

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

CZU: 578.834.1:578.53(043.2)

COLAC Svetlana

**DIVERSITATEA GENOTIPICĂ A SARS-CoV-2 ÎN
PERIOADA PANDEMICĂ ȘI POSTPANDEMICĂ TIMPURIE**

313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Chișinău, 2026

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului virusologic, Agenția Națională pentru Sănătate
Publică, Republica Moldova

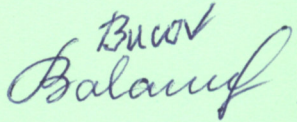
Conducător

Burduniuc Olga,
Dr. hab. șt. med., conf. cercet.



Membrii comisiei de îndrumare:

Bucova Victoria, dr. hab. șt. med., prof. cercet.
Bălan Greta, dr. hab. șt. med., conf. univ.
Mariana Ulinici, dr. șt.med., conf. cercet.




Susținerea va avea loc la 25.08.2026, ora 13:00, în incinta USMF "Nicolae Testemițanu", bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205 în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 01.07.2026 (proces-verbal nr.4).

Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

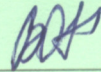
Președinte:

Plăcintă Gheorghe,
doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar



Membrii:

Burduniuc Olga,
doctor habilitat în științe medicale, conferențiar cercetător



Ulinici Mariana,
doctor în științe medicale, conferențiar cercetător

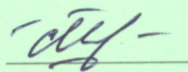
Crudu Valeriu,
doctor în științe medicale, conferențiar universitar



Spătaru Diana,
doctor în științe medicale, conferențiar universitar

Autor

Colac Svetlana



CUPRINS

INTRODUCERE	4
1. CARACTERISTICA MOLECULARĂ A VARIANTELOR EMERGENTE DE SARS-CoV-2 ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR DETERMINATE DE ACESTEA.....	6
2. MATERIAL ȘI METODE UTILIZATE ÎN CERCETARE	6
3. CARACTERIZAREA GENETICĂ A TULPINILOR SARS-CoV-2 IDENTIFICATE DIN PROBELE CLINICE.....	7
3.1. Analiza genetică a variabilității izolatelor virusului SARS-CoV-2 circulante pe teritoriul Republicii Moldova în perioada 2021-2024.....	7
3.2. Caracteristica moleculară a substituțiilor, a delețiilor și a inserțiilor în evoluția SARS-CoV-2.....	8
3.3. Particularitățile mutațiilor sinonime și nonsinonime în dinamica genomică a virusului SARS-CoV-2.....	12
3.4. Dinamicile evolutive ale SARS-CoV-2 și implicațiile asupra scorului de evadare imună RBD.....	14
4. MONITORIZAREA GENETICĂ A VIRUSULUI SARS-CoV-2 ÎN APELE UZATE PRIN SECVENȚIEREA ÎNTREGULUI GENOM.....	16
4.1. Supravegherea genomică a SARS-CoV-2 în apele uzate ca alternativă de monitorizare a evoluției virusului în Republica Moldova.....	16
4.2. Analiza comparativă a performanței instrumentelor Freyja și Kallisto pentru estimarea abundenței liniilor SARS-CoV-2 în contextul monitorizării apelor uzate.....	19
CONCLUZII GENERALE	23
RECOMANDĂRI	24
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	24
LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI	26

INTRODUCERE

Actualitatea temei. Apariția și răspândirea rapidă a virusului SARS-CoV-2 la sfârșitul anului 2019 au determinat una dintre cele mai grave crize de sănătate publică la nivel global, cu impact major asupra sistemelor sanitare, economiei și societății [1,2,3].

La 5 mai 2023, Organizația Mondială a Sănătății a declarat încheierea stării de urgență de sănătate publică, virusul continuă să circule la nivel global, menținând relevanța cercetărilor în domeniu [4,5].

Capacitatea virusului SARS-CoV-2 de a suferi mutații genetice conduce la apariția continuă de variante și subvariante cu proprietăți biologice modificate, inclusiv transmisibilitate crescută și evadare imună. Aceste modificări influențează eficiența testelor de diagnostic, a terapiilor antivirale și a vaccinurilor, impunând o monitorizare constantă a genomului viral [6,7,8,9,10].

Secvențierea genomică reprezintă un instrument fundamental în supravegherea epidemiologică modernă, oferind informații detaliate privind evoluția virusului și dinamica transmiterii acestuia [11,12,13,14,15,16]. Integrarea datelor genomice cu cele clinice și epidemiologice permite identificarea rapidă a focarelor și fundamentarea măsurilor de sănătate publică [16,17]. În Republica Moldova, implementarea tehnicilor moderne de biologie moleculară și introducerea secvențierii genomice au permis monitorizarea circulației SARS-CoV-2 la nivel național [18,19].

Totodată, epidemiologia bazată pe analiza genomică a apelor uzate permite detectarea precoce a virusului atât la persoane simptomatice, cât și asimptomatice [20,21,22,23]. Această metodă reprezintă un instrument eficient pentru monitorizarea circulației virusului și evaluarea dinamicii transmiterii la nivel comunitar [24,25,26].

Prin urmare, actualitatea temei este determinată de necesitatea continuării supravegherii integrate a SARS-CoV-2, prin utilizarea secvențierii genomice și a epidemiologiei apelor uzate, pentru detectarea rapidă a variantelor emergente și optimizarea intervențiilor de sănătate publică [12,26].

Scopul lucrării: Identificarea variantelor virusului SARS-CoV-2 cu analiza filogenetică a izolatelor circulante pe teritoriul Republicii Moldova pentru perfecționarea măsurilor de supraveghere și control a morbidității prin COVID-19.

Obiectivele cercetării:

1. Caracteristica filogenetică a izolatelor virusului SARS-CoV-2 depistate pe teritoriul Republicii Moldova.
2. Studiarea evoluției virusului SARS-CoV-2 cu identificarea substituțiilor, inserțiilor, delețiilor și compararea lor cu diversitatea genomului viral la nivel global.
3. Analiza dinamicii circulației virusului SARS-CoV-2 și apariției noilor variante genetice, investigarea relației dintre genotipurile virusului și datele epidemiologice.
4. Monitorizarea apelor uzate ca metodă de predicție a tendințelor epidemiologice ale infecției cu SARS-CoV-2.
5. Estimarea impactului diferitor genotipuri virale ale SARS-CoV-2 cu argumentarea propunerilor privind diagnosticul de laborator al COVID-19.

Ipoteza cercetării: Monitorizarea continuă a circulației virusului SARS-CoV-2 și identificarea variantelor circulante în probe clinice și de mediu din Republica Moldova vor consolida supravegherea epidemiologică a infecțiilor respiratorii virale, sporind capacitatea de anticipare a epidemiilor, nivelul de pregătire și eficiența răspunsului la o potențială pandemie viitoare.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute: În premieră pentru Republica Moldova, au fost obținute rezultate originale privind particularitățile genotipice și fenotipice ale virusului SARS-CoV-2 circulant pe teritoriul țării. Utilizarea tehnicilor de secvențiere la studierea tulpinilor virusului SARS-CoV-2 a permis aprecierea și evaluarea poziției acestora în arborii filogenetici globali, fapt extrem de important pentru argumentarea evoluției virusului.

Studiul dat prezintă interes științifico-practic nu numai pentru sănătatea publică, dar și pentru întregul sistem medical, administrația publică locală, mediul academic în contextul argumentării și optimizării măsurilor de control și de răspuns la infecția COVID-19.

Ca urmare a realizării acestei cercetări, au fost identificate genovariantele virusului SARS-CoV-2 (COVID-19) pe teritoriul Republicii Moldova din probe clinice și din ape uzate.

Informația despre secvențierea virusului SARS-CoV-2 a fost utilizată în calitate de indicatori de prognosticare a dinamicii procesului epidemic. Rezultatele obținute vor fi utilizate pentru elaborarea unor documente (protocoale clinice naționale, ghiduri), pentru pregătirea specialiștilor în domeniu, a studenților și a medicilor rezidenți în cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Problema științifică aplicativă de importanță majoră soluționată: În urma acestui studiu a fost identificat specificul evoluției virusului SARS-CoV-2 în perioada pandemică și postpandemică, cu identificarea și evaluarea diversității genotipice și fenotipice a tulpinilor circulante. A fost demonstrată influența apariției tulpinilor noi asupra ratei morbidității și mortalității prin COVID-19 pe teritoriul Republicii Moldova. Studiul a demonstrat de asemenea eficiența ridicată a instrumentului Freyja pentru analiza și interpretarea rezultatelor de secvențiere a probelor din apele uzate.

Implementarea practică a rezultatelor: În baza rezultatelor prezentei cercetări a fost elaborat ghidul de bune practici „Secvențierea metagenomică prin tehnologia Illumina”. În cadrul studiului a fost elaborată o broșură informativă pentru studenți, medici rezidenți, cercetători științifici, medici specialiști: „Bune practici în secvențierea genomică”. De asemenea, a fost elaborată o broșură informativă pentru aceleași specialiști: „Bazele unei culturi responsabile de biosiguranță și biosecuritate”. În baza rezultatelor studiului au fost elaborată monografia „Secvențierea acizilor nucleici – o privire de ansamblu asupra evoluției și inovației tehnologice”. În colaborarea cu echipa care a participat la elaborarea PCN, a fost actualizat Protocolul clinic național „Infecția cu coronavirus de tip nou (COVID-19)”, (PCN-371, Chișinău 2025).

Aprobarea rezultatelor: Metodologia și designul studiului au fost aprobate în trei etape: de Consiliul științific al ANSP (18.01.2023), de Comitetul de Etică al USMF „Nicolae Testemițanu” (aviz favorabil, 20.09.2023) și de Seminarul științific de profil (20.12.2023), fiind validate tema, conducătorul științific și comisia de îndrumare. Cercetarea a fost realizată în Laboratorul virusologic din cadrul Direcției diagnostic de laborator în sănătate publică al ANSP și în Laboratorul național de referință în secvențiere genomică (cu statut de direcție) al ANSP. Teza a fost discutată și aprobată la ședința Consiliului științific (proces verbal nr. 7 din 18.11.2025), la ședința comună a conducătorului de doctorat, Comisiei de îndrumare și a unității primare de cercetare (proces-verbal din 11.05.2026) și la ședința Seminarului științific de profil 313. Imunologie, microbiologie, virusologie; 321. Medicină generală / 313.02 Microbiologie, virusologie medicală / 321.09 Boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală (proces-verbal din 27.05.2026). Teza a fost recomandată pentru susținerea publică prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 01.07.2026 (proces-verbal nr.4).

Prezentarea rezultatelor cercetării: În baza rezultatelor cercetării au fost publicate 15 lucrări: șase articole publicate în reviste științifice (inclusiv un articol în revistă, trei în reviste internaționale recenzate, două în reviste naționale de categoria B), patru articole prim autor, 9 rezumate în lucrările conferințelor științifice naționale și internaționale, o monografie, 13 participări active cu comunicări/ postere la conferințe și congrese științifice naționale și internaționale, două certificate de inovator, două opere științifice cu drept de autor, un protocol clinic național și șapte acte de implementare în practică a rezultatelor cercetării.

Volumul și structura tezei: Teza este expusă pe 94 pagini de text de bază și include următoarele compartimente: foaie de titlu, cuprins, lista anexelor, abrevierilor, figurilor, tabelor, introducere, patru capitole, concluzii generale, recomandări, 189 de referințe bibliografice și 12 anexe. Materialul iconografic cuprinde 8 tabele și 42 de figuri.

Cuvinte-cheie: COVID-19, SARS-CoV-2, secvențiere, NGS, genom viral, monitorizare genetică, variante de mutații, ape uzate.

CONȚINUTUL TEZEI

1. CARACTERISTICA MOLECULARĂ A VARIANTELOR EMERGENTE DE SARS-CoV-2 ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR DETERMİNATE DE ACESTEA

Capitolul prezintă o sinteză amplă a datelor din literatura de specialitate privind biologia, evoluția genetică și particularitățile moleculare ale virusului SARS-CoV-2, evidențind mecanismele de mutație, recombinare și adaptare ale acestuia. Sunt descrise structura genomică și proteică a virusului, ciclul replicativ, precum și rolul proteinelor structurale în procesul de infectare și interacțiunea cu celula-gazdă.

De asemenea, sunt analizate clasificarea și nomenclatura variantelor SARS-CoV-2 conform principalelor sisteme internaționale (OMS, PANGO, GISAID, Nextstrain), fiind evidențiate variantele de îngrijorare și impactul acestora asupra transmisibilității, virulenței și evaziunii imune. Capitolul include și o analiză a epidemiologiei moleculare a infecției COVID-19, cu descrierea mecanismelor de transmitere, a factorilor de risc și a particularităților clinico-epidemiologice.

Un compartiment important este dedicat metodelor moderne de diagnostic, inclusiv tehnicilor de biologie moleculară (RT-PCR), secvențierii genomice de nouă generație și analizei bioinformatică, subliniind rolul acestora în identificarea variantelor virale și în supravegherea epidemiologică. Sunt prezentate principalele platforme de secvențiere și avantajele acestora în cercetarea genomică.

Totodată, capitolul abordează monitorizarea virusului SARS-CoV-2 în apele uzate ca metodă inovatoare de supraveghere epidemiologică, evidențind utilitatea acesteia în detectarea precoce a circulației virale, evaluarea dinamicii transmiterii și identificarea variantelor emergente. Sunt discutate atât avantajele acestei metode, cât și limitările tehnice și necesitatea dezvoltării unor abordări standardizate și a instrumentelor bioinformatică adecvate.

Prin conținutul său, capitolul oferă fundamentul teoretico-științific necesar pentru înțelegerea evoluției SARS-CoV-2 și pentru aplicarea metodelor moderne de diagnostic și supraveghere genomică în sănătatea publică.

2. MATERIAL ȘI METODE UTILIZATE ÎN CERCETARE

Actuala cercetare a fost inițiată în anul 2022, în cadrul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică - Laboratorul virusologic și reprezintă un studiu complex, desfășurat pe parcursul

perioadei de implementare a tehnicii de secvențiere a întregului genom al virusului SARS-CoV-2 în Republica Moldova (2021-2025). În studiu s-au utilizat secvențele virusului SARS-CoV-2 obținute din probe biologice de tampoane nazo- și orofaringiene și din probele de ape uzate. Prezența virusului SARS-CoV-2 a fost confirmată prin reacția de polimerizare în lanț (RT-PCR), utilizând diferite kituri de reactivi comerciali. Pentru reacția de secvențiere au fost selectate probele pozitive, conform criteriilor de includere și excludere.

Studiul a inclus un eșantion reprezentativ de probe biologice din diverse teritorii ale republicii, recoltate de la pacienți cu caracteristici demografice și grade diferite de severitate, precum și probe de ape uzate. Dimensiunea eșantionului a fost calculată pentru un nivel de încredere de 95% și o eroare de 5%, rezultând un minim de 240 de probe, conform formulei $n = P(1-P)(Z\alpha/d)^2$.

