

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**

**Teză 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).

**Componenta 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



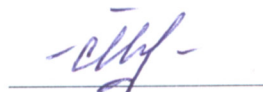
**Spătaru Diana,**

doctor în științe medicale, conferențiar universitar



**Autor**

Colac Svetlana



# CUPRINS

CUPRINS .....	3
LISTA ABREVIERILOR .....	4
LISTA FIGURILOR .....	6
LISTA TABELELOR .....	8
INTRODUCERE.....	9
1. CARACTERISTICA MOLECULARĂ A VARIANTELOR EMERGENTE DE SARS-CoV-2 ȘI DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR DETERMINATE DE ACESTE.....	15
1.1. Biologia virusului SARS-CoV-2. Evoluția genetică .....	15
1.2. Clasificarea și nomenclatura variantelor virusului SARS-CoV-2 .....	22
1.3. Epidemiologia moleculară a virusului SARS-CoV-2.....	25
1.4. Metode de diagnostic a infecției cu SARS-CoV-2, de analiză filogenetică și de bioinformatică .....	28
1.5. Monitorizarea virusului SARS-CoV-2 în apele uzate: modelare versus realitate, frecvența relativă pentru identificarea liniilor genetice.....	31
1.6. Concluzii la capitolul 1 .....	33
2. MATERIAL ȘI METODE UTILIZATE ÎN CERCETARE .....	34
2.1. Caracteristică generală și etapele cercetării. Designul studiului .....	34
2.2. Metodologia cercetării.....	37
2.4 Concluzii la capitolul 2.....	46
3. CARACTERIZAREA GENETICĂ A TULPINILOR DE SARS-CoV-2 IDENTIFICATE ÎN PROBELE CLINICE .....	48
3.1. Analiza genetică a variabilității izolatelor virusului SARS-CoV-2 circulante pe teritoriul Republicii Moldova în perioada 2021-2024.....	48
3.2. Caracteristica moleculară a substituțiilor, a delețiilor și a inserțiilor în evoluția SARS-CoV-2 .....	56
3.3. Particularitățile mutațiilor sinonime și nonsinonime în dinamica genomică a virusului SARS- CoV-2 .....	71
3.4. Dinamica evoluției SARS-CoV-2 și implicațiile asupra scorului de evadare imună RBD ....	78
3.5. Concluzii la capitolul 3.....	80
4. MONITORIZAREA GENETICĂ A VIRUSULUI SARS-CoV-2 ÎN APELE UZATE PRIN SECVENȚIEREA ÎNTREGULUI GENOM .....	81
4.1. Supravegherea genomică a SARS-CoV-2 în apele uzate ca alternativă de monitorizare a evoluției virusului în Republica Moldova .....	81
4.2. Analiza comparativă a performanței instrumentelor Freyja și Kallisto pentru estimarea abundenței liniilor SARS-CoV-2 în contextual monitorizării apelor uzate.....	88
DISCUȚII.....	95
CONCLUZII GENERALE .....	98
RECOMANDĂRI .....	99
ANEXE .....	111

## LISTA ABREVIERILOR

<b>ACE2</b>	<i>Angiotensin-converting enzyme 2</i> (enzima de conversie a angiotensinei 2)
<b>ADN</b>	Acid dezoxiribonucleic
<b>ADNc</b>	Acid dezoxiribonucleic complementar
<b>AI</b>	Abatere interquartilă
<b>ANSP</b>	Agencia Națională pentru Sănătate Publică
<b>ARN</b>	Acid ribonucleic
<b>ARNm</b>	ARN-mesager
<b>BCoV</b>	Coronavirus bovin
<b>CDC</b>	Centrele pentru Controlul și Prevenirea Bolilor
<b>CDS</b>	Regiune codificatoare a proteinei Spike
<b>CI</b>	Interval de confidență
<b>CNCB</b>	Centrul Național de Bioinformatică
<b>COVID-19</b>	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>DCC</b>	Deplasarea cadrului de citire a genei
<b>dNTP</b>	Dezoxiribonucleotid trifosfat
<b>ER</b>	Reticul endoplasmatic
<b>FCoV</b>	Coronavirus felin
<b>GISAID</b>	Inițiativa Globală privind Partajarea Tuturor Datelor Gripei / <i>Global Initiative on Sharing All Influenza Data</i>
<b>HCoV</b>	Coronavirusuri umane
<b>HIV</b>	Virusul imunodeficienței umane
<b>ICTV</b>	Conform Comitetul Internațional pentru Taxonomia Virusurilor
<b>ISFET</b>	Tranzistor cu efect de câmp sensibil la ioni ( <i>Ion-Sensitive Field-Effect Transistor</i> )
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MAE</b>	Eroare absolută medie ( <i>Mean absolute error</i> )
<b>NAAT</b>	Testul de amplificare a acidului nucleic
<b>NCBI</b>	Centrul Național pentru Informații Biotehnologice
<b>NGDC</b>	Centrul Național de Date Genomice
<b>NGS</b>	Secvențiere de generație următoare / <i>Next generation sequencing</i>
<b>NSP</b>	Proteină nestructurală

<b>NTD</b>	N-terminal extracelular
<b>OMS</b>	Organizația Mondială a Sănătății
<b>ONT</b>	<i>Oxford Nanopore Technology</i>
<b>ORF</b>	Cadru deschis de citire
<b>PANGO</b>	Atribuirea filogenetică a liniilor denumite ale focarelor globale ( <i>Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak</i> )
<b>PCN</b>	Protocol clinic național
<b>PCR</b>	Reacție de polimerizare în lanț
<b>R0</b>	Număr de reproducere de bază
<b>RBD</b>	Domeniu de legare la receptor
<b>RdRp</b>	ARN polimerază ARN-dependentă
<b>RM</b>	Republica Moldova
<b>RMSE</b>	Eroare medie pătratică ( <i>Root mean squared error</i> )
<b>rRT-PCR</b>	Reacția de polimerizare în lanț cu transcripție inversă / <i>Real Time Revers</i> <i>Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2</i>
<b>SBS</b>	Secvențiere prin sinteză
<b>SMRT</b>	Tehnologie în timp real cu o singură moleculă
<b>TGEV</b>	Virusul gastroenteritei transmisibile porcine
<b>TMPRSS2</b>	Proteaza transmembranară-serină 2
<b>TPM</b>	Unități (transcrieri per milion) ( <i>Transcripts per million</i> )
<b>VHC</b>	Virusul hepatitei C
<b>VOC</b>	Variantă de îngrijorare
<b>VOI</b>	Variantă de interes
<b>VTM</b>	Mediu de transport viral
<b>VUM</b>	Variantă sub supraveghere

## LISTA FIGURILOR

<b>Figura 1. Clasificarea taxonomică a virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2. Structura (A) și genomul (B) virusului SARS-CoV-2.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 3. Mecanismul de replicare a virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 4. Clasificarea variantelor virusului SARS-CoV-2 conform OMS .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5. Designul studiului.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 6. Etapele principale ale procesului de secvențiere de generație următoare a genomului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 7. Procesul de investigare a apelor uzate în contextul monitorizării pandemiei de COVID-19 .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 8. Incidența COVID-19 pe grupe de vârstă .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 9. Relația filogenetică dintre izolatele virusului SARS-CoV-2 în cadrul prezentului studiu .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 10. Distribuția liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 circulante în Republica Moldova în perioada postpandemică.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 11. Numărul de probe investigate și persoane pozitive la COVID-19 (săptămânal) în perioada anilor 2021-2025 .....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 12. Distribuția temporală a liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 identificate în perioada 2021-2024 .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 13. Diagrama boxplot a dependenței numărului de substituții nucleotidice de cladele SARS-CoV-2.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 14. Diagrama boxplot a dependenței numărului de substituții aminoacidice de cladele SARS-CoV-2.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 15. Distribuția numărului de deleții nucleotidice în cladele virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 16. Distribuția numărului de deleții aminoacidice în cladele virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 17. Distribuția numărului de inserții nucleotidice în cladele virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 18. Distribuția numărului de inserții aminoacidice în cladele virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 19. Diversitatea nucleotidelor în genomii analizați ai virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 20. Numărul de apariții și locația în genom a substituțiilor identificate ale virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 21. Numărul de apariții și locația în genom a indelurilor identificate .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 22. Densitatea substituțiilor nucleotidice în genomul virusului SARS-CoV-2 în perioada 2021-2024.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 23. Top 10 cele mai frecvente mutații aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 24. Arborele filogenetic al izolatelor SARS-CoV-2 în funcție de scorul de afinitate ACE-2 .....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 25. Scorul de evadare imună RBD în funcție de dinamica evoluției virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 26. Acoperirea de secvențiere a probelor de ape uzate analizate și secvențiate în anul 2024.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 27. 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.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 28. Cele mai recente linii genetice ale virusului SARS-CoV-2 identificate în apele uzate în comparație cu proba umană .....</b>	<b>85</b>

