSpin® Pathogen Kit” QIAGEN® GmbH for INDICAL BIOSCIENCE - *pentru etapa de amplificare* s-a utilizat kitul ”AgPath-ID One step RT-PCR” și secventele de primeri și sonde pentru fiecare subtip analizat: *secventele de primeri si sonde pentru H5;* Primer „H5 Forw ” ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G ; Primer „H5 Rev ” AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC; Sonda H5PRO 6FAM-TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA XT—PH; *secventele de primeri si sonde pentru H7;* Primer H7 F 5'-GGC CAG TAT TAG AAA CAA CAC CTA TGA-3'; Primer H7 R 5'-GCC CCG AAG CTA AAC CAA AGT AT-3';Primer H7 Probe 5'-FAM-CCG CTG CTT AGT TTG ACT GGG TCA ATC T – BHQ; *secventele de primeri si sonde pentru N1,* Primer N1 Forw 5'-GTT TGA GTC TGT TGC TTG GTC -3';Primer N1 Rev 5'- TGA TAG TGT CTG TTA TTA TGC C -3'; Sonda N1 5' VIC – TTG TAT TTC AAT ACA GCC AC- MGB -3'.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prima suspiciune privind pericolul introducerii gripei aviare pe teritoriul R. Moldova, a apărut la data de 6 ianuarie 2022, într-o gospodărie particulară din satul Hirișeni, raionul Telenești. Ca rezultat, inspectorii ANSA au prelevat două probe de material biologic de la păsări întreținute în captivitate și predate ulterior la LDSA al I.P. CNSAPSA (anterior I.P. CRDV). În laborator, prin utilizarea metodei specifice de diagnostic- *Identificarea genomului virusului influenței aviare (proteina matrix) prin real time PCR*, rezultatul încercării au fost pozitive.

Pentru confirmarea diagnosticului și identificarea subtipului viral, probele sau transmis la Laboratorul de Referință UE (European Union Reference Laboratory for Avian influenza & Newcastle disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Legnaro, Italia, unde sau analizat prin metodele de analiza moleculară și filogenetică, indicate în tabelul 1.

La data de 21 ianuarie 2022, laboratorul de referință UE, a emis un raport cu caracterizarea genomului virusului HPAI H5N1 din probele prezentate, confirmându-se prezența subtipului înalt patogen, H5N1 (tabelul 1).

Tabelul 1. Rezultatele testelor Laboratorului de Referință UE (IZSVe)

Laboratorului de Referință UE -Identificarea și patogenitatea virusului								
Probe	**Metode**							
	Identificare VIA prin Real Time RT-PCR	VIA subtipul H5 prin Real Time RT-PCR	VIA subtipul H5 prin Real Time RT-PCR	VIA subtipul H7 prin Real Time RT-PCR	VIA subtipul H7 prin Real Time RT-PCR	**Amplificarea virusului RNA** (PCR Real Time)	Subtipul de **Nx** (PCR Real Time)	VIA **subtipul H5** (Secvențierea)
1-traheea (găină)	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Negativ	Negativ	Pozitiv **H5 Clade 2.3.4.4[14]**	Pozitiv **subtip N1**	Pozitiv HPAI
2-traheea (găină)	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv	Negativ	Negativ	Pozitiv **H5 Clade 2.3.4.4[14]**	Pozitiv **subtip N1**	Pozitiv HPAI

La data de 13.05.2022, în Laboratorul Național de Referință I.P. CNSAPSA (I.P. CRDV), sau recepționat 5 probe de material patologic, recoltat de inspectorii ANSA, de la păsări domestice din mai multe gospodării din s. Rezina, r. Ungheni. În urma încercările de laborator în incinta LDSA, s-a stabilit prezența virusului gripei aviare, prin metoda de identificare a genomului virusului influenţei aviare (proteina Matrix) prin Real Time RT-PCR), în toate probele prezentate.

Confirmarea acestui nou focar de gripa aviară pe teritoriul republicii, s-a efectuat, prin transmiterea probelor pozitive la Laborator Național de Referință (IDSA), București, România, unde sau examinat prin metodele indicate în tabelul 2. Ca rezultat, s-a emis pe data de 06.06 2022, un Buletin de analiză care confirmă prezența virusului H5N1, rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2. Rezultatele testelor Laboratorului Național de Referință, România (IDSA)

Nr/pr	Material	Rezultate încercărilor			
		VIA prin Real Time RT-PCR	VIA subtipul H5 prin Real Time RT-PCR	VIA subtipul H7 prin Real Time RT-PCR	VIA subtipul N1 prin Real Time RT-PCR
1	(trahee, pulmon) de la palmipede (pui)	Pozitiv	Pozitiv	Negativ	Pozitiv
2	(trahee, pulmon) de la palmipede (pui)	Pozitiv	Pozitiv	Negativ	Pozitiv
3	(trahee, pulmon) de la galinacee (pui)	Pozitiv	Pozitiv	Negativ	Pozitiv
4	(trahee, pulmon) de la palmipede(rață)	Pozitiv	Pozitiv	Negativ	Pozitiv
5	(trahee, pulmon) de la palmipede	Pozitiv	Pozitiv	Negativ	Pozitiv

Al treilea focar de gripă aviară pe teritoriul republicii, a fost identificat la 02.08.2022 în s. Albinețul Vechi, raionul Fălești, într-o gospodărie non-profesională, la rațele domestice, stabilit de către Laborator Național de Referință I.P. CNSAPSA (anterior IP CRDV) prin metoda de identificare a genomului virusului influenţei aviare (proteina matrix) prin real time RT-PCR și confirmat, cu determinarea subtipului viral, de către Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală (IDSA) București, România, fiind analizate 13 probe de material patologic. În rezultat s-a identificat prezența virusului gripei aviare de subtipul H5N1.