Astfel, au fost analizate 733 de probe biologice recoltate în perioada noiembrie 2021–noiembrie 2024 pentru monitorizarea SARS-CoV-2 prin secvențiere genomică și analiză filogenetică. Odată cu reducerea testărilor PCR, a fost implementată monitorizarea prin ape uzate, fiind secvențiate 31 de probe în perioada 2024–2025, ceea ce a permis identificarea tulpinilor circulante.

Realizarea scopului și a obiectivelor stabilite, studiul a fost efectuat în câteva etape.

La *prima etapă* a studiului a fost analizată literatura de specialitate privind caracteristica genetică și evoluția virusului SARS-CoV-2, noile variante cu potențial epidemiologic și impactul acestora asupra sănătății publice.

La *etapa a doua* au fost selectate probele eligibile pentru secvențiere, conform criteriilor de includere și excludere, din probe pozitive confirmate prin RT-PCR. Secvențierea întregului genom a fost realizată utilizând platformele Ion Torrent Genexus și Illumina MiSeq, iar analiza datelor s-a efectuat cu ajutorul bazelor de date și instrumentelor bioinformaticice (Nextclade, Nextstrain, GISAID, Pangolin, Freyja, Kallisto).

La *etapa a treia*, rezultatele obținute au fost aplicate prin publicarea de lucrări științifice, inclusiv articole în reviste științifice naționale și internaționale, teze, prin participări active cu prezentare sau cu poster la foruri științifice naționale și internaționale, precum și prin publicarea de ghiduri, de broșuri și a unei monografii.

3. CARACTERIZAREA GENETICĂ A TULPINILOR DE SARS-CoV-2 IDENTIFICATE ÎN PROBELE CLINICE

3.1. Analiza genetică a variabilității izolatelor virusului SARS-CoV-2 circulante pe teritoriul Republicii Moldova în perioada 2021-2024

Pe parcursul perioadei de studiu au fost obținute 733 de secvențe ale genomului virusului SARS-CoV-2, dintre care 49 (6,7%) aparțineau variantei Delta (B.1.617.2), 680 (92,77 %) – variantei Omicron (B.1.1.529) și 4 (0,6 %) – variantei recombinante.

Vârsta pacienților ale căror probe au fost secvențiate și analizate a fost cuprinsă între trei ani și 94 de ani (vârsta medie fiind de 57,5 ani ± 21,3) (95 % CI: 56, 59), dintre care 44,3 % (95 % CI: 41 %, 48 %) erau bărbați, iar 55,7 % (95 % CI: 52 %, 59 %) – femei.

În funcție de zona de reședință, s-a constatat o prevalență a pacienților din cea urbană (79,1 %, 95 % CI: 76 %, 82%), și cea rurală (20,9 %, 95 % CI: 18 %, 24 %).

Analiza filogenetică a genomilor SARS-CoV-2 în raport cu tulpina de referință Wuhan-Hu-1 a relevat un grad diferit de polimorfisme ale aminoacizilor. Diversitatea genetică a virusului SARS-CoV-2 și variabilitatea acestuia sunt asigurate de frecvența ridicată a recombinării ARN-

ului genomic, ceea ce contribuie la apariția spontană de noi variante ale virusului cu proprietăți noi, care pot fi potențial cauza apariției unor noi valuri ale pandemiei (figura 1).

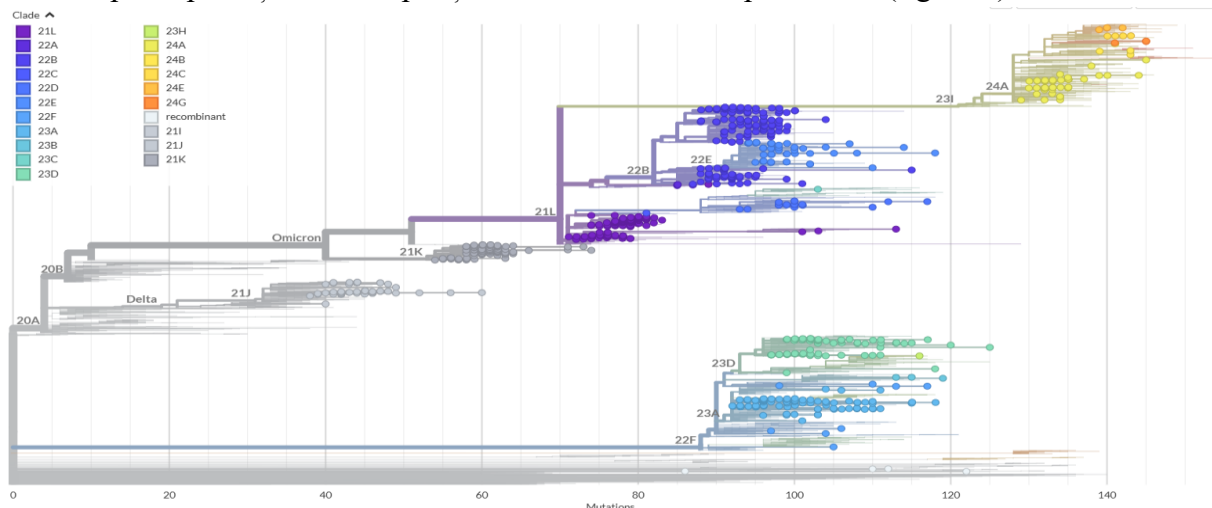


Figura 1. Relația filogenetică dintre izolatele virusului SARS-CoV-2 în cadrul prezentului studiu

Secvențele genomice ale virusului SARS-CoV-2 identificate în Republica Moldova au fost repartizate pe o arie largă, de la grupul 20A la 24A, grupate cu variantele care au circulat în întreaga lume în perioada studiului. Astfel, în urma analizei genetice a întregului genom au fost evidențiate 21 de clade distincte – 21L, 21I, 21J, 21K, 22A, 22B, 22C, 22D, 22E, 22F, 23A, 23B, 23C, 23D, 23H, 24A, 24B, 24C, 24E, 24G – și una recombinantă. Din cele 21 de clade, șase (21L, 22B, 22E, 23A, 23D și 24A) sunt considerate ramificații evolutive majore, întrucât cuprind majoritatea genomilor eșantionați.

Datele obținute arată și rezultate neașteptate. De exemplu, au fost descoperite patru secvențe recombinante (marcate cu puncte albe) care pot însemna fie o mutație a virusului în interiorul țării, fie că acești pacienți au fost infectați simultan cu două sublinii care au format în final linii recombinante. Varianta Omicron a prezentat o evoluție rapidă, de la clada 21K la clada 21L cu circa 60 de mutații. Cladele 22A, 22B, 22C, 22D, 22E, 22F au evoluat la fel de bine, atingând 90-120 de mutații. Divergența pentru cladele 23A, 23B, 23C, 23D, 23H, 24A, 24B, 24C, 24E, 24G a crescut între 120 și 140 de mutații. În mod surprinzător, divergența descendenților Omicron a crescut până la aproximativ 140-150 de mutații, ceea ce este de patru ori mai mult decât în cazul variantei Delta (clada 21J), care prezintă până la 40 de mutații în genomul său. Anterior, variantele Omicron, cu o divergență ridicată față de variantele pre-Omicron, au prezentat modificări de patogenitate care au dus la simptome mai ușoare.

Ramificațiile 24K, 21L și 22B reprezintă clade timpurii cu un număr mai mic de mutații (de obicei în jur de 80) și sunt reprezentate de tulpini care au circulat predominant în perioada 2021-2022. Cladele 22E, 22F, 23A și 23D, răspândite în perioada 2022-2023, au înregistrat până la 100 de mutații per genom, iar cladele 23I și 24A, cele mai recente clade majore, au numărat în jur de 120-140 de mutații.

3.2. Caracteristica moleculară a substituțiilor, a delețiilor și a inserțiilor în evoluția SARS-CoV-2

Analiza comparativă a variantelor genomice ale virusului SARS-CoV-2 a arătat că, în majoritatea cazurilor, evoluția virusului și modificările genomice au fost determinate de substituții, cu o medie de $72,6 \pm 21,1$ substituții pe genom (95 % CI: 71, 74), de deleții, cu o medie de $48,6 \pm$

20,1 per genom (95 % CI: 47, 50), și de inserții cu DCC care au fost detectate foarte rar, în medie $4,5 \pm 8,3$ (95 % CI: 3,9, 5,1) și respectiv $1,7 \pm 2,2$ (95 % CI: 1,5, 1,8) per genom.

În figura 2, diagramele boxplot ilustrează valoarea medie a substituțiilor nucleotidice în funcție de cladele Nextstrain, precum și valoarea medie a substituțiilor aminoacidice în diferite clade. Aceste reprezentări grafice evidențiază clar faptul că, în timp (din 2021 până în 2024) numărul de substituții nucleotidice (a) și aminoacidice (b) a crescut semnificativ. Astfel, din datele acestor grafice se observă clar că subvariantele Omicron ale virusului SARS-CoV-2 au prezentat o valoare medie mai mare a mutațiilor decât varianta Delta.

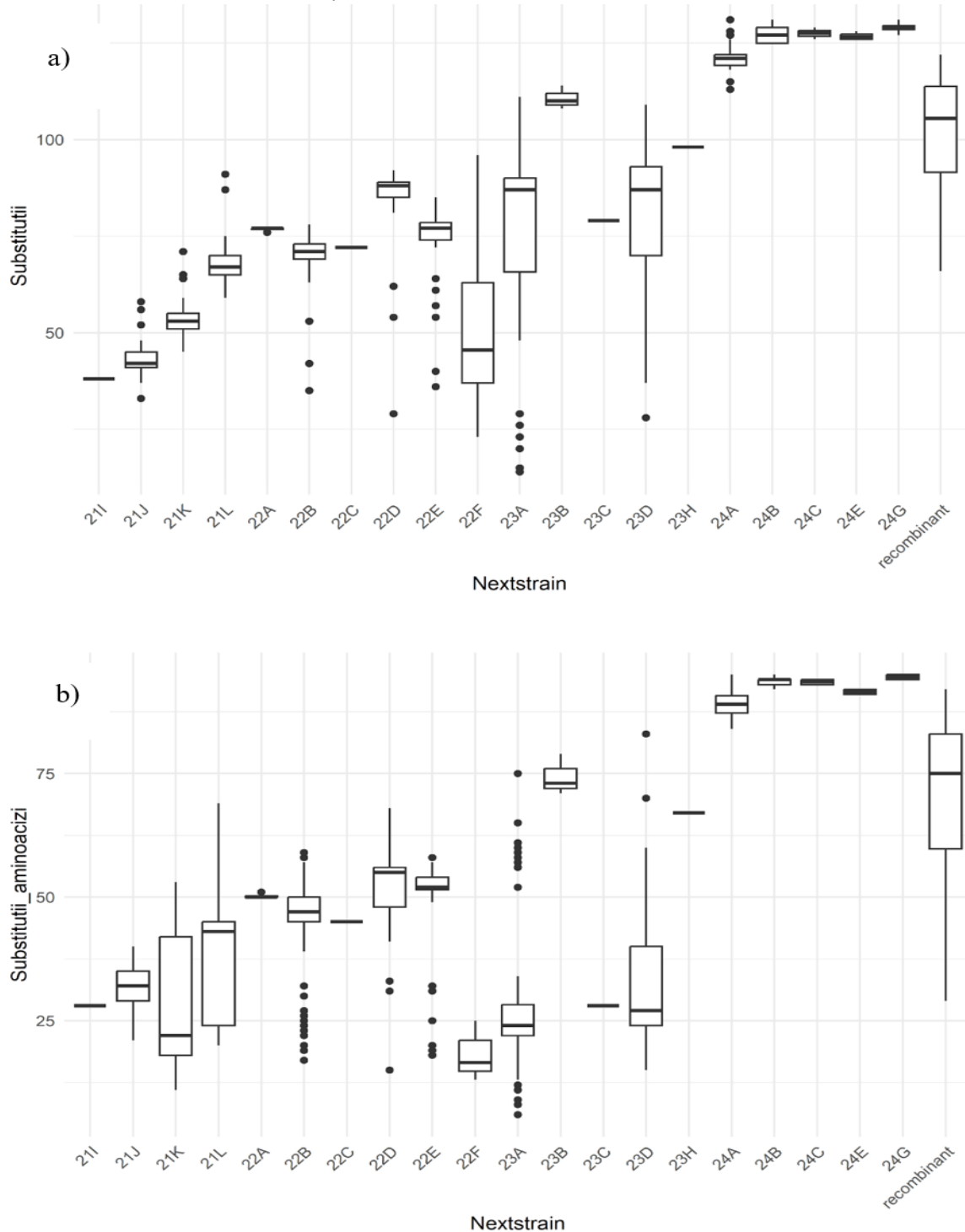


Figura 2. Diagrama de tip boxplot care evidențiază variația numărului de substituții nucleotidice a) și aminoacidice b) în funcție de cladele SARS-CoV-2

Analiza mutațiilor genomurilor virale secvențiate a fost realizată la două niveluri: la nivel nucleotidic și la nivel aminoacidic. Trebuie remarcat faptul că în graficele din figura 2 se observă clar dependența numărului total de substituții de clada virusului SARS-CoV-2. Astfel, numărul de substituții nucleotidice și aminoacidice crește odată cu evoluția virusului și cu apariția de noi clade. Cea mai mare diversitate genetică a fost înregistrată pentru cladele variantei Omicron, valorile medii ale mutațiilor variind în intervalul de 120 de substituții nucleotidice și peste 80 de substituții aminoacidice. Valori medii ridicate ale mutațiilor au prezentat și tulpinile recombinante – aproximativ 110 substituții nucleotidice și 75 de substituții aminoacidice.

Diagrama distribuției delețiilor în genomul virusului SARS-COV-2 în funcție de grupul cladei Nextstrain este reprezentată în figura 3.