<b>Figura 29. Acoperirea de secvențiere a probelor de ape uzate analizate și secvențiate în anul 2025.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 30. 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.....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 31. Performanța instrumentului Freyja. Semnificația statistică a abundențelor prezise și reale în funcție de varianta genetică a SARS-CoV-2.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 32. Harta termică (heatmap) a erorilor de predicție a instrumentului Freyja ....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 33. Performanța instrumentului Kallisto în determinarea semnificației statistice a abundențelor prezise și reale în funcție de varianta genetică a SARS-CoV-2.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 34. Harta termică (heatmap) a erorilor de predicție a instrumentului Kallisto ..</b>	<b>93</b>
<b>Figura A.2. 1. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de substituții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2.....</b>	<b>124</b>
<b>Figura A.2. 2. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de substituții aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>125</b>
<b>Figura A.2. 3. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de deleții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2.....</b>	<b>126</b>
<b>Figura A.2. 4. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de deleții aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>127</b>
<b>Figura A.2. 5. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de inserții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2.....</b>	<b>128</b>
<b>Figura A.2. 6. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de inserții aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>129</b>
<b>Figura A.4. 1. Performanța instrumentului Freyja pentru fiecare variantă a virusului SARS-CoV-2.....</b>	<b>135</b>
<b>Figura A.4. 2. Performanța instrumentului Kallisto pentru fiecare variantă a virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>136</b>

## LISTA TABELELOR

<b>Tabelul 1. Poziții genomice ale virusului SARS-CoV-2 cu cea mai mare diversitate a nucleotidelor.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabelul 2. Distribuția per genă a indelurilor și a substituțiilor în genomul virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>67</b>
<b>Tabelul 3. Distribuția per genă a mutațiilor sinonime și nonsinonime ale virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>72</b>
<b>Tabelul 4. Frecvența liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 detectate în proba S23_S23_L001 .....</b>	<b>84</b>
<b>Tabelul 5. Frecvența liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 detectate în funcție de perioada colectării probelor de ape uzate .....</b>	<b>86</b>
<b>Tabelul A.1. 1. Evaluarea comparativă a caracteristicilor izolatelor secvențiate și a genomului variantelor OMS .....</b>	<b>111</b>
<b>Tabelul A.1. 2. Evaluarea comparativă a mutațiilor private detectate în variantele OMS ale virusului SARS-CoV-2 .....</b>	<b>114</b>
<b>Tabelul A.3. 1. Mutații semnificative în dinamica genomului virusului SARS-CoV-2..</b>	<b>130</b>
<b>Tabelul A.3. 2. Frecvența variantelor virusului SARS-CoV-2 detectate pe perioada colectării probelor.....</b>	<b>133</b>

## INTRODUCERE

**Actualitatea temei.** La sfârșitul anului 2019, în luna decembrie, odată cu apariția și răspândirea rapidă a unui nou virus – coronavirusul sindromului respirator acut sever 2 (SARS-CoV-2) – lumea s-a confruntat cu una dintre cele mai grave crize de sănătate ale secolului XXI. În perioada 2020-2023, boala a afectat populația a peste 200 de țări, fiind înregistrate peste 778 741 840 de cazuri confirmate și aproximativ 7 102 636 de decese (OMS, 2025) [1,2,3].

La 5 mai 2023, OMS a anunțat sfârșitul pandemiei de COVID-19, marcând trecerea la perioada postpandemică după trei ani de perturbări profunde ale vieții, ale economiei mondiale și ale sistemelor de sănătate. Trebuie accentuat faptul că această declarație nu implică eradicarea completă a COVID-19, deoarece virusul continuă să circule, iar rata de transmitere și consecințele variază de la o regiune la alta [4,5].

Pe durata pandemiei de COVID-19 a apărut un număr mare de variante ale virusului SARS-CoV-2, care au favorizat adaptarea evolutivă a acestuia la imunitatea globală a populației. Unele dintre ele s-au răspândit rapid în întreaga lume, ceea ce a dus la evadarea virusului, la diminuarea eficienței tratamentelor și a vaccinurilor disponibile.

Mutațiile din genomul variantelor SARS-CoV-2 au un impact semnificativ asupra structurii proteinelor virale și a imunogenității, influențând răspunsul imunologic și evoluția clinică a infecției la om, precum și proprietăți esențiale ale virusului, cum ar fi infecțiozitatea, transmisibilitatea și capacitatea de evitare a răspunsului imun, unele dintre acestea conferindu-i un avantaj selectiv care favorizează răspândirea eficientă de la o gazdă la alta [6,7,8,9,10].

Potențialul de creștere a transmiterii este legat de interacțiunile moleculare dintre virus și gazdă, inclusiv de proteinele virale responsabile de atașare, pătrundere în celulă și evitarea răspunsului imun. De aceea, studierea variantelor și subvariantelor SARS-CoV-2 este necesară pentru evaluarea riscului și pentru sprijinirea deciziilor de sănătate publică [7,8,9,10].

OMS a clasificat variantele identificate ale virusului SARS-CoV-2 în trei grupuri distincte: variante de îngrijorare (VOC), variante de interes (VOI) și variante sub supraveghere (VUM). Această clasificare are la bază modificările genetice din genomul viral care vizează potențialul de creștere al transmiterii și al virulenței virusului, cazurile cumulative și necesitatea evaluării riscului [11,12,13,14].

În perioada postpandemică, subvariantele SARS-CoV-2 continuă să circule, în special cele ale variantei Omicron, caracterizate prin variabilitate ridicată și impact potențial asupra diagnosticului, tratamentului și eficienței vaccinurilor. Astfel, actualitatea temei este determinată de necesitatea monitorizării continue a circulației și evoluției virusului [14,15].

Secvențierea genomului viral s-a consolidat ca instrument clinic și epidemiologic important pentru detectarea variantelor, dezvoltarea testelor de diagnostic și informarea rapidă a măsurilor de sănătate publică. Amploarea secvențierii SARS-CoV-2 în timpul pandemiei a permis înțelegerea evoluției și răspândirii virusului și a consolidat premisele supravegherii genomice postpandemice [16,17,18,19].

Secvențierea genomului reprezintă una dintre metodele optime pentru monitorizarea în timp real a dinamicii transmiterii virale prin identificarea unor secvențe care pot agrega împreună în clustere și prin corelarea lor cu datele clinice și epidemiologice. Acest proces este foarte important pentru identificarea originii virusului, a surselor de proveniență ale epidemiilor din diferite regiuni și a dinamicii transmiterii - intra- și intercomunitara acestuia [20].

Aplicarea secvențierii întregului genom și a platformelor bioinformatică a permis identificarea rapidă a genomilor virali și interpretarea variantelor SARS-CoV-2, contribuind la consolidarea supravegherii genomice și la orientarea măsurilor de răspuns [21].

În Republica Moldova, Laboratorul virusologic al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică (ANSP) a inițiat investigarea SARS-CoV-2 prin rRT-PCR la 26 februarie 2020, iar primul caz de COVID-19 a fost confirmat la 7 martie 2020. Primele secvențieri naționale ale virusului au fost realizate la sfârșitul anului 2021 cu ajutorul secvențiatorului Ion Torrent GENEXUS, donat laboratorului ANSP de Uniunea Europeană și OMS [22,23].

Monitorizarea apelor uzate completează supravegherea clinică a SARS-CoV-2, deoarece genele virale pot fi detectate în excrețiile persoanelor simptomatice și asimptomatice, inclusiv înainte de apariția primelor simptome. Această abordare oferă date populaționale utile pentru identificarea timpurie a tendințelor de circulație virală [24,25,26,27].