Tabelul 3. Incidența gripei aviare în Republica Moldova pentru perioada anilor 2022-2024

№	Clasificarea	Specia	Materialul patologic	Nr. total de probe 2022-2024	METODE						REZULTAT	
					RIHA	ELISA	Real Time PCR (matrix)	Subtip H5	Subtip H7	Subtip N1	Prezența anticorpilor H5	Pozitiv H5N1
1	Fauna sălbatică	Galinacee/ Palmipede	trahee, pulmon	191	-	-	191	96	96	96	-	96
2	Păsări de curte	Galinacee/ Palmipede	ser sangvin	34037	28685	5352	-	-	-	-	218	-
			trahee, pulmon	198	-	-	198	54	54	54	-	58
			tampoane traheale și cloacale	2428	-	-	2428	-	-	-	-	-
	TOTAL			36854	28685	5352	2817	150	150	150	218	154

Ca rezultat al confirmării focarelor de gripă aviară pe teritoriul R. Moldova la începutul anului 2022, ANSA a întreprins măsuri sanitar-veterinare, privind identificarea, localizarea și lichidarea unor noi focare, cu colectarea și transmiterea la LDSA al unui număr mare de probe biologice, prezentate la Laboratorul Național de Referință I.P. CNSAPSA, care au cuprins păsările de curte și păsările din fauna sălbatică (tabelul 3), fiind de diversă natură, cu utilizarea unor metode actuale de diagnostic (tabelul 4).

Un factor favorizant al apariției focarelor de gripă aviară servește perioada rece al anului, care provoacă migrarea intensă al păsărilor sălbatice.

Din datele tabelului 3 se observă că, din totalul de 191 de probe fauna sălbatica, 96 au fost pozitive, iar la păsările de curte, din 2626 de probe de material patologic, în cazul la 58 de cazuri sau primit rezultate pozitive, tot odată la acestă categorie de păsări, sau examinat și 34037 probe ser sangvin, la care s-a depistat prezența anticorpilor virali la subtipul H5.

Laboratorul Național de Referință, Chișinău, din anul 2023 a implementat metode acreditate de MOLDAC, de confirmare al subtipurilor de virus al gripei aviare.

Din totalul de probe recepționare de Laboratorul Național de Referință în anii 2022-2024, în anul 2022 au fost analizate 5034 de probe, dintre care 70 pozitive, confirmate prin 69 de încercări de laborator prin metodele indicate în tabelul 4. În anul 2023 sau studiat 6163 de probe, pozitive sau identificat 89 probe, confirmate prin 167 de încercări, iar în anul 2024, în primele 9 luni, sau studiat 25657 de probe, dintre care 152 au fost pozitive și confirmate prin 78 de încercări.

Pe parcursul anului 2023 R. Moldova a înregistrat 150 de focare de gripa aviară înalt patogenă H5N1 la păsări din fauna sălbatică și de curte, iar în anul 2024, doar pe parcursul I trimestru sau identificat 38 focare noi de gripa aviară.

CONCLUZII

1. Rezultatele monitorizării situației epidemiologice pe teritoriul Republicii Moldova pe parcursul mai multor ani au confirmat prezența riscurilor majore de introducere a virusului influenței aviare, prin intermediul păsărilor sălbatice migratoare, fapt ce sa dovedit real în perioada anului 2022.

2. Primele focare de gripă aviară pe teritoriul Republicii Moldova au fost înregistrate, la începutul anului 2022, constituind pe parcursul anului 23 de focare de gripă aviară,ulterior în anul 2023 au fost confirmate 89 de focare, iar în anul 2024 în primele 9 luni, sau identificat 38 de focare noi.

3. Din anul 2023, Laboratorul Național de Referință I.P. CNSAPSA, a implementat și a acreditat metode noi de confirmare ale subtipurilor virale H5, H7, N1 care vor permite detectarea operativă și corectă a cazurilor de gripă aviară pentru a întreprinde acțiuni precoce de localizare a focarelor de boală și de diminuare substanțială a incidenței bolii.

BIBLIOGRAFIE

1. CAPUA I., ALEXANDER D. J. Avian influenza infections in birds-a moving target. Influenza and other respiratory viruses 2007, vol.1, pp.11-18, eISSN:1750-2659

2. FOUCHIER RA, MUNSTER V, WALLENSTEN A, BESTEBROER TM, HERFST S, SMITH D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. Journal of virology 2005, vol.79, pp.2814–2822, eISSN: 1098-5514

3. KAREN S. Y., CARPENTER T. E., CARDONA C. J. Epidemiology of H5N1 avian influenza. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2009, vol. 32, pp.325–340, eISSN: 1878-1667

4. McCAULEY, J.W., HONGO S., KAVERIN, N.V., et all. 2011. Orthomyxoviridae. https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae

5. NAGUIB M.N. et al. Eurosurveillance 2017, p.1, ISSN: 1560-7917

6. SWAYNE D, HALVORSON D.A. Influenza. In: Saif Y, et al., editors. Diseases of poultry. Ames, IA: Iowa State Press; 2003. p. 135–160, https://nap.nationalacademies.org/read/11150/chapter/

7. SWAYNE D. E., BOULIANNE M., LOGUE C. M.,et all. 2019, Diseases of Poultry, Fourteenth Edition, eISBN:9781119371199

8. SWAYNE D.E, KING D.J. Avian influenza and Newcastle disease. Journal of the American Veterinary Medical Association 2003; vol.222, pp.1534–1540, eISSN: 1943-569X

9. YANG, Z.Y., WEI, C.J., KONG, W.P., WU, L., XU, L., SMITH, D.F., NABEL, G.J. Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity. Science 2007, pp.825–828, eISSN: 1095-9203