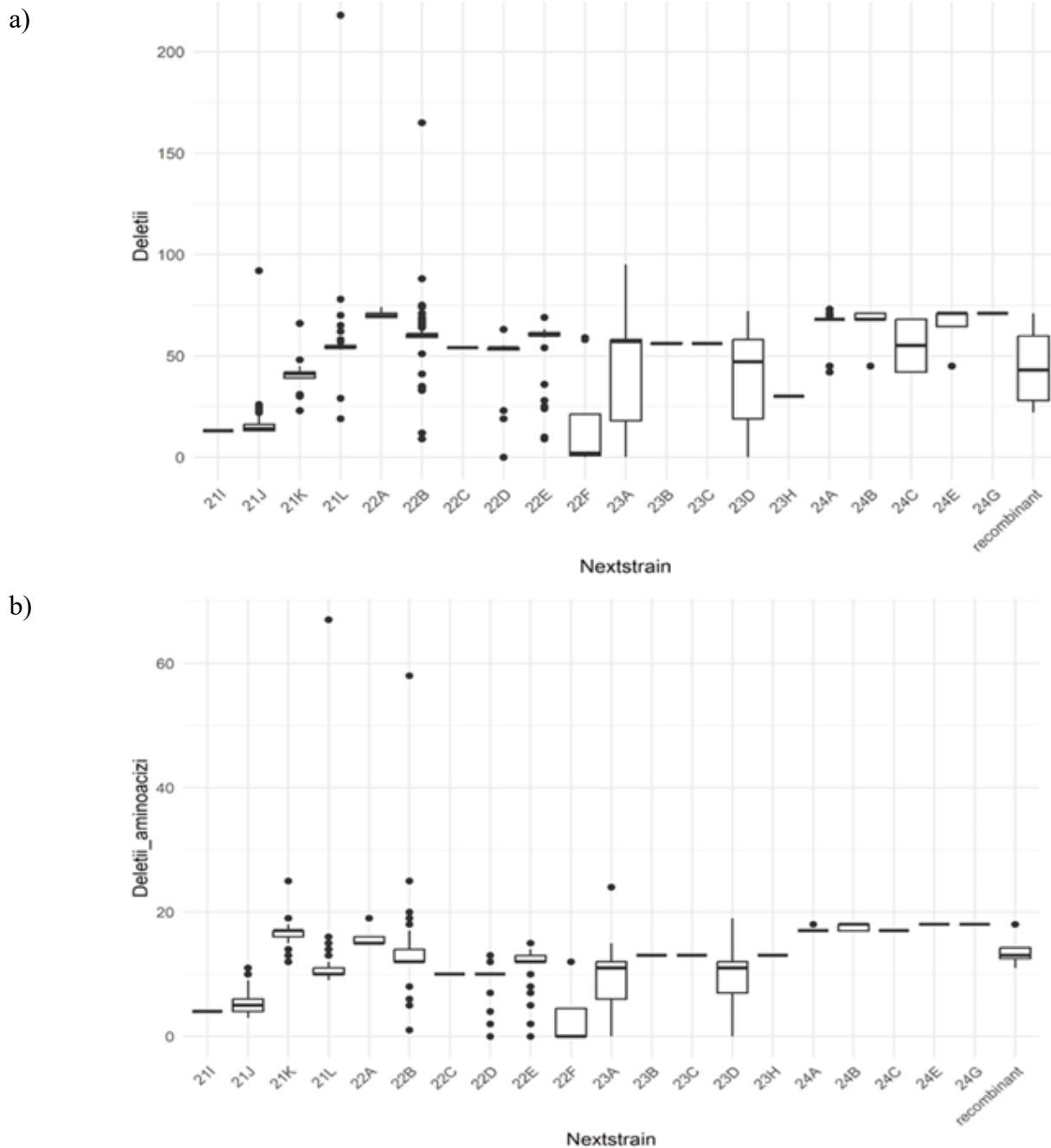


Figura 3. Distribuția numărului de deleții nucleotidice a) și aminoacidice b) în cladele virusului SARS-CoV-2

Prezintă interes faptul că creșterea numărului de deleții este vizibilă la compararea cladelor (21I, 21J) variantei Delta, colectate la sfârșitul anului 2021, cu cladele variantei Omicron (21K, 21L, 22A, 22B, 22C, 22D, 22E, 22F, 23A, 23B, 23C, 23D, 23H, 24A, 24B, 24C, 24E, 24G) și ale variantei recombinante, aceasta se caracterizează prin tendințe mai stabile. Uneori, numărul de deleții a crescut, cum ar fi în cladele 21K, 22B, 23A, 23D, ceea ce indică probabil o diferență între izolatele acestor grupuri și dobândirea de mutații suplimentare în genomul lor.

Analiza evoluției virusului SARS-CoV-2 în funcție de apariția inserțiilor în genom a arătat că în majoritatea cazurilor se observă un număr minim de inserții sau chiar absența acestora. Conform datelor din figura 4, inserțiile nucleotidice și aminoacidice au apărut în principal în cladele 22F, 23A, 23D, unde mediana este mult mai mare decât în altele, ceea ce poate însemna o variabilitate mai mare a izolatelor din aceste clade. De asemenea, s-a observat că numărul de inserții în tulpinile recombinante este mai mare în comparație cu alte grupuri.

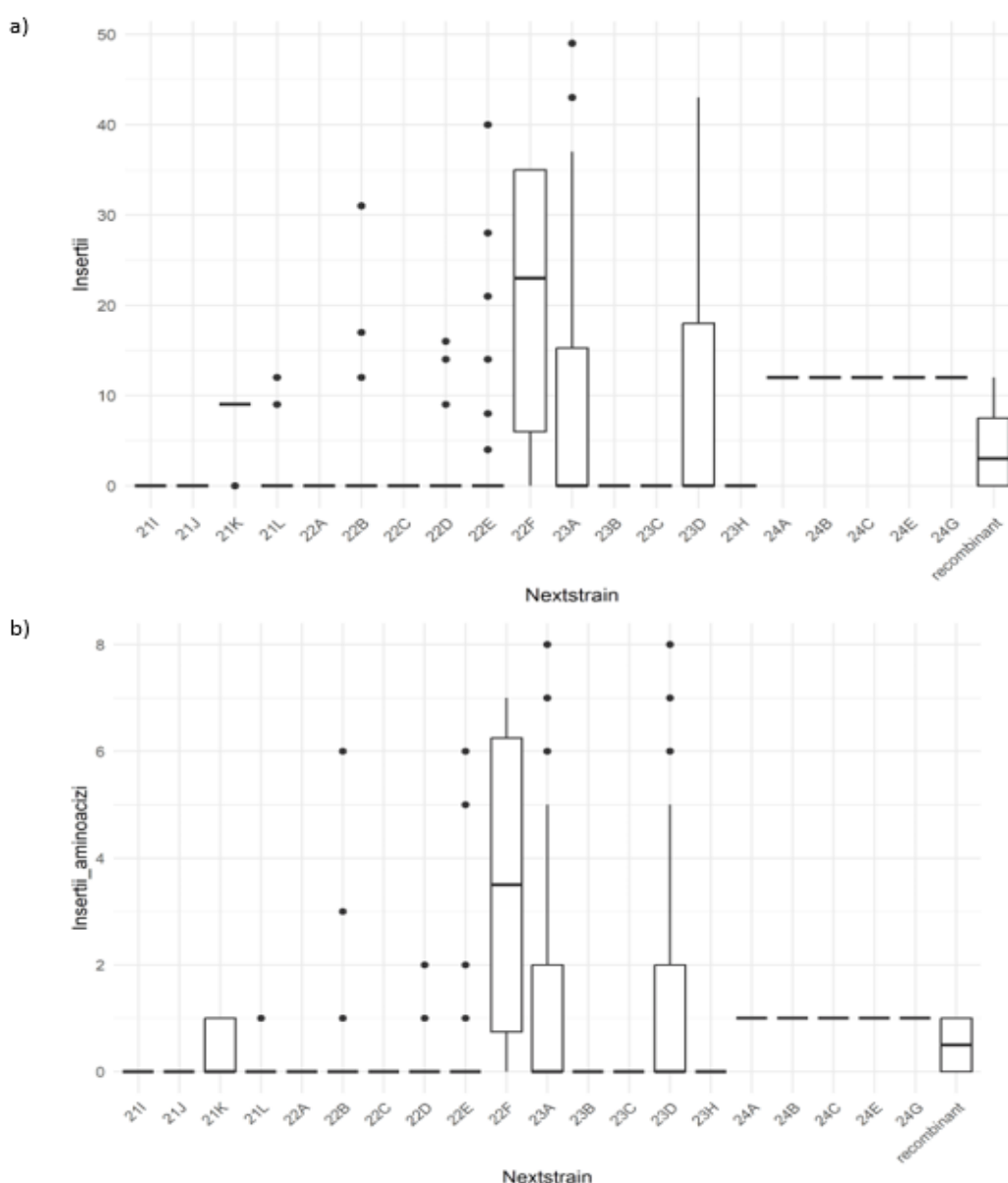


Figura 4. Distribuția inserțiilor nucleotidice a) și aminoacidice b) în cadrul cladelor virusului SARS-CoV-2

Trebuie remarcat faptul că inserțiile scurte, la fel ca și delețiile, au tendința de a se asocia cu secțiuni de nucleotide identice sau di- și trinucleotide aranjate în tandem. Se poate presupune că aceste inserții au fost rezultatul deplasării ARN-polimerazei dependente de ARN (RdRp). Persistă și o altă presupunere că deși majoritatea, dacă nu toate, inserțiile cu deplasarea cadrului de citire sunt artefacte de secvențiere, unele dintre ele în alte gene pot fi evenimente reale, care reflectă caracterul opțional al acestor gene pentru reproducerea virusului.

3.3. Particularitățile mutațiilor sinonime și nonsinonime în dinamica genomică a virusului SARS-CoV-2

Mutațiile sinonime (synonymous mutations) nu modifică aminoacidul codificat, dar pot influența procesele celulare, în timp ce mutațiile nonsinonime (non-synonymous mutations) determină modificări ale structurii proteinelor, afectând proprietăți esențiale ale virusului, precum transmisibilitatea și evaziunea imună.

În total au fost identificate 13 672 mutații sinonime și 54 080 mutații nonsinonime, ceea ce indică o presiune selectivă orientată spre modificări proteice. Gena Spike prezintă cel mai mare număr de mutații nonsinonime, reflectând rolul său major în adaptarea virală și interacțiunea cu receptorul ACE2. De asemenea, genele N și ORF1ab înregistrează un număr semnificativ de mutații, sugerând implicarea lor în procesele de replicare și stabilitate virală.

Distribuția neuniformă a mutațiilor între gene evidențiază importanța funcțională diferită a acestora și contribuția lor la evoluția și adaptarea continuă a virusului SARS-CoV-2.

Aproape toate mutațiile nonsinonime din molecula de acid nucleic corespund unor mutații aminoacidice în molecula de proteină. Topul celor mai frecvente zece mutații aminoacidice identificate pentru fiecare genă codantă (figura 5) oferă o imagine a hotspoturilor de variabilitate din proteomul viral și completează analiza mutațiilor nucleotidice sinonime și nonsinonime din cadrul genomului, permițând corelarea directă a variabilității genetice cu potențiale consecințe funcționale asupra proteinelor virale și implicit asupra biologiei și epidemiologiei virusului.

Proteinele majore, implicate în recunoașterea de către sistemul imun și în interacțiunea cu celulele gazdei, cum ar fi proteina Spike și nucleocapsida, prezintă acumulări semnificative de mutații aminoacidice recurente cu frecvențe absolute ridicate, ceea ce sugerează modificări funcționale majore ale acestor proteine pe fondul răspândirii rapide a anumitor variante virale.

În paralel, genele ORF1a și ORF1b prezintă și ele câteva mutații frecvente, unele asociate în literatura de specialitate cu modificări în eficiența replicării în celulele-gazdă. Celelalte gene, în general mai scurte și cu roluri mai puțin esențiale în ciclul replicativ, manifestă în anumite poziții mutații cu o frecvență mare, ceea ce ar putea determina anumite avantaje selective legate de evaziunea imună sau de interacțiunea proteinelor virale cu mecanismele antivirale ale gazdei. Unele dintre aceste mutații se asociază cu deleții, cu inserții sau cu codoni stop prematuri, indicând evenimente de trunchiere proteică ce pot altera sau aboli funcții accesorii, fenomen raportat în epidemiologia SARS-CoV-2.

Diferențele mari între gene în ceea ce privește distribuția și frecvența mutațiilor sugerează că peisajul evolutiv al virusului este puternic influențat de rolul funcțional al fiecărei proteine, de gradul de expunere la presiunea imună și de constrângerile structurale impuse de menținerea integrității complexelor proteice.

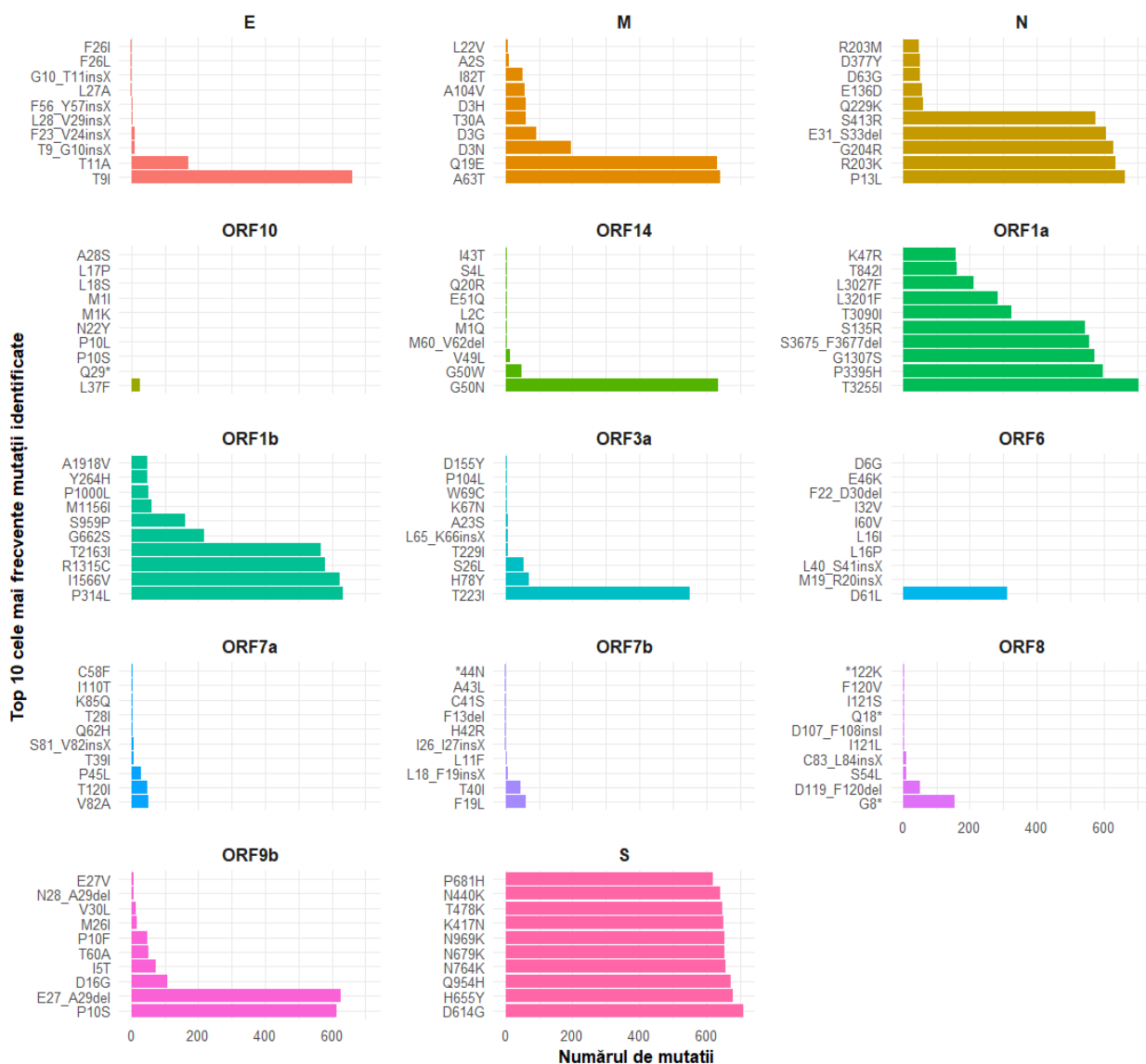


Figura 5. Top 10 cele mai frecvente mutații aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2

Mutații semnificative. Mutațiile cu impact funcțional pot modifica transmisibilitatea, evaziunea imună și răspunsul la terapii, fiind frecvent asociate variantelor de îngrijorare. Cele mai relevante mutații identificate (precum D614G, N501Y, L452R, E484A/K) sunt localizate predominant în proteina Spike și contribuie la creșterea infecțiozității și la reducerea eficienței răspunsului imun. Unele mutații favorizează legarea mai eficientă de receptorul ACE2, iar altele facilitează evadarea de sub acțiunea anticorpilor. De asemenea, mutațiile din proteina N și regiunea ORF1ab sunt implicate în creșterea replicării virale și în adaptarea generală a virusului. În ansamblu, distribuția mutațiilor evidențiază rolul central al proteinei Spike în evoluția SARS-CoV-2 și capacitatea virusului de a se adapta continuu.