Experiența internațională a demonstrat utilitatea supravegherii SARS-CoV-2 prin apele uzate pentru monitorizarea variantelor virale și corelarea rezultatelor cu datele obținute din probe umane [28,29,30].

Astfel, monitorizarea virusului SARS-CoV-2 prin secvențierea probelor clinice și investigarea apelor uzate poate furniza date aproape în timp real despre dinamica transmiterii, utile pentru orientarea acțiunilor de sănătate publică la nivel local și național.

**Problema de cercetare.** În Republica Moldova, datele privind diversitatea genomică a SARS-CoV-2, evoluția filogenetică a izolatelor circulante și corelarea variantelor cu indicatorii epidemiologici sunt încă insuficient sistematizate, inclusiv pentru probele de mediu. Această lacună limitează capacitatea de anticipare a tendințelor de circulație virală și de fundamentare rapidă a măsurilor de diagnostic, supraveghere și control. Aspectele descriptive detaliate privind mecanismele moleculare, clasificarea variantelor și experiențele internaționale sunt abordate în capitolul de analiză a literaturii.

## **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.

### **Metodologia generală a cercetării**

Cercetarea s-a desfășurat în perioada anilor 2021-2025 în cadrul Laboratorului virusologic al ANSP. Materialul studiului a fost reprezentat de secvențele virusului SARS-CoV-2 obținute din probe biologice, selectate în baza criteriilor epidemiologice, clinice și de laborator, precum și din probele de ape uzate colectate la Stația de epurare din mun. Chișinău.

În vederea atingerii scopului cercetării, a fost realizat un studiu de laborator complex cu colectarea și cercetarea unui număr reprezentativ de probe biologice din diferite teritorii administrative ale republicii, în diferite perioade de timp, de la pacienți cu diferite date demografice și cu diferite grade de severitate a infecției COVID-19.

Diversitatea și prevalența liniilor genetice ale SARS-CoV-2 au fost studiate și în probele de ape uzate din mun. Chișinău în perioada 2024-2025. Toate izolatele destinate secvențierii au fost selectate din probe pozitive, procesate prin tehnici de biologie moleculară precum PCR. Identificarea variantelor genetice și determinarea tipului de mutație s-a efectuat prin metoda de secvențiere a fragmentelor cu ajutorul instrumentelor Ion Torrent Genexus și Illumina MiSeq, folosind diferite programe bioinformatic.

În scopul determinării și selectării instrumentului pentru analiza datelor de secvențiere a probelor de ape uzate, au fost evaluate două metode computaționale — Freyja (bazată pe variante) și Kallisto (fără aliniere), utilizând un set de date sintetice din 42 de probe de ape uzate conținând amestecuri cunoscute din 11 linii celulare de SARS-CoV-2 desemnate de OMS (Alpha, Beta, Delta, Epsilon, Eta, Gamma, Iota, Kappa, Lambda, Theta, Zeta). Abundențele liniilor au variat de la < 0,01 % până la > 99 %, permițând o evaluare cuprinzătoare pe întregul spectru de detecție.

### **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 biologie moleculară (RT-PCR, secvențiere) pentru studierea tulpinilor virusului SARS-CoV-2 a permis aprecierea și evaluarea poziției acestora în arborii filogenetici globali, fapt extrem de important pentru argumentarea tendințelor de evoluție a 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 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 baza rezultatelor 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”, aprobat la ședința Consiliului științific al ANSP din 19 decembrie 2024, proces-verbal nr. 23; la ședința Consiliului științific al IMSP Institutul Oncologic din Moldova din 30 decembrie 2024, proces-verbal nr. 2 și la ședința

Comisiei științifico-metodice de profil Medicina Comunitară a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din 17 iunie 2025, proces-verbal nr. 4.

În cadrul studiului au fost elaborate două broșuri informative pentru studenți, medici rezidenți, cercetători științifici, medici specialiști: „Bune practici în secvențierea genomică” și „Bazele unei culturi responsabile de biosiguranță și biosecuritate” și monografia „Secvențierea acizilor nucleici – o privire de ansamblu asupra evoluției și inovației tehnologice”.

Împreună cu echipa care a participat la elaborarea Protocolul clinic național (PCN), a fost actualizat PCN „Infecția cu coronavirus de tip nou (COVID-19)”, (PCN-371, Chișinău 2025).

### **Aprobarea rezultatelor**

Metodologia de cercetare și designul studiului au fost evaluate și aprobate în trei etape:

- La ședința Consiliului științific al ANSP s-a aprobat: tema cercetării, conducătorul științific și componența comisiei de îndrumare (extras PV nr.1 din 18.01.2023).
- Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu”. A fost obținut aviz favorabil al Comitetului de Etică a Cercetării din 20.09.2023 la proiectul științific de doctorat cu titlul: „Monitorizarea circulației virusului SARS-CoV-2 prin secvențierea întregului genom cu analiza filogenetică”.
- La ședința Seminarului științific de profil a fost aprobat proiectul de cercetare și tema tezei de doctor în științe medicale „Monitorizarea circulației virusului SARS-CoV-2 prin secvențierea întregului genom cu analiza filogenetică”, extras din procesul-verbal nr.2 din 20.12.2023, conducătorul științific și componența comisiei 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), fiind recomandată pentru susținerea publică prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 01.07.2026 (proces-verbal nr.4).

Participări cu prezentări la conferințe științifice naționale și internaționale: *WHO Regional Office for Europe and European Centre for Disease Prevention and Control Joint Annual Hybrid European Influenza and COVID-19 Surveillance Meeting*, 31 May – 2 June 2023, Copenhagen, Denmark; Conferința națională cu participare internațională cu genericul: „Actualități în pediatrie și impactul imunizării asupra morbidității și a mortalității copiilor în

Republica Moldova”, 22-23 septembrie 2023, Chișinău, Republica Moldova; Conferința științifică anuală USMF „N. Testemițanu” cu genericul: „Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță”, 18-20 octombrie 2023, Chișinău, Republica Moldova; Conferința națională cu participare internațională cu genericul: „Abordarea „O singură sănătate” – realizări și provocări”, 23-24 noiembrie 2023, Chișinău, Republica Moldova; Conferința națională cu participare internațională cu genericul: „Noi abordări în controlul bolilor respiratorii. Integrarea serviceable/*New approaches in the control of respiratory diseases. Integration of services*”, 20-21 decembrie 2023, Chișinău, Republica Moldova; Conferința națională „Sănătatea și fenomenul rezistenței la antimicrobiene în țările cu venituri mici și medii din Europa de Est”, 27 ianuarie 2024, Chișinău, Republica Moldova; Conferința științifică națională cu participare internațională cu genericul: „Prevenirea și controlul infecțiilor asociate asistenței medicale”, 19-20 septembrie 2024, Chișinău, Republica Moldova; Simpozionul științifico-practic „Lecturi AGEPI” cu genericul „Rolul proprietății intelectuale în stimularea creativității și vinovăție”, 16 aprilie 2025, Chișinău, Republica Moldova.

Participarea la organizarea atelierului regional de instruire PulseNet privind secvențierea genomului bacterian, utilizând platforma Illumina MiSeq și analiza bioinformatică, destinat țărilor din Europa de Est și Asia Centrală 23-27 iunie 2025, Chișinău, Republica Moldova.