Mutații private (mutații specifice genomurilor din Republica Moldova). Acest tip de mutații sunt caracteristice numai pentru tulpinile virusului care circulă pe teritoriul Republicii Moldova și care nu au fost sau au fost extrem de rar detectate în alte țări. Luând în considerare faptul că aceste mutații pot fi rezultatul unei erori de asamblare a genomului, în cadrul acestui studiu au fost analizate numai acele mutații private care au apărut frecvent în secvențele analizate. Astfel, analiza statistică a cazurilor de mutații private evaluate în funcție de varianta OMS a

virusului SARS-CoV-2 a evidențiat o diferență semnificativă în zece mutații private, având valori $p < 0,05$, cele mai des întâlnite fiind interpretate.

Mutațiile private A23048G și T22686C au fost identificate exclusiv în varianta Omicron, cu frecvențe de 10,9% și 13,2%, prezentând diferențe statistic semnificative ($p < 0,05$). Mutațiile A10447G și A10449C au fost detectate predominant în Omicron, dar și în variante recombinante, iar T44C a fost observată atât în Omicron, cât și în forme recombinante.

Cea mai frecventă mutație a fost T9344C (38,2%), localizată în ORF1ab, identificată exclusiv în Omicron și cu semnificație statistică înaltă ($p < 0,001$).

Aceste rezultate evidențiază diversitatea genetică și adaptarea locală a virusului SARS-CoV-2, subliniind necesitatea monitorizării continue pentru evaluarea impactului asupra eficacității vaccinurilor și tratamentelor.

3.4. Dinamica evoluției SARS-CoV-2 și implicațiile asupra scorului de evadare imună RBD

Evoluția continuă a virusului SARS-CoV-2 poate perturba recunoașterea virusului de către imunitatea mediată de anticorpi la om. Pentru evaluarea rolului substituțiilor aminoacidice în legarea proteinei RBD a virusului SARS-CoV-2 de receptorul ACE2 al gazdei a fost efectuată analiza dinamicii moleculare a virusului în complex cu ACE2 uman și caracterizarea influenței diferitor mutații asupra stabilității complexului proteic, iar în vederea determinării dependenței tuturor mutațiilor aminoacizilor din RBD care evită legarea cu fiecare anticorp a fost analizat arborele filogenetic al virusului SARS-CoV-2.

În urma analizei arborelui filogenetic al virusului SARS-CoV-2 (figura 6), construit în funcție de scorul de afinitate ACE2, s-a observat o tendință de creștere a acestuia la tulpinile cu cel mai mare număr de mutații. Astfel, scorul de afinitate ACE2 crește la probele cu 60-80 de mutații, cu vârful de creștere în regiunea 120-130 de mutații.

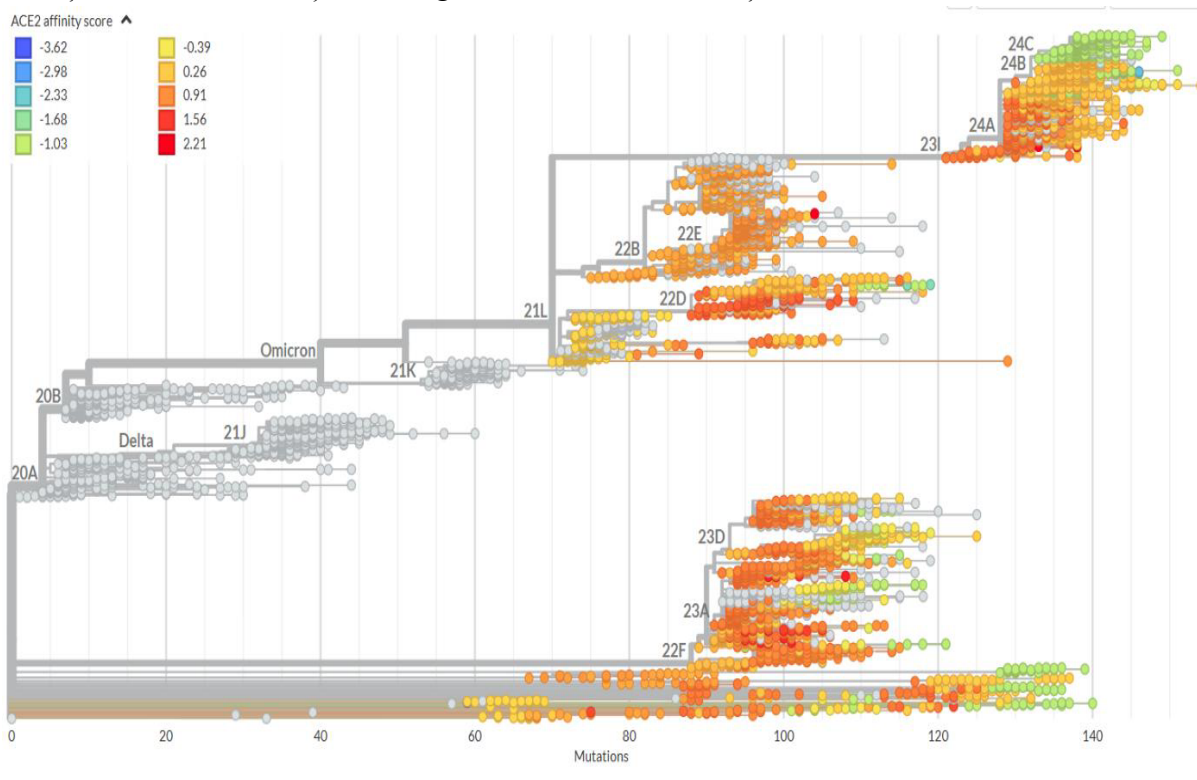


Figura 6. Arborele filogenetic al izolatelor SARS-CoV-2 în funcție de scorul de afinitate ACE-2

Conform graficului, se observă o creștere bruscă a scorului de afinitate ACE2 la varianta Omicron în comparație cu varianta Delta (21I, 21J) și o tendință clară de creștere a acestuia la subliniile variantei Omicron, ceea ce se explică prin faptul că virusul a devenit mai contagios. Din cladele variantei Omicron un scor de afinitate ACE2 scăzut a fost determinat pentru cladele 24B și 24C, moderat scăzut pentru cladele 21L, 22B, 24E, 24G și moderat crescut pentru cladele 23A și 23D.

Rezultatele obținute arată că legarea la ACE2 este o caracteristică extrem de evolutivă. În aproape toate cazurile în care RBD se leagă de un anumit ACE2, există mutații aminoacidice care o îmbunătățesc de câteva ori. Faptul că legarea la ACE2 poate fi ușor sporită de mutație a fost observat la apariția diferitor sublinii ale variantei Omicron, caracterizată prin numeroase mutații în genomul său.

Un aspect crucial în monitorizarea evoluției SARS-CoV-2 este identificarea evenimentelor de recombinare genetică, deoarece acestea pot duce la apariția unor noi tulpini virale cu virulență și caracteristici alterate. În patru din probele investigate a fost identificat ARN viral recombinant, dar nu a fost observată vreo modificare a scorului de afinitate ACE2 și eventual fără consecințe epidemiologice.

În urma analizei scorului de evadare imună RBD în funcție de dinamica evoluției virusului SARS-CoV-2 (figura 7) s-a constatat o dependență clară între evoluția virusului și apariția de noi variante de la indicatorul de evadare imună.

Astfel, în cladele 21I, 22A, 22B, 22C, 22D, 22E indicatorul de evadare imună a variat de la 0 la 1,0. Spectrul de evadare de la răspunsul imun provocat de mutații s-a schimbat semnificativ în timp. În special, indicatorul de evadare imună RBD a început să crească la variantele din cladele 22F, 23A, 23B, 23C, 23D, 23E, 23F, 23G, 23H, atingând un scor de evadare imună RBD de la 1,0 la 1,4. La variantele 23I, 24A, 24B, 24C, 24E, 24G și la cea recombinantă, scorul de evadare imună RBD a înregistrat valori în intervalul de la 1,4 la 1,962.

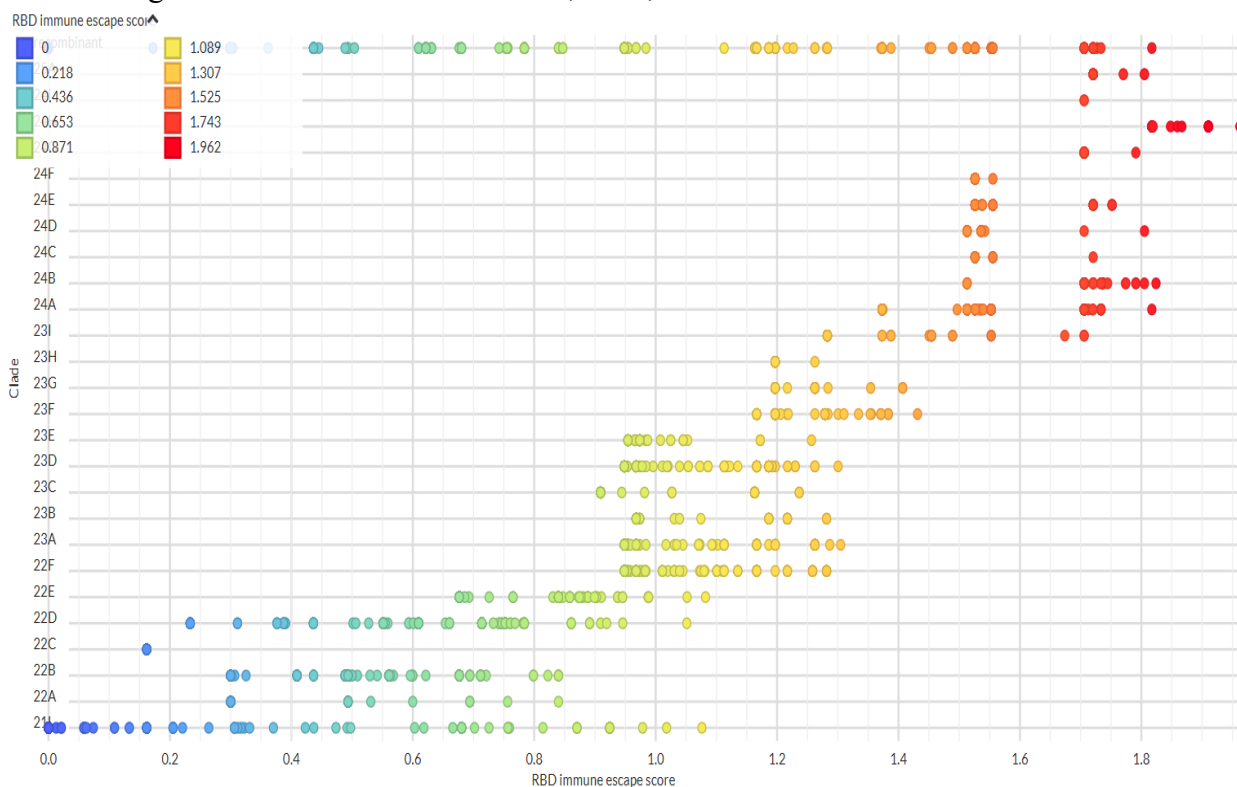


Figura 7. Scorul de evadare imună RBD în funcție de dinamica evoluției virusului SARS-CoV-2

Analiza scorului de evadare imună RBD în funcție de dinamica evoluției virusului SARS-CoV-2 a arătat că atât evitarea răspunsului imun, cât și afinitatea pentru legarea la ACE2 corelează independent cu frecvența mutațiilor. Este de remarcat faptul că evitarea răspunsului imun a prezentat cei mai mari coeficienți (punctele colorate în toate nuanțele de roșu în figură 7) în cladele 24A, 24B, 24C, 24E, 24G care includ liniile JN.1, JN.1.11.1, KP.2.3, KP.3, KP.3.1.1.

Aceste linii au circulat pe teritoriul Republicii Moldova în 2024 și confirmă observația că subvariantele recente ale variantei Omicron au prezentat o rată mai mare de evaziune de la anticorpi, în comparație cu variantele anterioare ale virusului SARS-CoV-2.

4. MONITORIZAREA GENETICĂ A VIRUSULUI SARS-CoV-2 ÎN APELE UZATE PRIN SECVENȚIEREA ÎNTREGULUI GENOM

4.1. Supravegherea genomică a SARS-CoV-2 în apele uzate ca alternativă de monitorizare a evoluției virusului în Republica Moldova

Supravegherea genomică a virusului SARS-CoV-2 în apele uzate reprezintă o premieră pentru Republica Moldova și oferă o alternativă în supravegherea circulației virusului SARS-CoV-2 în populația umană și, respectiv, în realizarea cercetărilor științifice ulterioare cu privire la circulația virusului pe teritoriul republicii. Utilitatea investigării probelor de mediu este evidentă într-un context în care testarea individuală pentru COVID-19 a devenit sporadică și inconsistentă odată cu încetarea pandemiei, iar oboseala pandemică și scăderea interesului populației față de măsurile de sănătate publică se resimt tot mai accentuat. Se cere subliniat faptul că deși calitatea datelor de secvențiere a genomului SARS-CoV-2 obținute din probele de ape uzate a fost scăzută, din cauza diluției ridicate și a deteriorării mecanice a virusului în apă, acestea au fost acceptabile pentru rularea instrumentului Freyja și identificarea liniilor virale.