#### **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.

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

## 1.1. Biologia virusului SARS-CoV-2. Evoluția genetică

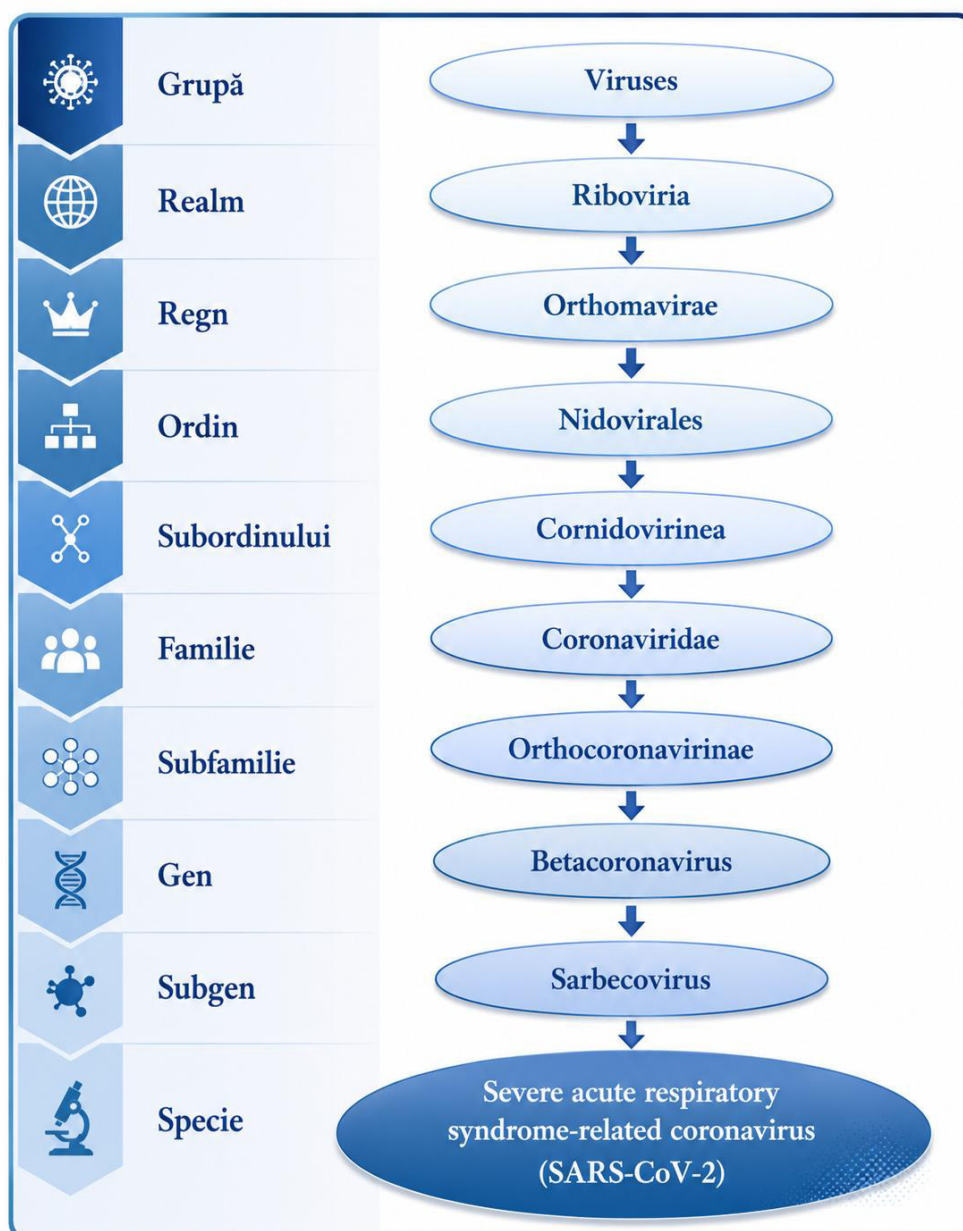
La 11 martie 2020, OMS a declarat pandemia de coronavirus (cunoscută și ca pandemia de COVID-19) provocată de un nou tip de coronavirus – *severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2* (2019-nCoV, prescurtat SARS-CoV-2) [31].

Coronavirusurile sunt virusuri cu genom de acid ribonucleic (ARN) monocatenar, învelite, capabile să infecteze o gamă largă de gazde, inclusiv animale sălbatice, animale domestice și oameni. Trăsăturile distinctive ale coronavirusurilor constau în capacitatea de a muta rapid, de a-și modifica tropismul tisular, de a traversa barierele speciilor, afectând o gamă diversă de gazde din categoria animală, și de a se adapta la diferite situații epidemiologice. Aceste virusuri au cel mai mare genom dintre toate virusurile ARN, acesta numărând circa 30 000 de perechi de baze [32].

Comitetul Internațional pentru Taxonomia Virusurilor (ICTV) a determinat următoarea apartenență taxonomică a virusului SARS-CoV-2 (figura 1): subgenul *Sarbecovirus*, genul *Betacoronavirus*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, familia *Coronaviridae*, subordinul *Cornidovirinae*, ordinul *Nidovirales*, regnul — *Orthornavirae*, realm — *Riboviria*, grupul — *Viruses*.

Familia *Coronaviridae* include patru genuri: *Alphacoronavirus* ( $\alpha$ -CoV), *Betacoronavirus* ( $\beta$ -CoV), *Deltacoronavirus* ( $\delta$ -CoV) și *Gammacoronavirus* ( $\gamma$ -CoV). Relațiile filogenetice formează o cladă în subgenul *Sarbecovirus*, subfamilia *Orthocoronavirinae*.

Analiza evolutivă a arătat că rezervorul natural al coronavirusurilor  $\alpha$ -CoV și  $\beta$ -CoV sunt lilieci și rozătoarele, iar a  $\gamma$ -CoV și  $\delta$ -CoV – unele specii de păsări. Secvențierea ulterioară a genomului viral, împreună cu alte rapoarte, au arătat că virusul SARS-CoV-2 este în proporție de 75-80 % identic cu SARS-CoV, fiind mai strâns asociat cu diferite coronavirusuri de lilieci [33,34].



**Figura 1. Clasificarea taxonomică a virusului SARS-CoV-2**

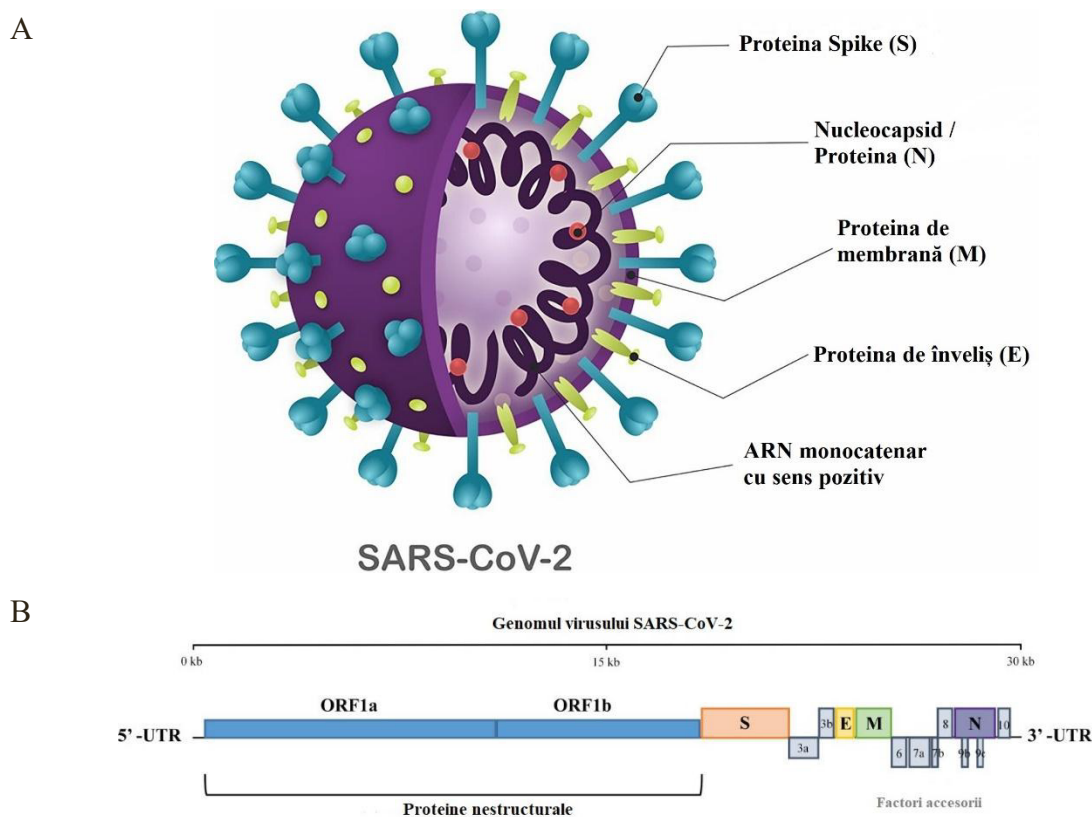
Din coronavirusurile animale, cunoscute de peste 80 de ani, fac parte virusul gastroenteritei transmisibile porcine (TGEV), coronavirusul bovin (BCoV) și coronavirusul felin (FCoV). Două coronavirusuri umane (HCoV) – HCoV-229E și HCoV-OC43 – erau cunoscute înainte de pandemia de SARS-CoV, iar altele două, HCoV-NL63 și HCoV-HKU1, au fost descoperite în 2004–2005 în speciile clinice. Conform estimărilor, toate coronavirusurile umane provin de la lilieci, cu excepția liniei beta-CoV, care ar putea avea rezervoare la rozătoare și provoacă la om boli respiratorii [35,36].

Genomul SARS-CoV-2, cu lungimea de ~ 29,9 kb și compus din șase cadre deschise de citire (ORF, comune pentru toate speciile de coronavirus) și o serie de gene accesorii, codifică 29 de proteine, dintre care 16 nestructurale (NSP1–NSP16), necesare pentru realizarea ciclului

de viață al virusului, patru proteine structurale și nouă factori proteici auxiliari (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c și ORF10) [37,38].

Codificarea proteinelor nestructurale este responsabilitatea a două cadre deschise de citire, ORF1a și ORF1b, de la capătul 5' al genomului, iar de codificarea proteinelor structurale răspund genele de la capătul 3'.

Cele patru proteine structurale majore ale virusului SARS-CoV-2 sunt următoarele: S (proteina spiculelor sau proteina Spike), E (proteina de înveliș), M (proteina de membrană) și N (proteina nucleocapsidei). Proteina N împreună cu ARN-ul viral formează nucleocapsida virusului, iar proteinele S, E, M și N – învelișul acestuia (figura 2) [37,39].



**Figura 2. Structura (A) și genomul (B) virusului SARS-CoV-2 [40]**

Fiecare proteină structurală a virusului SARS-CoV-2 are specificul său:

- **Proteina M**, formată din 230 de aminoacizi și cu masa moleculară de 25-30 kDa, este cea mai mare proteină de pe suprafața virusului și care îi dă formă. Ea are o structură similară cu proteina M a virusurilor MERS-CoV și SARS-CoV în proporție de 39,2 % și, respectiv, 90,1 % [41,42].
- **Proteina S** (Spike) este un trimer glicoproteic cu un rol esențial în pătrunderea virusului în celula-gazdă. În timpul infectării virale, proteina S este scindată de proteaza furina a celulei-gazdă în două subunități: S1 și S2. Subunitatea S1, domeniul mare al proteinei S care joacă un rol important în legarea virusului de celulele-gazdă, include un domeniu

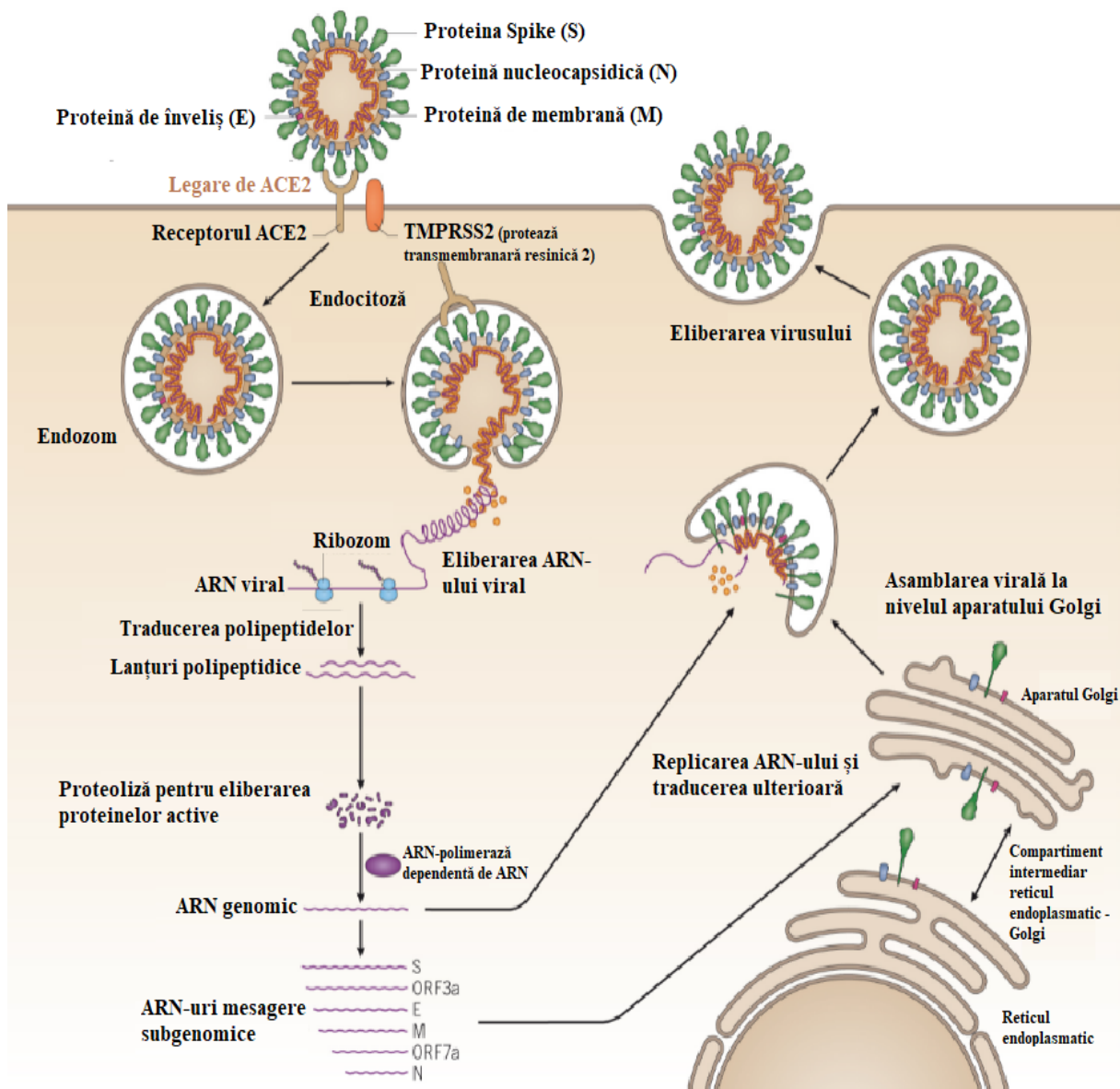
N-terminal extracelular (NTD) și un domeniu de legare la receptor (RBD), responsabil de recunoașterea și de atașarea la receptorul ACE2 de pe suprafața celulelor umane. Subunitatea S2 asigură procesul de fuziune a membranelor virale și celulare, ceea ce permite virusului să introducă materialul său genetic în celula-gazdă [37,42,43].

- **Proteina E** (proteina de înveliș), o proteină structurală mică compusă din 74-109 de aminoacizi și cu o masă moleculară cuprinsă între 8,4 și 12 kDa, joacă un rol important în asamblarea noilor virioni în celula infectată, prin participarea la formarea învelișului viral al particulelor virale și eliberarea lor din celulă. Eliminarea acestei proteine slăbește sau chiar anulează virulența virusului [44,45].
- **Nucleocapsida** (proteina N) joacă un rol esențial în ciclul replicativ al virusului și este un marker serologic extrem de important în detectarea acestuia. Funcția principală a proteinei N este încapsularea genomului viral ssARN pentru a evita detectarea imună și pentru a proteja ARN-ul viral de degradarea de către factorii gazdei. Proteina N are două domenii structurale: domeniul N-terminal (NTD, resturi ale aminoacizilor 44-176) și domeniul C-terminal (CTD, resturi ale aminoacizilor 248-369) [46].

Cele șase cadre deschise de citire (ORF) care codifică proteinele principale ale virusului sunt aranjate de la capătul 5' la capătul 3' în următoarea ordine: replicază (ORF1a/ORF1b), spike (S), înveliș (E), membrană (M) și nucleocapsidă (N) (figura 1B). Șapte ORF, care codifică proteine auxiliare, sunt dispersate între genele structurale.

Majoritatea proteinelor codificate de SARS-CoV-2 au o lungime similară cu proteinele corespunzătoare codificate de SARS-CoV. Din cele patru gene structurale ale SARS-CoV-2, peste 90 % sunt identice cu cele ale SARS-CoV, cu excepția genei S. Gena replicazei ocupă două treimi din capătul 5' al genomului și codifică o poliproteină mare (pp1ab), care este scindată proteolitic în 16 proteine nestructurale implicate în transcripția genomului viral în ARN<sub>m</sub> și în replicarea virusului. Majoritatea proteinelor nestructurale ale SARS-CoV-2 au o identitate de peste 85 % a secvenței aminoacizilor cu SARS-CoV [47,48,49].