În urma analizei probelor de ape uzate secvențiate în anul 2024 au fost identificate 32 de linii genetice corespunzătoare sistemului de clasificare Pango Lineages, utilizat la nivel global pentru monitorizarea evoluției virusului SARS-CoV-2. Printre liniile identificate s-au regăsit următoarele: A.12, AZ.4, AZ.5, B.1.1.243, B.1.1.305, B.1.1.357, B.1.1.363, B.1.1.374, B.1.104, B.1.160.32, B.1.177.25, B.1.177.66, B.1.289, B.1.292, B.1.411, B.1.420, B.1.431, B.1.539, B.1.579, B.10, B.6, B.6.1, B.6.3, B.6.4, B.6.5, B.6.6, B.6.8, XT, JN.1.1.1, AE.4, B.1.1.45, B.11.

Variantele identificate, precum și abundența acestora în timp, sunt reprezentate pe graficul din figura 8. În acest grafic, axa Y reprezintă prevalența sau proporția fiecărei variante de mutație a virusului SARS-CoV-2 în numărul total de secvențe analizate pentru luna corespunzătoare probei (valori de la 0 până la 1). Pe axa X este notată luna de colectare a probei (sept.: septembrie, oct.: octombrie, nov.: noiembrie) când concentrațiile virusului în apele uzate au fost ridicate, cu valori Ct până la 35 din rezultatele investigării acestor probe prin reacția RT-PCR, și pentru care a fost posibilă reacția de secvențiere. Modificările prevalenței și variației mutațiilor relevate indică dinamica temporală a liniilor genetice identificate în probele analizate (verde – probe de ape uzate, roz – probă umană utilizată ca control pozitiv).

Analiza dinamicii în timp a abundenței liniilor virale a permis determinarea și urmărirea variantelor persistente pe parcursul celor trei luni când concentrațiile virale în apele uzate au fost crescute (B.1.177.66), dar și a celor dominante doar în anumite perioade (B.1.1.243, B.1.160.32 și B.1.1.305). Conform datelor din literatura de specialitate, unele linii identificate (B.11) ale virusului SARS-CoV-2 nu mai sunt în circulație la nivel global, ceea ce ar putea sugera fie o persistență endemică locală, fie o reintroducere izolată, ambele scenarii evidențiind necesitatea

continuării supravegherii genomice pentru a înțelege mai bine fenomenele de reapariție a variantelor aparent dispărute ale virusului SARS-CoV-2 din circulația globală.

Fiecare grafic individual din figura 8 reprezintă dinamica unei linii care a circulat în toamna anului 2024 în mun. Chișinău. Pe axa x sunt notate lunile de colectare a probelor de ape uzate (septembrie, octombrie și noiembrie 2024), iar pe axa y – abundența fiecărei variante în probele analizate (0-1). Astfel, printre cele mai abundente linii genetice detectate se numără B.1.177.66; B.1.1.243; B.1.160.32; B.1.1.305 s.a. Prima predomină în mod repetat și în mai multe probe sugerând o circulație intensă a acestei variante în capitala Republicii Moldova, iar celelalte înregistrează o abundență înaltă doar în anumite perioade de timp.



Figura 8. Abundența și dinamica în timp a liniilor de SARS-CoV-2 identificate în probele de ape uzate colectate în mun. Chișinău în perioada septembrie - noiembrie 2024

Cea mai mare pondere la data specificată (aprox. 80 %) au avut-o variantele B.11 și B.1.1.45 (figură 9). Conform platformei outbreak.info, linia B.11 a fost detectată în cel puțin 21 de țări, în special din vestul Europei, în India și pe continentul nord-american, fiind însă mai puțin întâlnită în Europa de Est. Un aspect interesant este și faptul că această variantă virală a circulat la etapele anterioare ale pandemiei, iar prezența sa în apele uzate din mun. Chișinău în octombrie și în noiembrie 2024 poate reflecta fie cazuri izolate, fie un proces de circulație endemică la scară redusă. Această observație subliniază importanța continuării monitorizării genomice a virusului

SARS-CoV-2 inclusiv pentru a identifica posibile reintroduceri ale unor variante care par să fi dispărut din circulația globală.

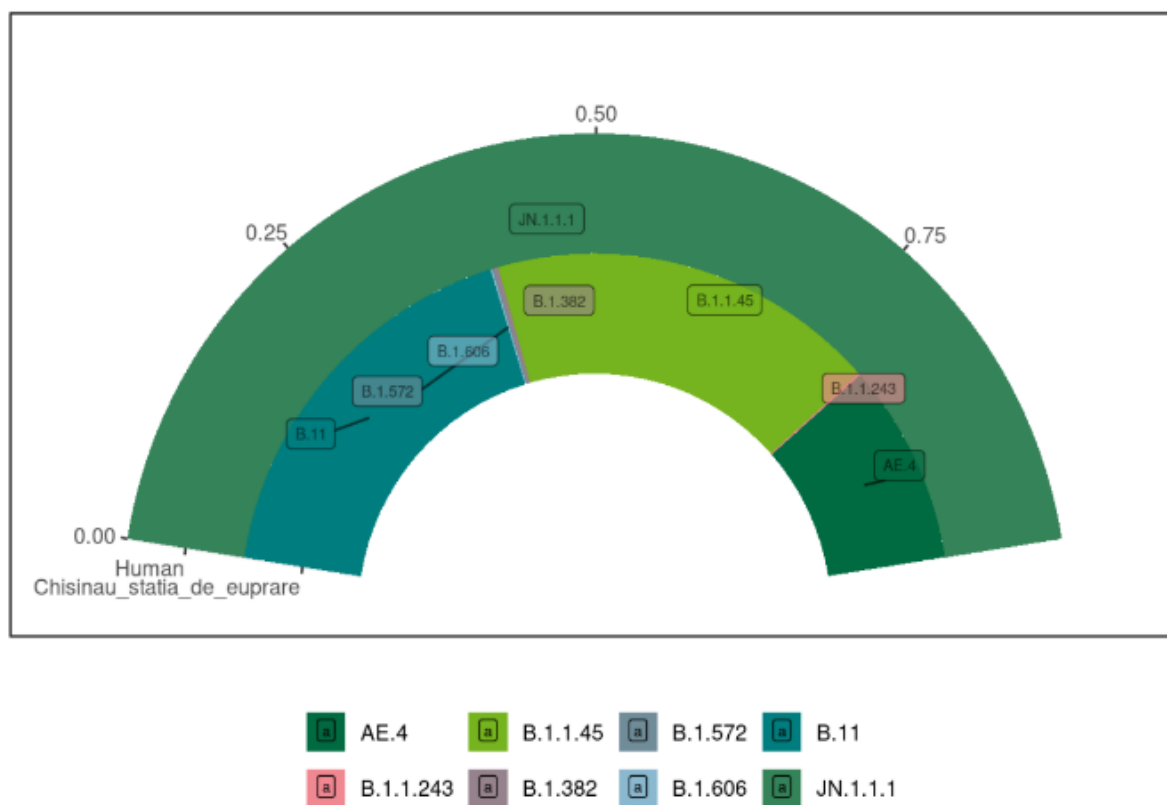


Figura 9. Cele mai recente linii genetice ale virusului SARS-CoV-2 identificate în apele uzate în comparație cu proba umană

Datele genomice ale probelor secvențiate în anul 2025, dintre care nouă probe au fost ape uzate (S5-S14) șase probe de material clinic uman (S15-S20), utilizate ca probe de referință (probe de control), au prezentat, de asemenea, o abundență scăzută, ceea ce a complicat procesul de analiză bioinformatică. În pofida impedimentelor, a fost posibilă identificarea subliniilor circulante și cuantificarea variantelor SARS-CoV-2.

Conform datelor obținute, creșterea concentrației ARN-ului SARS-CoV-2 în apele uzate corelează cu creșterea numărului de cazuri de infectare în mun. Chișinău, ceea ce a fost posibilă secvențierea probelor prelevate în perioada caldă a anului, când numărul de cazuri de COVID-19 a început să crească pe teritoriul Republicii Moldova.

Conform datelor din figura 10, în perioada iunie-august 2025, liniile predominante ale virusului SARS-CoV-2 au fost AY.57, BA.3, BF.22, NS.3, NT.1, XFG.12, XP, XFG.5, XFG.4, ceea ce este în concordanță cu datele Organizației Mondiale a Sănătății pentru perioada respectivă.

Analiza datelor obținute a demonstrat că prin secvențierea apelor uzate se pot identifica genotipurile tulpinilor virale SARS-CoV-2 din mun. Chișinău, în special cele care nu au fost încă detectate prin secvențierea probelor clinice din cauza adresabilității reduse a pacienților în perioada postpandemică. Printr-o prelevare mai intensivă a probelor de ape uzate, această abordare poate evidenția și modelele de distribuție virală în cadrul comunităților, contribuind la înțelegerea mecanismelor de transmitere și de răspândire a bolilor infecțioase în timpul epidemiilor. Cel mai important, rezultatele obținute indică faptul că secvențierea apelor uzate poate detecta genotipuri noi apărute de SARS-CoV-2 și alte virusuri patogene la scară populațională.

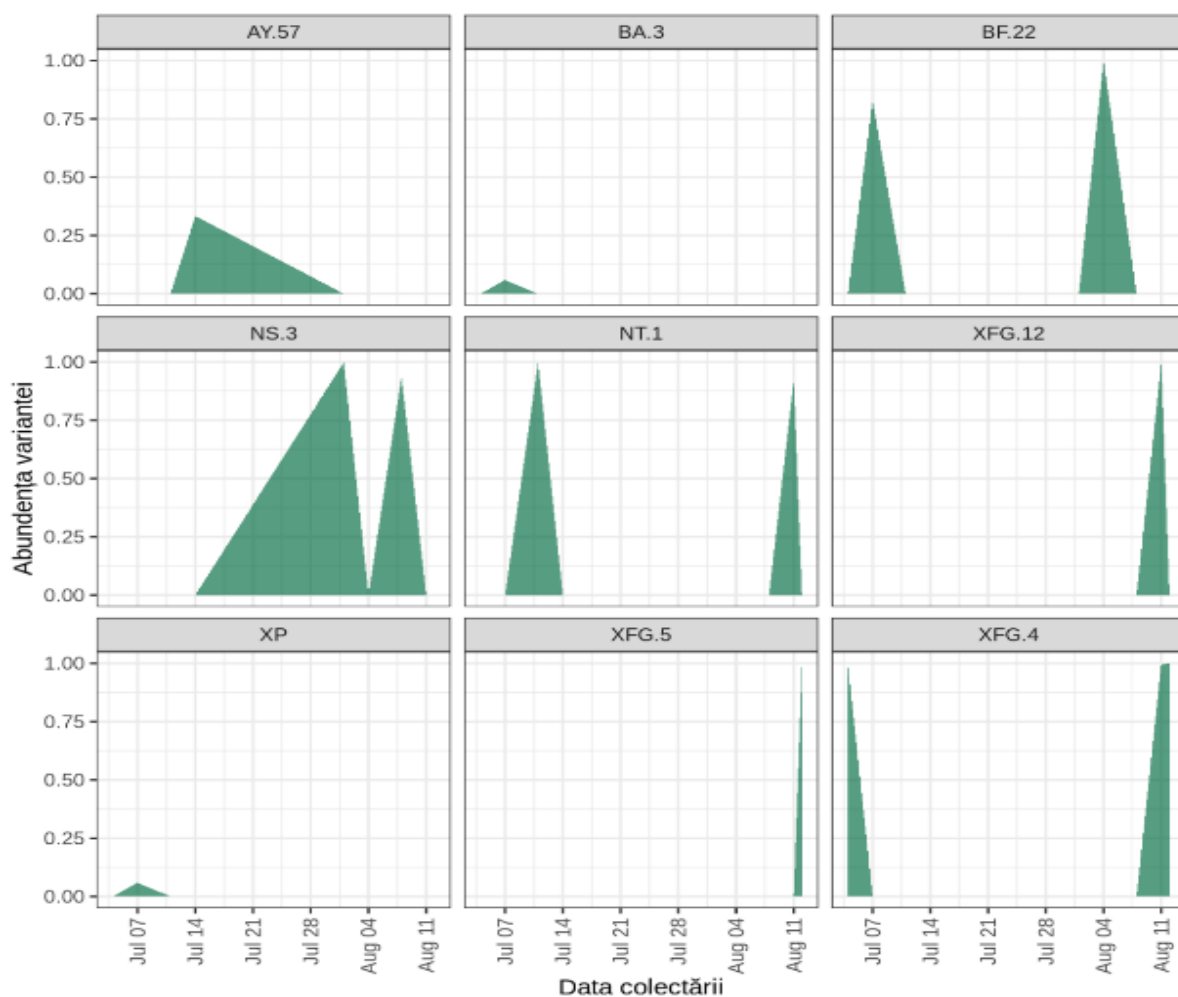


Figura 10. Abundența și dinamica în timp a liniilor de SARS-CoV-2 identificate în probele de ape uzate din mun. Chișinău în perioada iunie-august 2025

4.2. Analiza comparativă a performanței instrumentelor Freyja și Kallisto pentru estimarea abundenței liniilor SARS-CoV-2 în contextual monitorizării apelor uzate

În apele uzate virusul SARS-CoV-2 este foarte dizolvat și deteriorat sub acțiunea diferitor agenți chimici, înregistrând, drept urmare, concentrații virale foarte joase. În acest context, pentru analiza și interpretarea secvențelor obținute la procesarea probelor de ape uzate este nevoie de instrumente veridice și speciale pentru analiza bioinformatică a datelor.

Pentru evaluarea performanței instrumentelor Freyja și Kallisto, care reprezintă metode de analiză și de interpretare a datelor de secvențiere a probelor de ape uzate, a fost realizat un studiu comparativ al acestora. În acest scop a fost utilizat un set de date sintetice din 42 de secvențe metagenomice din ape uzate cu compoziții cunoscute de linii genetice. Setul de date a inclus 11 linii genetice ale virusului SARS-CoV-2: Alpha, Beta, Delta, Epsilon, Eta, Gamma, Iota, Kappa, Lambda, Theta și Zeta. Fiecare probă a prezentat aproximativ 1 092 761 de citiri, aliniate la genomul de referință SARS-CoV-2 NC_045512.2 (tulpina Wuhan-Hu-1).

Compoziția fiecărui amestec de probe a fost realizată artificial și concepută pentru a crea un gradient de abundențe de linii genetice în întregul set de date. Probele 1-10 au conținut o linie dominantă, în special Epsilon, la abundențe cuprinse între 90 % și 98 %; probele 11-21 au reprezentat perioade de tranziție cu linii mixte Alpha și Epsilon; probele 22-30 au conținut amestecuri de Alpha și de Delta, reprezentând apariția variantei Delta, iar probele 31-42 au fost

dominate de varianta Delta la abundențe care depășeau 96 %. Acest design a permis testarea performanței instrumentelor Freyja și Kallisto la toate nivelurile de abundență, de la urme sub 0,1% până la linii dominante peste 90 %.