**Ciclul de replicare al virusului SARS-CoV-2.** Pătrunderea virusului SARS-CoV-2 în celulele-gazdă are loc prin interacțiunea dintre glicoproteina de suprafață a virusului (proteina S) și receptorii de suprafață ai celulelor-gazdă – enzima de conversie a angiotensinei 2 (ACE2) (figura 3).



**Figura 3. Mecanismul de replicare a virusului SARS-CoV-2 [50]**

Pentru a interacționa cu receptorii celulei-gazdă, proteina S a virusului SARS-CoV-2 trebuie activată. Acest rol revine unor proteaze precum proteaza serina transmembranară 2 (TMPRSS2), o protează serinică de suprafață celulară care acționează asupra proteinei S și o face capabilă de fuziune cu celula-gazdă.

După adsorbția și dezasamblarea virusului, două poliproteine virale sunt asamblate de către ribozomii celulei-gazdă. Cu ajutorul proteazelor gazdei și ale virusului, aceste poliproteine sunt dissociate în proteine virale nestructurale mai mici, cum ar fi RdRp. Fiind principala enzimă codificată de genomul viral, RdRp este utilizată pentru replicarea genomului viral, precum și pentru sinteza de ARNm subgenomic prin transcripție discontinuă. ARNm subgenomic asigură sinteza proteinelor structurale virale prin procesul de translație. Proteinele virale nou formate se concentrează în jurul moleculelor de ARN genomic. Astfel, în celula-gazdă, în

compartimentul dintre reticulul endoplasmatic (ER) și aparatul Golgi, sunt asamblați virioni noi, transportați, prin vezicule cu pereți netezi, din celule prin exocitoză [51,52,53,54].

**Evoluția SARS-CoV-2.** La fel ca și majoritatea virusurilor ARN, coronavirusurile evoluează rapid, pe o perioadă de timp cuprinsă între luni și ani, comparabilă cu evenimentele de transmitere a virusului și dinamica ecologică (cum ar fi schimbările în numărul de persoane infectate în timp, profilurile de imunitate și mobilitatea persoanelor) [55,56].

La baza evoluției oricărui virus stau mutațiile, greșelile care apar în timpul replicării acestuia. Ele sunt determinate de schimbările mutaționale în moleculele de ARN, fiind clasificate în mutații punctiforme și evenimente recombinante. Mutațiile punctiforme, substituțiile, delețiile și inserțiile, reprezintă un proces mutațional care apare ca urmare a unei erori de replicare sau de reparare a ARN-ului și pot modifica diverse aspecte ale biologiei virusului, cum ar fi patogenitatea, infecțiozitatea, transmiterea și/sau antigenitatea. De exemplu, deleția în poziția 69-70 a genei Spike a dus la apariția variantei SARS-CoV-2 Alpha care, conform rapoartelor, se distinge printr-o infecțiozitate crescută [57,58,59,60,61].

Factorul-cheie, care determină viteza de evoluție a unui virus, este viteza mutațiilor sale. În cazul virusului SARS-CoV-2, aceasta este de aproximativ  $1 \times 10^{-6}$ -  $2 \times 10^{-6}$  mutații pe nucleotid pe ciclu de replicare, plasându-se sub intervalul de viteze tipice pentru alte virusuri ARN, cum ar fi virusul hepatitei C (VHC;  $\sim 10^{-5} \times 10^{-6}$  mutații pe nucleotid pe ciclu de replicare) și virusul imunodeficienței umane (HIV;  $\sim 10^{-4} \times 10^{-6}$  mutații pe nucleotid pe ciclu de replicare) [56,62,63].

**Recombinarea** contribuie în mod semnificativ la evoluția coronavirusurilor, inclusiv a virusului SARS-CoV-2, variantele recombinante ale acestuia fiind înregistrate în diferite țări, unele dintre ele devenind forme circulante. Ca urmare a evenimentelor de recombinare, în aceeași celulă apar genotipuri himere a două sau mai multe variante ale virusului. Astfel, apar noi variante unice de genomi, care conțin combinații de mutații din diferite tulpini. Ca urmare a acestui proces, pot apărea virusuri cu indicatori modificați atât în ceea ce privește transmiterea, cât și virulența [64].

**Substituțiile** au fost studiate intens în legătură cu modificările structurii și/sau funcției proteinelor virale care, la rândul lor, duc la modificarea virulenței, proprietăților antigenice sau a transmiterii virusului. Pe baza substituțiilor, virusurile au fost împărțite în peste 1593 de linii Pango cu identitate a secvențelor, a legăturilor filogenetice, precum și a structurii geografice și a cronologiei. Câteva linii, determinate de substituțiile N501Y și E484K, provoacă modificări ale aminoacizilor care intensifică legarea proteinei S de receptorul ACE2, variantele devenind cu 70 % mai contagioase decât linia anterioară. Printre aceste linii, pe baza capacității de transmitere, a patogenității și a impactului asupra vaccinurilor, OMS a identificat mai multe

variante ale SARS-CoV-2 care prezintă motive de îngrijorare (VOC), inclusiv Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) și Delta (B.1.617.2), precum și variante de interes (VOI), precum Epsilon (B.1.429 + B.1.427), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) și Mu (B.1.621) [65,66,67].

La începutul formării variantelor SARS-CoV-2, mutația D614G din gena S a contribuit la răspândirea rapidă a virusului și a devenit prima mutație care s-a păstrat în toate variantele ulterioare ale virusului. Această mutație se caracterizează prin înlocuirea acidului aspartic cu glicină în poziția 614 din proteina S. Reziduul 614, situat la interfața dintre subunitățile S1 și S2 ale proteinei S, poate afecta interacțiunea lor și stabilitatea proteinei S. Prezența acestei mutații este asociată cu o încărcătură virală ridicată la pacienții infectați și cu o infecțiozitate sporită care nu corelează cu severitatea bolii [68,69].

**Delețiile** din proteinele responsabile de invazia celulelor, cum ar fi proteina Spike, pot modifica interacțiunea dintre gazdă și agentul patogen, ceea ce duce la creșterea nivelului de infecțiozitate și la o evoluție potențial mai gravă a bolii, deoarece tropismul virusului este influențat de expresia tisulară a receptorilor-țintă [70,71,72].

Capacitatea de transmitere a virusului/infecțiozitatea poate fi crescută prin deleții critice ale domeniului non-RBD al proteinei Spike S1, contribuind concomitent la evitarea răspunsului imun, după cum demonstrează scăderea eficacității testelor de neutralizare bazate pe anticorpi, provocate de variantele de tip sălbatic. O deleție, cum ar fi S:del69/70, deși nu explică evitarea răspunsului imun, crește infecțiozitatea S2 și a spiculei clivate. Delețiile S:del156/157 și S:del144 sunt cartografiate pe aceeași suprafață a proteinei Spike – domeniul NTD. Se presupune că deleția acestor zone contribuie la perturbarea legării anticorpilor monoclonali în analizele de neutralizare [70,71,72,73,74].

Pentru alte proteine structurale, precum E, M și N, efectul experimental al deleției în aceste zone este minim sau inexistent. Rahman și colab. au raportat multiple deleții în proteina nucleocapsidă în probe provenite din mai multe țări în perioada martie-mai 2020. Autorii au prezis, folosind o abordare *in silico*, că modificările de la suprafața situată în apropierea domeniului C-terminal al genei codificatoare pot avea un impact semnificativ asupra patogenezii virusului și a interacțiunii nucleocapsidei cu ARN. Deleția a 12 perechi de baze din proteina E determină atât un conținut crescut de proteină S, cât și o reglare crescută în principal a citokinelor IL-6, CSF2 și CXCL10, precum și un nivel mai ridicat de E-selectină și de PTX3 în comparație cu tulpina de tip sălbatic. Pentru proteina M nu s-au găsit date experimentale sau *in silico* privind efectul delețiilor [70,71,72,73,74,75,76,77].