Analiza comparativă a ambelor instrumente a demonstrat corelații generale puternice între abundențele prezise și cele reale, dar cu profiluri de precizie semnificativ diferite. Instrumentul Freyja a înregistrat performanțe excepționale cu indicele statistic R^2 de 0,9793, explicând 97,9 % din variația datelor reale (figura 11), iar corelația Pearson a atins un r egal cu 0,9899 cu o valoare p mai mică de $2,76 \times 10^{-292}$, indicând o relație liniară extrem de puternică. Eroarea absolută medie a fost de doar 0,644 %, ceea ce înseamnă că predicțiile tipice s-au abătut de la valorile reale cu mai puțin de un punct procentual. Eroarea medie pătratică de 3,771 % a indicat că au apărut erori ocazionale mai mari, dar care au rămas limitate. Aceste valori au fost calculate pe parcursul a 344 de comparații de linii genetice după filtrarea măsurătorilor în care atât abundențele reale, cât și cele prezise au fost sub 0,001%.

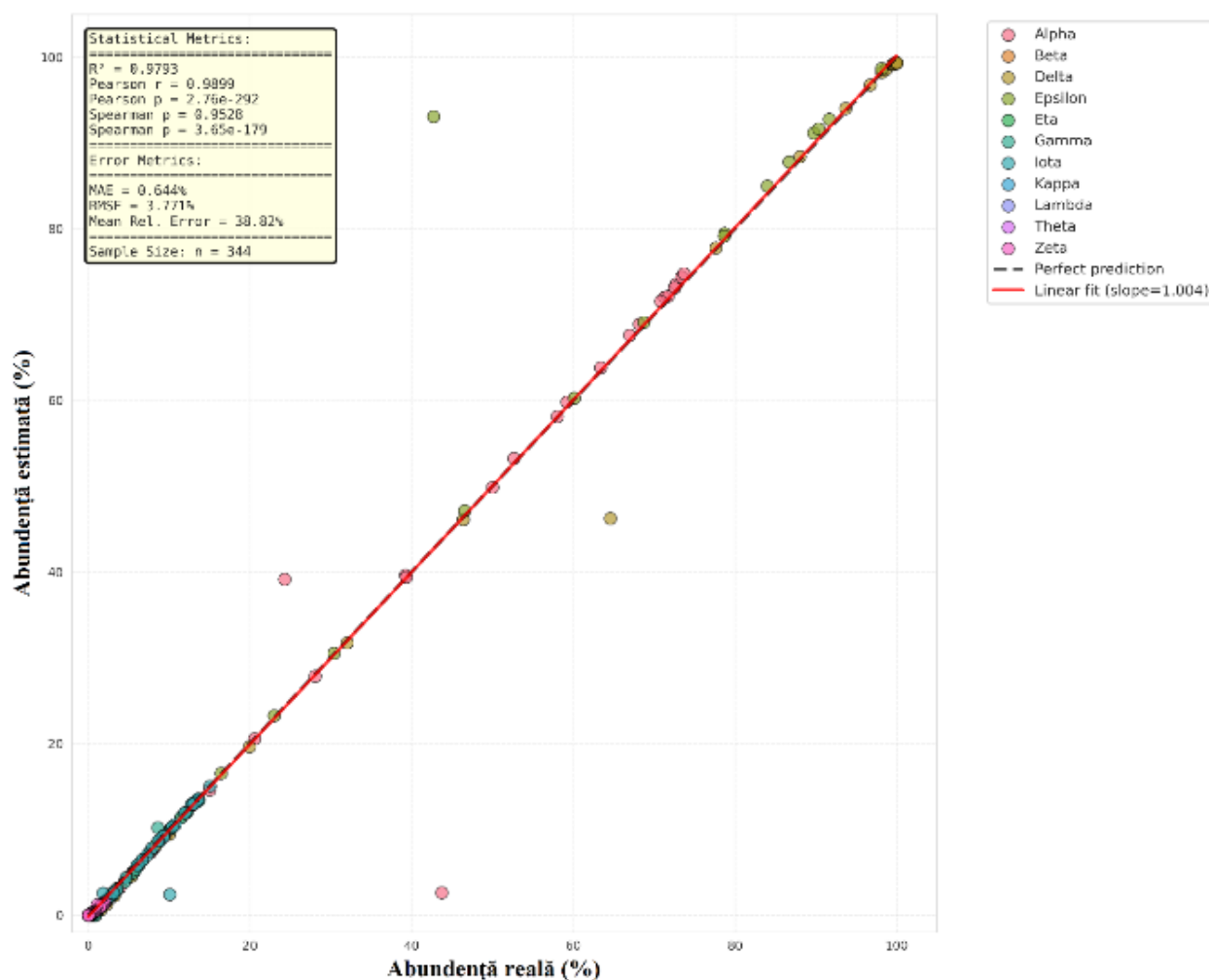


Figura 11. Performanța instrumentului Freyja. Semnificația statistică a abundențelor prezise și reale în funcție de varianta genetică a SARS-CoV-2

Pentru a demonstra calitatea rezultatelor obținute cu instrumentul Freyja în monitorizarea apelor uzate, a fost analizată harta termică a erorilor de predicție a acestui instrument (figura 12), pe care casețele albe indică că eroarea de predicție a instrumentului nu este semnificativă (<1 %) față de rezultatul așteptat. Așadar, instrumentul Freyja are cea mai mare precizie în identificarea abundenței relative a liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2.

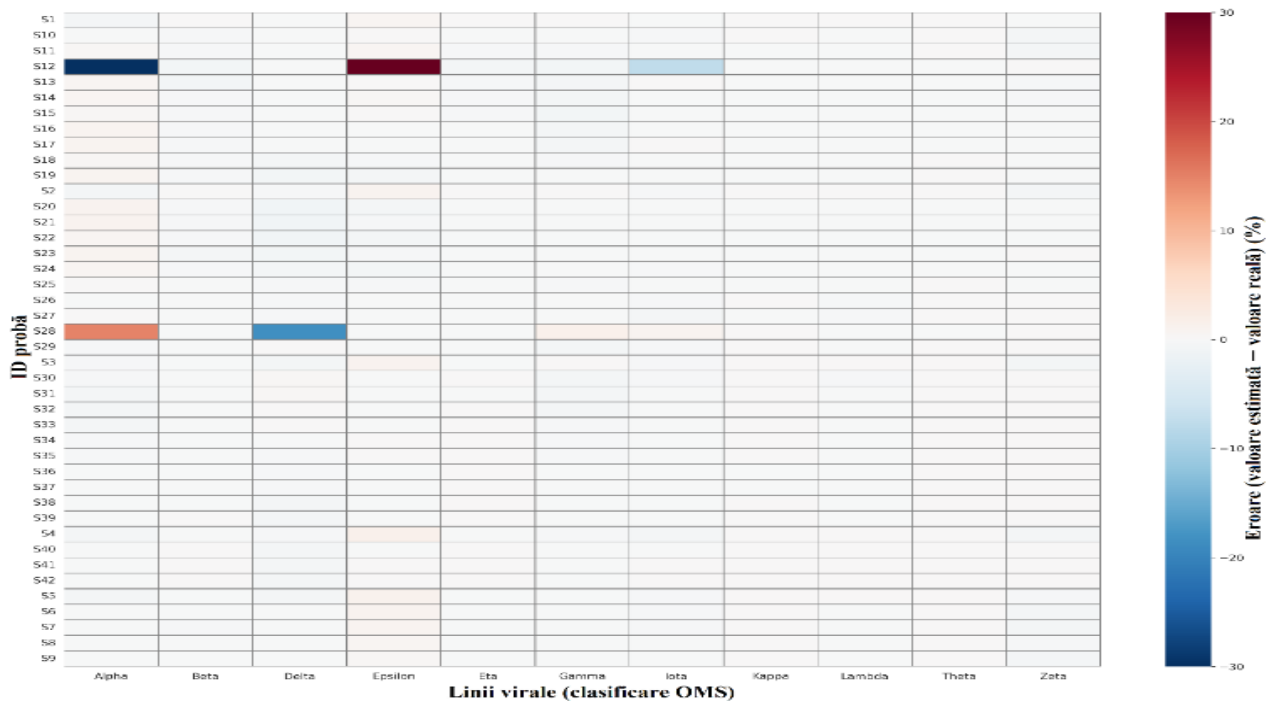


Figura 12. Harta termică (heatmap) a erorilor de predicție a instrumentului Freyja

Instrumentul Kallisto de asemenea a demonstrat o performanță bună, dar cu o precizie substanțial mai mică decât instrumentul Freyja, obținând un R^2 de 0,853 și explicând 85,3 % din variația abundențelor reale. Corelația Pearson a atins un r egal cu 0,950, cu o valoare p mai mică de $7,04 \times 10^{-213}$, reprezentând în continuare o relație liniară foarte puternică. Cu toate acestea, eroarea absolută medie a fost de 4,48 puncte procentuale, de aproximativ șapte ori mai mare decât cea a instrumentului Freyja. Eroarea medie pătratică a atins 9,28 puncte procentuale, fiind substanțial crescută în comparație cu MAE și indicând faptul că erorile ocazionale foarte mari au influențat semnificativ rezultatul. Aceste rezultate au cuprins toate cele 420 de comparații din cele 42 de probe și zece linii genetice ale SARS-CoV-2 conform OMS (figura 13).

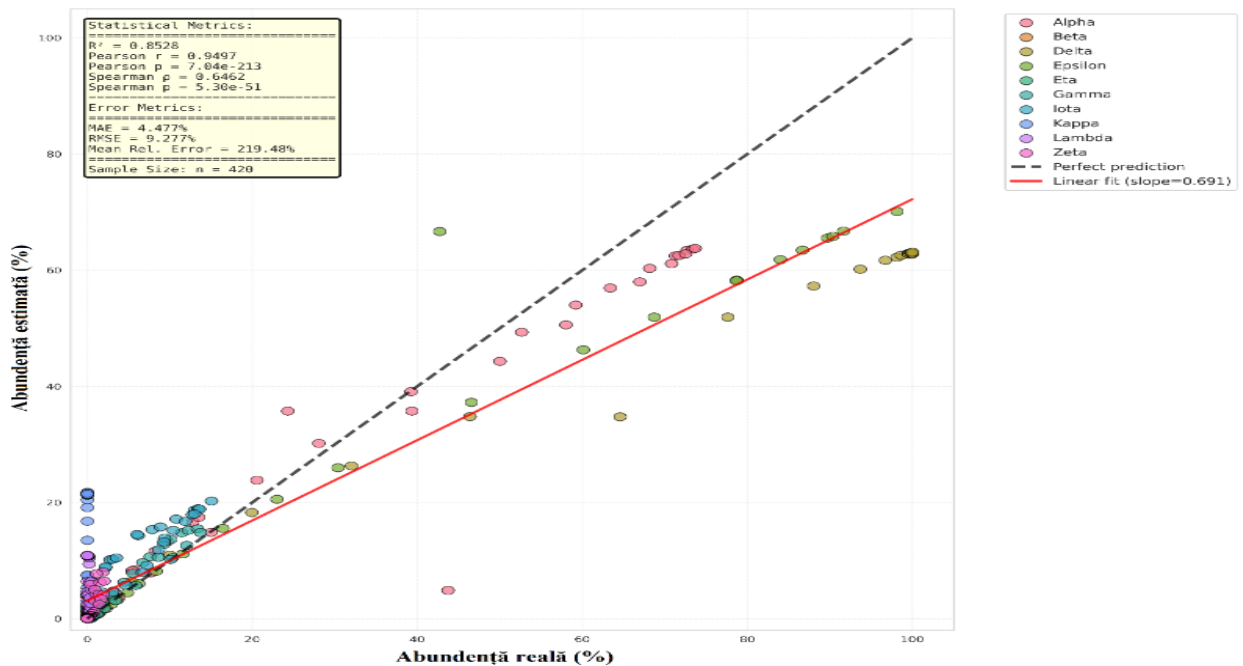


Figura 13. Performanța instrumentului Kallisto în determinarea semnificației statistice a abundențelor prezise și reale în funcție de varianta genetică a SARS-CoV-2

Performanța instrumentului Kallisto pentru fiecare variantă a virusului SARS-CoV-2 a evidențiat o diseminare puternică și vizibilă pentru multe variante. Semnificația statistică a abundențelor prezise și reale în funcție de varianta genetică a virusului SARS-CoV-2 a evidențiat că estimările abundenței relative a variantelor Alpha ($R^2 = 0,9230$), Delta ($R^2 = 0,7750$), Epsilon ($R^2 = 0,8882$), Gamma ($R^2 = 0,8622$) au fost apropiate de abundențele relative reale, fiind subestimate pentru celelalte variante (Beta, Eta, Iota, Kappa, Lambda, Zeta): abundența relativă a variantei Beta a fost foarte slabă ($R^2=0,248$), iar a variantei Zeta – negativă ($R^2=-10$) (vezi Anexa 12). Punctele colorate pentru fiecare variantă genetică foarte des sunt îndepărtate de linia de predicție (valori așteptate), ceea ce dovedește că acest instrument sistematic subestimează sau supraestimează valorile abundenței. Acest fapt demonstrează performanța mult mai joasă a instrumentului Kallisto în comparație cu instrumentul Freyja.

Harta termică a erorilor de predicție a instrumentului Kallisto (figura 14) diferă semnificativ de cea a instrumentului Freyja (figura 12). Aceste grafice arată erorile pentru fiecare probă în funcție de varianta genetică, dreptunghiurile colorate în roșu și în albastru demonstrează eroarea de predicție >15%.

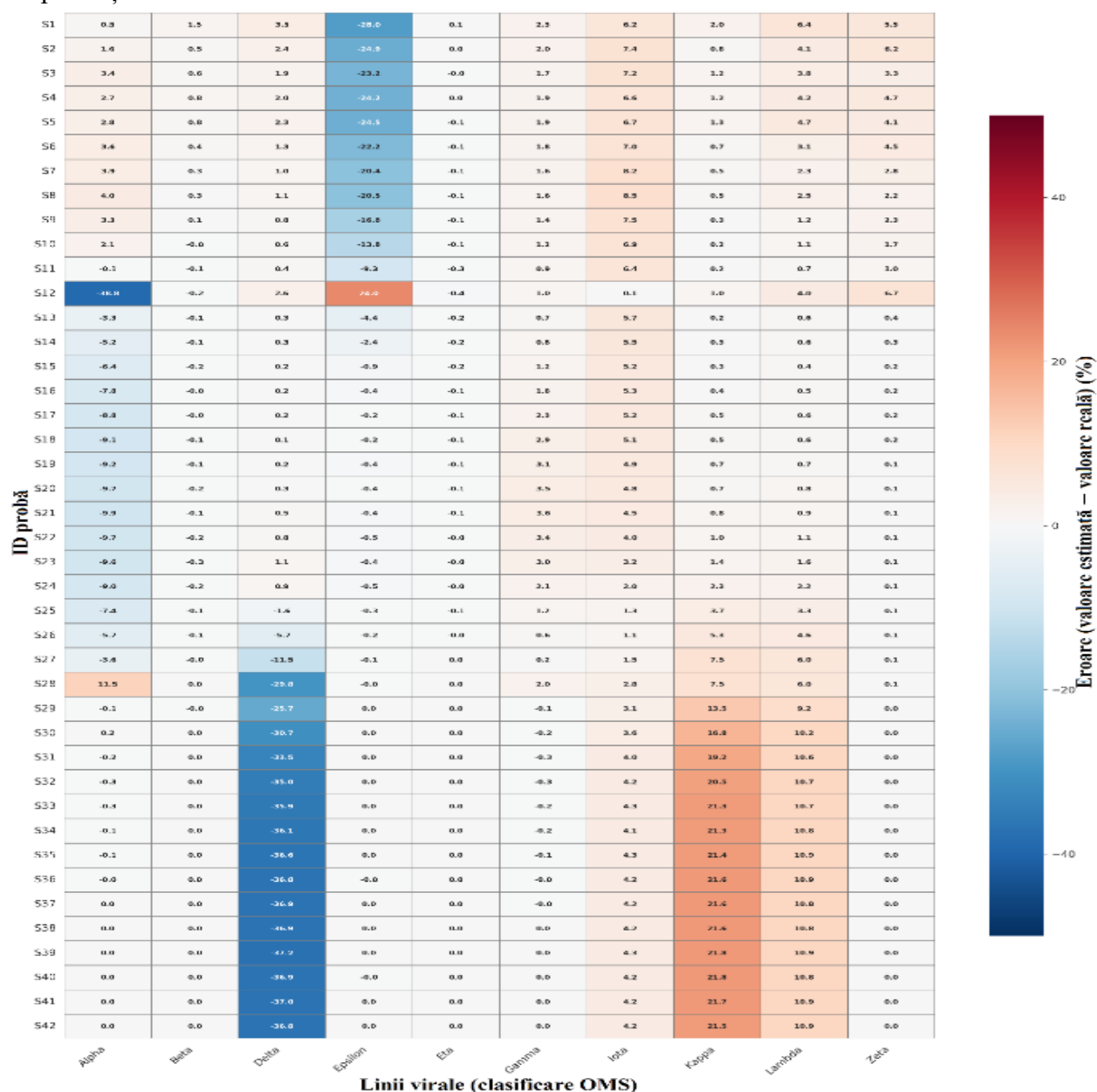


Figura 14. Harta termică (heatmap) a erorilor de predicție a instrumentului Kallisto

Harta termică a erorilor de predicție a instrumentului Kallisto este foarte colorată, coloane întregi au erori sistematice. Varianta Delta în probele 28-42 este colorată în albastru, ceea ce demonstrează o eroare de predicție >25% și, deci, subestimată. Varianta Kappa reprezintă valori crescute pentru probele 29-42, având erori de predicție sistematice >13 %. La fel, variantele Alpha, Epsilon și Lambda demonstrează erori de predicție > 9 %, ajungând până la 38 în proba 12.

Corelația de rang Spearman a relevat o distincție importantă între instrumentele Freyja și Kallisto. Instrumentul Freyja a obținut un ρ egal cu 0,953, indicând o conservare excelentă a ordonării rangului chiar și pentru relații neliniare. Instrumentul Kallisto a obținut un ρ Spearman substanțial mai mic – 0,646, dovadă că instrumentul se luptă mai mult cu menținerea ordonării relative corecte a liniilor genetice, în special la abundențe scăzute, unde diferențele absolute mici se traduc în schimbări mari de rang.

Astfel, analiza comparativă a acestor două instrumente bioinformatică a demonstrat o precizie mai mare a instrumentului Freyja pentru monitorizarea mutațiilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 identificate în apele uzate și pentru predicția valurilor epidemice.

CONCLUZII GENERALE

1. Caracterizarea filogenetică a izolatelor SARS-CoV-2 din Republica Moldova a evidențiat succesiunea variantelor Delta și Omicron, precum și înlocuirea progresivă a variantei Delta de către subliniile Omicron. Identificarea a 21 de clade, dintre care 21L, 22B, 22E, 23A, 23D și 24A au avut un rol evolutiv major, ceea ce confirmă integrarea tulpinilor locale în structura filogenetică globală și evidențiază particularități regionale de circulație virală.
2. Analiza evoluției genomice a virusului SARS-CoV-2 a demonstrat o dinamica evolutivă accelerată a SARS-CoV-2, exprimată prin acumularea progresivă a mutațiilor, în special în regiunile asociate proteinei Spike. Comparativ cu varianta Delta, varianta Omicron a demonstrat un nivel semnificativ mai ridicat de diversificare genomică, caracterizat prin acumularea a aproximativ 140–150 de mutații per genom, față de circa 40 de mutații per genom în cazul variantei Delta.
3. Evaluarea tipurilor de mutații a evidențiat predominanța modificărilor genetice cu impact funcțional, în special a mutațiilor nonsinonime, care depășesc semnificativ mutațiile sinonime. Această distribuție indică un proces de selecție pozitivă, asociat cu adaptabilitatea virală, creșterea transmisibilității și potențialul de evadare imună, având implicații directe asupra diagnosticului molecular și supravegherii variantelor emergente.
4. Integrarea datelor genomice cu cele epidemiologice a demonstrat asocierea dintre emergența variantelor SARS-CoV-2 și intensificarea procesului epidemic în Republica Moldova. Tranziția de la varianta Delta la Omicron a coincis cu creșteri ale incidenței și cu formarea valurilor epidemice, confirmând rolul diversității genotipice în modelarea evoluției epidemiologice a COVID-19 și evidențiind necesitatea consolidării supravegherii genomice pentru fundamentarea intervențiilor de sănătate publică.
5. Monitorizarea SARS-CoV-2 în apele uzate din municipiul Chișinău a fost validată ca metodă complementară, sensibilă și precoce de supraveghere epidemiologică. Această abordare a permis evidențierea variantelor circulante și anticiparea tendințelor evolutive ale infecției, constituind o contribuție originală la dezvoltarea supravegherii integrate de mediu și sănătate publică, subliniind totodată necesitatea adaptării continue a metodelor de diagnostic molecular în contextul variabilității genetice a virusului.

6. Rezultatele obținute fundamentează necesitatea implementării unui model național de supraveghere integrată a SARS-CoV-2, bazat pe corelarea datelor genomice, epidemiologice și de mediu. Acest model contribuie la identificarea precoce a variantelor emergente, anticiparea tendințelor epidemice și consolidarea unui sistem de sănătate publică predictiv, rezilient și orientat spre decizii bazate pe dovezi.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Dezvoltarea și implementarea unui sistem integrat de supraveghere genomică a SARS-CoV-2, bazat pe monitorizarea continuă a tulpinilor circulante și corelarea datelor genomice cu cele clinice și epidemiologice, cu partajarea sistematică a datelor pe platforme internaționale (ex. GISAID), în vederea fundamentării strategiilor de sănătate publică, optimizării intervențiilor terapeutice și profilactice și creșterii eficienței sistemului de sănătate.
2. Consolidarea capacităților naționale de secvențiere genomică, prin elaborarea și implementarea unei strategii și a unui plan național care să includă dezvoltarea infrastructurii, resurselor umane și cadrului normativ, precum și integrarea în practica de rutină a metodelor inovative, inclusiv supravegherea genomică în apele uzate, pentru monitorizarea circulației virale și anticiparea tendințelor epidemiologice.
3. Valorificarea rezultatelor cercetării și asigurarea continuității investigațiilor științifice, prin extinderea supravegherii genomice asupra altor agenți patogeni de importanță pentru sănătatea publică și integrarea metodelor avansate de analiză bioinformatică, în scopul dezvoltării unui sistem de sănătate publică predictiv, rezilient și orientat spre decizii bazate pe dovezi.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Souza F, Spilki FR, Tanuri A, Michel RP, Campos FS. Two years of SARS-CoV-2 Omicron genomic evolution in Brazil (2022–2024): subvariant tracking and assessment of regional sequencing efforts. *Viruses*. 2025;17(1):64. Disponibil la <https://www.mdpi.com/1999-4915/17/1/64>; <https://doi.org/10.3390/v17010064>.
2. World Health Organization. WHO coronavirus (COVID-19) dashboard. 2025. Disponibil la: <https://covid19.who.int/>.
3. Kadio KJJO, Gnimadi TAC, Guichet E, et al. Assessing the long-term persistence of SARS-CoV-2 in Guinea: insights from post-epidemic sentinel syndromic surveillance data. *Front. Epidemiol.* 2025; 5:1636286. doi: 10.3389/fepid.2025.1636286.
4. World Health Organization. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. Geneva: World Health Organization; 2023.
5. Peacock TP, Penrice-Randal R, Hiscox JA, Barclay WS. SARS-CoV-2 one year on: evidence for ongoing viral adaptation. *J Gen Virol.* 2021;102(4):001584. doi: 10.1099/jgv.0.001584. PMID: 33855951; PMCID: PMC8290271.
6. Markov PV, Katzourakis A, Stilianakis NI. Antigenic evolution will lead to new SARS-CoV-2 variants with unpredictable severity. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20(5):251–252. doi:10.1038/s41579-022-00722-z.
7. Flemming A. Omicron, the great escape artist. *Nat Rev Immunol.* 2022; 22(2):75. doi:10.1038/s41577-022-00692-3.
8. Planas D, Saunders N, Maes P, et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature.* 2021. Disponibil la: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-04389-z;doi:10.1038/s41586-021-04389-z>.

9. Cao Y, Wang J, Jian F, Xiao T, Song W, Yisimayi A, et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*. 2022; 602(7898):657–663. doi:10.1038/s41586-021-04388-0.
10. Bushman M, Kahn R, Taylor BP, Lipsitch M, Hanage WP. Population impact of SARS-CoV-2 variants with enhanced transmissibility and/or partial immune escape. *Cell*. 2021; 184(26):6229–6242.e18. doi:10.1016/j.cell.2021.11.026.
11. **Colac S**, Sitnic V, Burduniuc O. Genomic monitoring of SARS-CoV-2 variants in the Republic of Moldova. *Arta Medica*. 2025. Disponibil la: <https://artamedica.md/index.php/artamedica/article/view/384>.
12. Holmes EC. The emergence and evolution of SARS-CoV-2. *Annu Rev Virol*. 2024; 11(1):21–42. doi:10.1146/annurev-virology-093022-013037.
13. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov*. 2021; 20(11):817–838. doi:10.1038/s41573-021-00283-5.
14. Chen Z, Azman AS, Chen X, et al. Global landscape of SARS-CoV-2 genomic surveillance and data sharing. *Nat Genet*. 2022; 54(4):499–507. doi:10.1038/s41588-022-01033-y.
15. Holmes EC. COVID-19: lessons for zoonotic disease. *Science*. 2022; 375(6585):1114–1115. doi:10.1126/science.abn2222.
16. Meira DD, Zetum ASS, Casotti MC, da Silva DRC, de Araujo BC, Vicente CR, et al. Bioinformatics and molecular biology tools for diagnosis, prevention, treatment and prognosis of COVID-19. *Heliyon*. 2024; 10(14):e35746. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e35746.
17. **Colac S**, Burduniuc O, Apostol M, Druc A. Genetic significance and tracking of circulating SARS-CoV-2 variants in the Republic of Moldova. *Rom Arch Microbiol Immunol*. 2024; 83(3):148–154. doi:10.54044/RAMI.2024.03.02.
18. **Colac S**, Burduniuc O, Apostol M. Monitorizarea infecției COVID-19 prin secvențierea întregului genom și analiza filogenetică a izolatelor SARS-CoV-2. *Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. Chișinău; 2022. p. 164. Disponibil la: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/206061.
19. **Colac S**, Burduniuc O, Apostol M. Whole-genome sequencing of COVID-19 infection and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 isolates. *Rev Științe Sănătății Moldova*. 2022; 1(29):136. Disponibil la: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/168334.
20. **Colac S**, Sitnic V, Burduniuc O. Genomic surveillance of wastewater for SARS-CoV-2 detection in the Republic of Moldova. *Rom Arch Microbiol Immunol*. 2024; 83(4):214–219. DOI:10.54044/RAMI.2024.04.02.
21. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ*. 2020; 728:138764. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138764
22. Daughton CG. Wastewater surveillance for population-wide COVID-19: the present and future. *Sci Total Environ*. 2020; 736:139631. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139631.
23. Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, et al. SARS-CoV-2 in wastewater: state of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ*. 2020; 739:139076. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139076.
24. Priyadarshi R, Purohit SD, Roy S, Ghosh T, Rhim JW, Han SS. Antiviral biodegradable food packaging and edible coating materials in the COVID-19 era: a mini-review. *Coatings*. 2022; 12(5):577. doi:10.3390/coatings12050577.
25. Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MR. Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies. *Viruses*. 2020; 12(3):254. doi:10.3390/v12030254.

26. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020; 42(1):3–11. PMID: 32342926.

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE

• Articole în reviste științifice peste hotare:

✓ articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale*

1. Colac S., Ulinici M., Burduniuc O. Genetic diversity analysis of the SARS-CoV-2 virus: a literature review. *One Health and Risk Management.* 2025;6(1):16-28. doi:10.38045/ohrm.2025.1.02. <https://journal.ohrm.bba.md/index.php/journal-ohrm-bba-md/article/view/800>

✓ articole în reviste din străinătate recenzate

2. Colac S., Burduniuc O., Apostol M., Druc A. Genetic significance and tracking of circulating SARS-CoV-2 variants in the Republic of Moldova. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology.* 2024;83(3):148-154. doi:10.54044/RAMI.2024.03.02. https://roami.ro/wp-content/uploads/2025/04/Articol1_issue3_2024.pdf
3. Colac S., Sitnic V., Burduniuc O. Genomic surveillance of wastewater for SARS-CoV-2 detection in the Republic of Moldova. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology.* 2024;83(4):11-16. https://roami.ro/wp-content/uploads/2025/10/articol-2_issue4_2024.pdf
4. Burlac V., Burduniuc O., Colac S., Iaconi O-S., Bucov V., Lupu M., Iliev A-M. Metagenomics sequencing in infection diagnosis: clinical applications. *One Health Journal.* 2025;3(V):5-12. doi:10.31073/onehealthjournal2025-V-01. <https://onehealthjournal.org.ua/index.php/main/article/view/2025-V-01>

• Articole în reviste științifice naționale acreditate:

✓ articole în reviste de categoria B

5. Burduniuc (Popa) O., Lupu M., Bucov V., Tapu L., Anton (Bivol) M., Colac S. Secvențierea metagenomică în diagnosticul rezistenței la antimicrobiene. *Akademios.* 2024;(2):84-90. doi:10.52673/18570461.24.2-73.08. <https://akademos.asm.md/index.php/akademos/en/article/view/112>
6. Colac S., Sitnic V., Burduniuc O. Genomic monitoring of SARS-CoV-2 variants in the Republic of Moldova. *Arta Medica.* 2025;(1):67-71. doi:10.5281/zenodo.15879875. <https://zenodo.org/records/15879875>

• Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice:

✓ internaționale:

7. Colac S. Analiza secvențierii genomului SARS-CoV-2: evoluția și impactul noilor linii Omicron în Republica Moldova. În: *Patrimoniul cultural de ieri – implicații în dezvoltarea societății de mâine.* Iași–Chișinău–Lviv; 11-12 febr 2025. p. 280. ISSN 2558 – 894X. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/244582
8. Colac S., Iliev A-M. Advancements in DNA sequencing and public health genomics. În: *Patrimoniul cultural de ieri – implicații în dezvoltarea societății de mâine.* Iași–Chișinău–Lviv; 11-12 febr 2025. p. 288. ISSN 2558 – 894X. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/244594

✓ naționale cu participare internațională:

9. Colac S. Genetic significance and monitoring of circulating variants of the SARS-CoV-2 virus in the Republic of Moldova. În: *One Health – realizări și provocări.* *One Health & Risk Management.* 2023;2(supl.1):85. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/192303
10. Colac S., Ulinici M., Burduniuc O. Analiza diversității genetice a virusului SARS-CoV-2: revistă a literaturii. În: *Sănătatea și fenomenul rezistenței la antimicrobiene în țările cu*

venituri mici și medii din Europa de Est. *One Health & Risk Management*. 2024. p.136.