**Insertiile**, ca și substituțiile și delețiile de aminoacizi, în special în proteina Spike, pot provoca creșterea transmisibilității și patogenității virale a virusului SARS-CoV-2.

Conform datelor din literatură, mutațiile de inserție în comparație cu alte tipuri de mutații au fost întâlnite mai rar, cu mai puțin de 0,1% în rândul tuturor mutațiilor [78].

Cu toate acestea, în urma evoluției genomului SARS-CoV-2 au fost detectate inserțiile care au avut impact semnificativ asupra proprietăților fenotipice ale virusului. Una dintre cele mai importante mutații funcționale din istoria evolutivă a SARS-CoV-2 de până acum a fost inserția proteinei Spike „prezența a patru reziduuri” (PRRA) în situsul de clivaj S1/S2, care a introdus situsul de clivaj polibazic al furinei, care poate duce la un tropism neașteptat al țesuturilor sau al gazdei. Această inserție joacă un rol important în transmiterea SARS-CoV-2, cel puțin parțial prin facilitarea unei căi de intrare independente de endozomi în celulele epiteliale respiratorii, care ocolește răspunsurile antivirale înnăscute importante [79].

## 1.2. Clasificarea și nomenclatura variantelor virusului SARS-CoV-2

Rata ridicată de mutație a virusului SARS-CoV-2 face necesară o clasificare a genomului viral în linii, în grupuri sau în clade. OMS a propus utilizarea în acest scop a alfabetului grecesc, alte sisteme de nomenclură răspândite fiind recomandate de GISAID, PANGO și Nextstrain.

Pentru a identifica variantele care prezintă un risc mai mare pentru sănătate, OMS a evidențiat două tipuri principale de variante ale SARS-CoV-2: variante de îngrijorare (VOC) și variante de interes (VOI). Astfel, variantele Alpha, Beta, Delta, Gamma și Omicron sunt definite ca VOC, iar variantele Epsilon, Kappa, Iota, Eta, Lambda și Mu sunt clasificate ca VOI (figura 4). Subliniile cele mai recente ale variantei Omicron KP.3, KP.3.1.1, XEC, LP.8.1, NB.1.8.1, XFG sunt la etapa de monitorizare (VUM) [80,81].

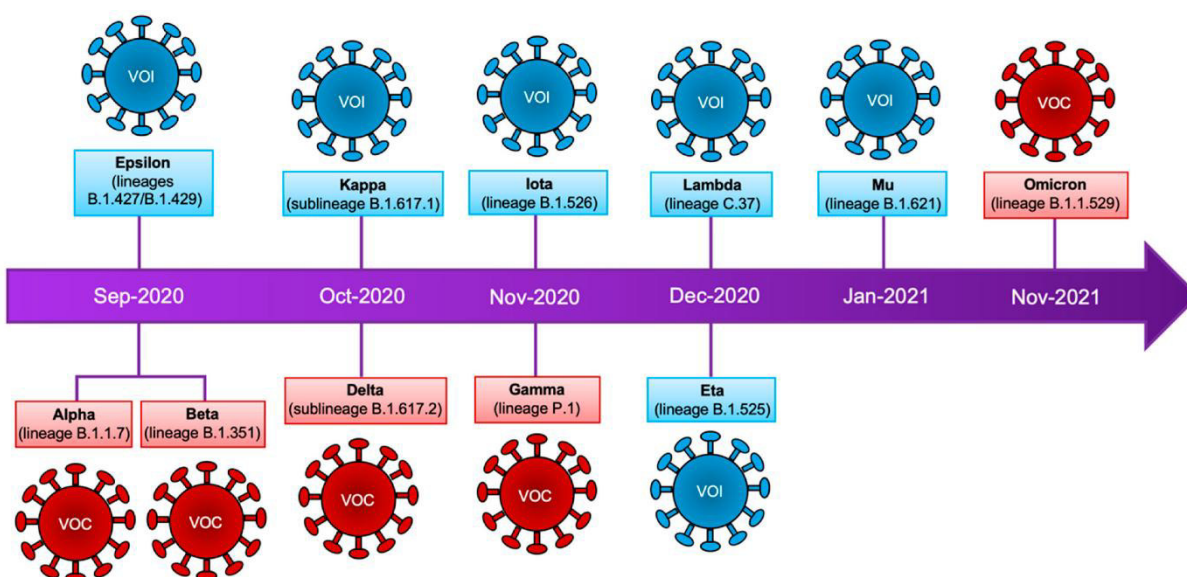


Figura 4. Clasificarea variantelor virusului SARS-CoV-2 conform OMS [82]

**Centrul Global pentru Controlul și Prevenirea Bolilor (CDC)** definesc virusul SARS-CoV-2 ca fiind unul cu transmitere și cu virulență crescute, severitate a simptomelor bolii (de exemplu, rată crescută de spitalizare și de decese), eficiență scăzută a anticorpilor (neutralizare și diagnostic), eficacitate redusă a tratamentelor și a protecției induse de vaccinurile disponibile. Variantele SARS-CoV-2 care modifică afinitatea de legare a receptorilor, cresc transmiterea (transmitere comunitară ridicată) și severitatea bolii, prejudiciind afinitatea anticorpilor pentru proteina Spike și favorizând evadarea imună, precum și eficacitatea diagnosticului actual, sunt considerate VOI-uri [83].

Nomenclatura **PANGO**, desemnată pentru a identifica liniile circulante actuale ale virusului SARS CoV-2, utilizează denumirea liniei genealogice începând cu litera A sau B. Astfel, cele mai vechi secvențe ale virusului din Wuhan au fost desemnate ca linia A (Wuhan/WH04/2020; acest eșantion a fost obținut la 5 ianuarie 2020; număr de acces GISAID EPI\_ISL\_406801) și linia B (reprezentată de Wuhan-Hu-1; eșantionul a fost obținut la 26 decembrie 2019; număr de acces GenBank MN908947). Liniilor ulterioare li s-au atribuit numere, de exemplu, B.1, B.2 etc., sau litere, în funcție de sistemul utilizat [84,85].

**GISAID** clasifică noile variante ale SARS-CoV-2 în clade care sunt determinate de distribuția statistică a distanței genomilor virali în clusterelor filogenetice, urmată de reunirea liniilor mai mici în clade principale. Astfel, variantele virale ale SARS CoV-2 sunt clasificate în opt grupuri filogenetice de nivel înalt, începând cu divizarea timpurie S și L, apoi prin evoluția L în V și G, mai târziu G în GH, GR și GV, și mai recent GR în GRY [86].

**Nextstrain** clasifică SARS-CoV-2 în 25 de clade: 19A, 19B, 20A-20I, 21A-21M, 22A-22F, 23A - 23I, 24A - 24I, 25A - 25C. O cladă este creată atunci când o nouă variantă atinge o frecvență globală de 20 %. Numărul cladei este asociat cu anul apariției variantei noi, iar pentru nume se utilizează următoarea literă din alfabet. Pentru a defini o nouă cladă, varianta trebuie să aibă două mutații noi asociate cu clada parentală principală. Astfel, cladele principale pe ani sunt definite de anul apariției lor și de literă, de exemplu, 19A, 19B sau 20A etc [87].

**Variantele de îngrijorare (VOC) ale virusului SARS-CoV-2.** Variantele Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) și Omicron (B.1.1.529) au fost identificate și clasificate de OMS ca variante de îngrijorare (VOC). Toate aceste variante au fost studiate foarte detaliat din cauza contagiozității, virulenței și a rezistenței crescute la anticorpii neutralizanți [37].

**Varianta Alpha.** Varianta B.1.1.7, prima variantă care a prezentat motive de îngrijorare, cunoscută sub numele de varianta Alpha sau GRY (GISAID), a fost înregistrată pentru prima dată în sud-estul Regatului Unit în septembrie 2020, devenind în scurt timp varianta dominantă și răspândindu-se în întreaga lume. La 18 decembrie 2020, OMS a desemnat-o ca variantă de

interes caracterizată prin prezența a circa 17 mutații în genomul viral, majoritatea, inclusiv delețiile H69-V70, Y144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A și D1118H, fiind descoperite în proteina Spike, în comparație cu virusul inițial izolat în China. Dintre toate mutațiile depistate în genomul variantei Alpha, mutația N501Y joacă un rol extrem de important în majorarea afinității de legare a proteinei S cu receptorii hACE-2 și în creșterea capacității de a pătrunde în celulele-gazdă [88,89,90,91,92].