<https://journal.ohrm.bba.md/index.php/journal-ohrm-bba-md/article/view/745>

11. **Colac S.**, Burlac V., Burduniuc O. Profilul genetic al mutației JN.1 a virusului SARS-CoV-2 detectată în Republica Moldova. În: *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2025;12(3, anexa 2):647. <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/32377>
12. **Colac S.** Monitoring the spread of SARS-CoV-2 via wastewater genome sequencing. În: *Abordarea „O singură sănătate” pentru securitatea sănătății globale*. Chișinău; 20-21 nov 2025. p.18. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/242249
13. **Colac S.**, Burlac V., Sitnic V. Determinanți genetici și ai virulenței în genomul microorganismelor cu impact major asupra sănătății publice. În: *Abordarea „O singură sănătate” pentru securitatea sănătății globale*. Chișinău; 2025. p.15. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/242245

✓ **naționale:**

14. **Colac S.**, Burduniuc O., Apostol M. Whole-genome sequencing of COVID-19 infection and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 isolates. În: *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2022;3(29):136. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/168334
15. **Colac S.** Variabilitatea genetică a virusului SARS-CoV-2, varianta Omicron circulantă pe teritoriul Republicii Moldova. În: *Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. 2023. p.152. https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/193538

● **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții:**

16. **Colac S.**, Druc A., Burduniuc O., Apostol M. Metoda de secvențiere a întregul genom al virusurilor respiratorii prin tehnologia Nanopore. Certificat de Inovator nr. 6267, 04.07.2024.
17. **Colac S.**, Sîtnic V., Iliev A-M., Apostol M., Burduniuc O. Metoda de generare a rapoartelor a datelor obținute în urma deconvoluției virale cu algoritm Freyja. Certificat de Inovator nr. 6315, 30.12.2024.
18. Burduniuc O., **Colac S.**, Caradja A., Cazacu A., Ivanov S., Iliev A-M. Biosiguranță, biosecuritate și managementul riscului biologic în laboratoare. Drept de autor, seria OȘ nr. 8230 din 07.07.2025.
19. Burduniuc O., Chesov E., **Colac S.**, Racoviță S., Burlac V., Ceban V., Ivanov S. Bune practici în secvențierea genomică. Drept de autor, seria OȘ nr. 8362 din 09.12.2025.

● **Participări cu comunicări la forumuri științifice:**

✓ **internaționale**

20. **Colac S.** SARS-CoV-2 genome sequence analysis: evolution and impact of new Omicron lineages in the Republic of Moldova. *Comunicare orală prezentată la: Conferința științifică internațională Patrimoniul cultural de ieri – implicații în dezvoltarea societății durabile de mâine*; 11-12 febr 2025; Iași–Chișinău–Lviv.
21. **Colac S.**, Iliev A-M. Advancements in DNA sequencing and public health genomics. *Comunicare orală prezentată la: Conferința științifică internațională Patrimoniul cultural de ieri – implicații în dezvoltarea societății durabile de mâine*; 11-12 febr 2025.
22. **Colac S.**, Apostol M. Particularitățile circulației virusurilor gripale și non-gripale la copii în perioada pandemiei COVID-19. *Comunicare orală prezentată la: Conferința Actualități în pediatrie și impactul imunizării asupra morbidității și mortalității copiilor*. Chișinău; 22-23 sept 2023.
23. Burduniuc O., **Colac S.** Monitorizarea integrată a virusurilor gripale și SARS-CoV-2 în Republica Moldova. *Comunicare orală prezentată la: Conferința Noi abordări în controlul bolilor respiratorii*. Chișinău; 20-21 dec 2023.

24. Burduniuc O., **Colac S.** Secvențierea întregului genom în supravegherea rezistenței antimicrobiene și investigarea focarelor de infecții asociate asistenței medicale. *Comunicare orală prezentată la: Conferința Prevenirea și controlul infecțiilor asociate asistenței medicale.* Chișinău; 19-20 sept 2024.
25. **Colac S.**, Burlac V., Burduniuc O. Profilul genetic al mutației JN.1 a virusului SARS-CoV-2 detectată în Republica Moldova. *Comunicare orală prezentată la: Congresul aniversar 80 de ani de inovație în sănătate și educație medicală.* Chișinău; 20 oct 2025.
26. **Colac S.** Secvențierea genomică – instrument modern în monitorizarea agenților microbieni. *Comunicare orală prezentată la: Conferința Abordarea „O singură sănătate” pentru securitatea sănătății globale.* Chișinău; 20-21 nov 2025.

✓ **naționale**

27. **Colac S.** Variabilitatea genetică a virusului SARS-CoV-2, varianta Omicron circulantă pe teritoriul Republicii Moldova. *Comunicare orală prezentată la: Conferința științifică anuală USMF „Nicolae Testemițanu”.* Chișinău; 18-20 oct 2023.
28. **Colac S.**, Ulinici M., Burduniuc O. Analiza diversității genetice a virusului SARS-CoV-2. *Comunicare orală prezentată la: Conferința Sănătatea și fenomenul rezistenței la antimicrobiene în țările cu venituri mici și medii din Europa de Est.* Chișinău; 27 ian 2024.
29. **Colac S.** Secvențierea genomică în supravegherea sănătății publice. *Comunicare orală prezentată la: Conferința ANSP: trecut, prezent și viitor.* Chișinău; 7 oct 2025.

• **Participări cu postere la forumuri științifice:**

✓ **internaționale**

30. **Colac S.** Semnificația genetică și monitorizarea variantelor circulante ale virusului SARS-CoV-2 în Republica Moldova. *Poster prezentat la: Conferința Abordarea „O singură sănătate – realizări și provocări”.* Chișinău; 23-24 nov 2023. (Premiul mare).
31. **Colac S.** Monitorizarea răspândirii SARS-CoV-2 prin secvențierea genomică a apelor reziduale. *Poster prezentat la: Conferința Abordarea „O singură sănătate pentru securitatea sănătății globale”.* Chișinău; 20-21 nov 2025.

✓ **naționale**

32. **Colac S.**, Burduniuc O., Apostol M. Monitorizarea infecției COVID-19 prin secvențierea întregului genom și analiza filogenetică a izolatelor SARS-CoV-2. *Poster prezentat la: Conferința științifică anuală USMF „Nicolae Testemițanu”.* Chișinău; 19-21 oct 2022.

ADNOTARE

La tema tezei de doctor în științe medicale a doctorandei Colac Svetlana: “Diversitatea genotipică a SARS-CoV-2 în perioada pandemică și postpandemică timpurie”.

Specialitatea 313.02 – Microbiologie, virusologie medicală.

Actualitate. Infecția cu SARS-CoV-2 rămâne o provocare majoră pentru sănătatea publică, din cauza evoluției continue a virusului și apariției variantelor genetice cu impact asupra transmiterii și controlului bolii. Monitorizarea genomică este esențială pentru supravegherea epidemiologică și identificarea variantelor circulante.

Scopul lucrării: Identificarea variantelor virusului SARS-CoV-2 cu analiza filogenetică a izolatelor circulante pe teritoriul Republicii Moldova pentru perfecționarea măsurilor de supraveghere și control a morbidității prin COVID-19.

Obiectivele lucrării: caracteristica filogenetică a izolatelor virusului SARS-CoV-2 depistate pe teritoriul RM; studierea evoluției virusului SARS-CoV-2 cu identificarea substituțiilor, inserțiilor, delețiilor și compararea lor cu diversitatea genomului viral la nivel global; analiza dinamicii circulației virusului SARS-CoV-2 și apariției noilor variante genetice, investigarea relației dintre genotipurile virusului și datele epidemiologice; monitorizarea apelor uzate ca metodă de predicție a tendințelor epidemiologice ale infecției cu SARS-CoV-2; estimarea impactului diferitor genotipuri virale ale SARS-CoV-2 cu argumentarea propunerilor privind diagnosticul de laborator al COVID-19.

Noutatea și originalitatea științifică: În premieră pentru RM, au fost obținute date originale privind caracteristicile genotipice și fenotipice ale virusului SARS-CoV-2 circulant pe teritoriul țării, utilizând tehnici moderne de secvențiere genomică și analiză bioinformatică. Cercetarea a permis identificarea genovariantelor SARS-CoV-2 din probe clinice și ape uzate, evaluarea poziționării acestora în arborii filogenetici globali și analiza evoluției moleculare a virusului. Rezultatele obținute au contribuit la prognozarea dinamicii procesului epidemic și la optimizarea măsurilor de supraveghere și control al infecției COVID-19.

Rezultate obținute: A fost determinată structura genetică și distribuția liniilor SARS-CoV-2 în RM în perioada 2021–2025, fiind identificate mutațiile dominante și evaluat impactul acestora asupra proprietăților biologice ale virusului; a fost demonstrată utilitatea monitorizării apelor uzate în detectarea timpurie a variantelor circulante, evaluată performanța instrumentelor bioinformatică utilizate în analiza datelor de secvențiere și formulate propuneri pentru optimizarea diagnosticului și supravegherii epidemiologice.

Semnificația teoretică: Studiul contribuie la aprofundarea cunoștințelor privind evoluția moleculară a SARS-CoV-2 și mecanismele de adaptare virală, oferind suport științific pentru dezvoltarea strategiilor moderne de supraveghere genomică și management epidemiologic.

Valoarea aplicativă: Rezultatele obținute au fost valorificate prin elaborarea ghidurilor de bune practici în secvențiere genomică, actualizarea protocolului clinic național și integrarea datelor în activitatea de instruire a studenților, medicilor rezidenți și specialiștilor din domeniul.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele cercetării au fost implementate prin elaborarea ghidului privind secvențierea metagenomică; elaborarea monografiei privind secvențierea acizilor nucleici; actualizarea Protocolului clinic național COVID-19; precum și prin valorificarea rezultatelor obținute în activitatea instituțiilor medico-sanitare, în supravegherea epidemiologică și în procesul educațional universitar.

Structura tezei: introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie (184) titluri, 12 anexe, 94 pagini de text de bază, 8 tabele și 46 figuri. Rezultatele sunt publicate în 32 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: COVID-19, SARS-CoV-2, secvențiere, NGS, genom viral, monitorizare genetică, variante de mutații, ape uzate.

ANNOTATION

to the doctoral thesis in medical sciences by PhD candidate Svetlana Colac: “Genotypic Diversity of SARS-CoV-2 During the Pandemic and Early Post-Pandemic Period.”

Specialty 313.02 – Medical Microbiology and Virology.

Relevance. SARS-CoV-2 infection remains a major public health challenge because of the continuing evolution of the virus and the emergence of genetic variants that affect transmission and disease control. Genomic monitoring is essential for epidemiological surveillance and for identifying circulating variants.

Aim of the study. To identify SARS-CoV-2 variants circulating in the Republic of Moldova and to perform phylogenetic analysis of the detected isolates, with the aim of improving COVID-19 surveillance and morbidity control measures.

Objectives of the study. To provide a phylogenetic characterization of SARS-CoV-2 isolates detected in the Republic of Moldova; to study SARS-CoV-2 evolution by identifying substitutions, insertions, and deletions and comparing them with global viral genome diversity; to analyze SARS-CoV-2 circulation dynamics and the emergence of new genetic variants, including the relationship between viral genotypes and epidemiological data; to assess wastewater monitoring as a method for predicting epidemiological trends in SARS-CoV-2 infection; and to evaluate the impact of different SARS-CoV-2 genotypes in order to support proposals for improving the laboratory diagnosis of COVID-19.

Scientific novelty and originality. Original data on the genotypic and phenotypic characteristics of SARS-CoV-2 circulating in the Republic of Moldova were obtained for the first time using modern genomic sequencing and bioinformatic analysis. The study identified SARS-CoV-2 genovariants in clinical and wastewater samples, assessed their position within global phylogenetic trees, and analyzed the molecular evolution of the virus. The findings contributed to forecasting epidemic dynamics and optimizing surveillance and control measures for COVID-19.

The obtained study results. The research determined the genetic structure and distribution of SARS-CoV-2 lineages in the Republic of Moldova during 2021–2025. Dominant mutations were identified, and their impact on the biological properties of the virus was assessed. The study also demonstrated the value of wastewater monitoring for early detection of circulating variants, evaluated the performance of bioinformatic tools used for sequencing-data analysis, and developed proposals for improving laboratory diagnosis and epidemiological surveillance.

Theoretical background. The study deepens current understanding of the molecular evolution of SARS-CoV-2 and the mechanisms of viral adaptation, providing a scientific basis for the development of modern genomic surveillance and epidemiological management strategies.

The research practical value. The findings were applied through the development of good-practice guidelines in genomic sequencing, the update of the national clinical protocol, and the integration of the data into the training of students, resident physicians, and specialists in the field.

Implementation of scientific results. The research findings were implemented through the development of a guide on metagenomic sequencing, preparation of a monograph on nucleic acid sequencing, update of the National Clinical Protocol on COVID-19, and use of the results in healthcare institutions, epidemiological surveillance, and university education.

PhD thesis structure. The thesis includes an introduction, four chapters, general conclusions and recommendations, a bibliography of 189 references, 12 annexes, 94 pages of main text, 8 tables, and 42 figures. The results have been published in 32 scientific papers.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; sequencing; NGS; viral genome; genetic monitoring; mutation variants; wastewater.