**Varianta Beta** (B.1.351), cunoscută și sub numele de B.1.351, a fost identificată pentru prima dată în Africa de Sud în mai 2020, fiind raportată la OMS în decembrie 2020. Din cauza celor nouă mutații (delețiile L242\_L244, D80A, D215G, K417N, E484K, N501Y, D614G și A701V) în proteina Spike, comparativ cu virusul original SARS-CoV-2, care au afectat transmiterea și evaziunea imună, a fost catalogată ca variantă îngrijorătoare. Trei mutații (K417N, E484K și N501Y), localizate în domeniul de legare a receptorului (RBD), cresc afinitatea de legare cu receptorii hACE-2 și riscul de transmitere, iar mutația E484K facilitează evitarea anticorpilor, acesta fiind principalul motiv al sensibilității reduse la vaccinuri a acestei variante a virusului SARS CoV-2 [93,94,95,96,97].

**Varianta Gamma** (linia P.1), detectată pentru prima dată în Manaus, Brazilia, în noiembrie 2020 și raportată la OMS în ianuarie 2021, a fost etichetată ca îngrijorătoare din cauza răspândirii rapide în America de Sud și a potențialului înalt de evaziune imună. Banho și coaut. au atras atenția la transmiterea crescută a acestei variante implicată în apariția unui nou val de infecție în regiuni unde anterior au fost înregistrate rate ridicate de infecție, sugerând un risc crescut de reinfectare. Varianta Gamma are 12 mutații în proteina Spike (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I și V1176F). Mutațiile L18F, K417N/T, E484K, N501Y și D614G, localizate în regiunea RBD, au semnificații importante în transmiterea virusului și în rata de reinfectare [98,99,100,101,102,103].

**Varianta Delta** (B.1.617.2), identificată pentru prima dată în octombrie 2020 în India, la 11 mai 2021 a fost declarată de OMS ca variantă de îngrijorare, devenind în scurt timp o variantă predominantă în toată lumea. Bian și coaut., precum și Shiehzedegan și coaut., au estimat că varianta Delta este cu până la 60 % mai transmisibilă decât varianta Alpha. Varianta Delta a prezentat 23 de mutații noi, în comparație cu varianta Alpha, dintre care 12 au vizat proteina Spike, crescându-i afinitatea de a se lega de receptorul ACE2 [104,105,106,107].

Tian și coaut. au identificat în genomul variantei Delta următoarele mutații semnificative în proteina S: T19R, T95I, G142D, E156G, Del157/158, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N. Fiecare dintre aceste mutații exercită o anumită funcție. Astfel, mutația L452R sporește capacitatea virusului de a se lega de receptorul ACE2, crescându-i infecțiozitatea; mutația T478K este asociată cu evadarea imună, permițând virusului să evite parțial anticorpii

neutralizanti; mutația P681R, situată în apropierea locului de clivaj al furinei, facilitează o pătrundere mai eficientă a virusului în celulele-gazdă; mutațiile N:D63G și RdRp:G671S amplifică încărcătura virală [108].

**Varianta Omicron (B.1.1.529)**, identificată pentru prima dată pe 11 noiembrie 2021 în Botswana, Africa, a ieșit în evidență prin numărul mare de mutații, în special în proteina Spike – ținta principală a majorității vaccinurilor anti-COVID-19 –, ceea ce i-a permis virusului să se răspândească rapid, evadând de sub supravegherea răspunsului imun și a vaccinărilor anterioare, generând valuri semnificative de infecție.

Karimizadeh și Abudunaibi au demonstrat că Omicron este mai transmisibil decât varianta anterioară Delta. Astfel, dacă pentru varianta Delta R0, care indică numărul mediu de persoane cărora o singură persoană infectată le va transmite virusul, măsură-cheie a transmiterii, a fost estimat între 5 și 8, indicând un nivel ridicat de transmitere, atunci pentru Omicron acest indice a fost cu mult mai mare [109,110].

Cercetătorii danezi Ito cu colab. au estimat că numărul de reproduceri efective ale genomului variantei Omicron este de aproximativ 3,19 ori mai mare decât în cazul variantei Delta [111]. Ulterior, Lino A. și colab. au constatat că varianta Omicron este de 4,2 ori mai transmisibilă decât varianta Delta [112]. Acest fapt explică de ce Omicron a cauzat, în general, o formă mai ușoară a bolii COVID-19 decât variantele anterioare, dar s-a distins printr-o transmitere mai ridicată [113,114,115,116].

În cadrul variantei Omicron au apărut mai multe subvariante, fiecare cu un profil genetic distinctiv. Subvarianta KP.2 (JN.1.11.1.2) s-a evidențiat prin potențialul de a evada imunitatea existentă și răspândirea rapidă în anumite regiuni. Considerată o descendentă a subvariantei Omicron BA.2.86, neoficial numită „Pirola”, și a JN.1, a fost detectată pentru prima dată pe 2 ianuarie 2024 în India și a fost inclusă în variantele aflate sub monitorizare (VUM). Cea mai recentă sublinie XFG a fost desemnată ca o variantă SARS-CoV-2 aflată sub monitorizare (VUM) cu proporții tot mai mari la nivel global. Având în vedere dovezile disponibile, riscul suplimentar pentru sănătatea publică reprezentat de XFG este evaluat ca fiind scăzut la nivel global [117,118,119,120].

### **1.3. Epidemiologia moleculară a virusului SARS-CoV-2**

Pe 31 decembrie 2019, guvernul chinez a recunoscut numeroase cazuri de pneumonie de etiologie necunoscută, presupusă a fi o boală zoonotică, care ulterior avea să fie numită COVID-19, în orașul Wuhan. Primul caz de deces de pe urma acestei pneumonii a fost raportat pe 11 ianuarie 2020, iar la 23 ianuarie orașul Wuhan, cu peste 11 milioane de locuitori, a fost închis. O săptămână mai târziu au fost raportate mii de cazuri, iar OMS a declarat imediat o stare de urgență globală în sănătate [121].

Infecția COVID-19 reprezintă o boală periculoasă pentru societate din cauza contagiozității ridicate și a potențialei amenințări pentru sănătatea publică. Dovezile actuale indică faptul că virusul SARS-CoV-2 s-a răspândit la om prin transmitere de la animale sălbatice vândute ilegal pe piața angro de fructe de mare din Huanan. Sursa principală de infecție se consideră omul bolnav sau persoanele asimptomatice. Principalele mecanisme de transmitere a virusului sunt picăturile aeriene, praful din aer și contactul (implicând pătrunderea virusului în ochi, în nas, în nazofaringe și în orofaringe) [122].

Studiile au arătat că virusul SARS-CoV-2 are capacitatea de a persista în mediu pentru perioade lungi de timp. Conform datelor publicate de Zolin și coaut., virusul SARS-CoV-2 poate rămâne contagios pe diverse suprafețe la temperaturi de 24-28 °C cel puțin 48 de ore. Într-un mediu lichid, activitatea sa se menține până la șapte zile. Stabilitatea virusului depinde și de pH-ul mediului. Într-un interval de valori ale pH-ului de la 5 la 9, virusul rămâne stabil până la șase zile, iar la valori mai extreme, de 4,0 și de 11,0, stabilitatea sa se reduce la două zile [121,122]. Virusul SARS-CoV-2 s-a dovedit a fi sensibil la radiațiile ultraviolete și la dezinfectanți care, utilizați în concentrații de lucru adecvate, pot preveni răspândirea infecției [122,123,124,125].

**Perioada de incubație.** Conform Protocolului clinic național „Infecția cu coronavirus de tip nou (COVID-19)”, Chișinău, 2025, perioada de incubație a virusului SARS-CoV-2 este, în medie, de cinci zile (2-14 zile) [118]. Li și colab., studiind dinamica transmiterii timpurii a COVID-19, au relevat că perioada medie de incubație a virusului este de 5,2 zile [122]. Backer, studiind debutul simptomelor în 88 de cazuri confirmate de COVID-19, a înregistrat o perioadă medie de incubație similară, de 6,4 zile [123]. Bai și colab. au raportat și un caz neobișnuit, în care perioada de incubație a virusului a fost de până la 19 zile [124]. Trebuie menționat faptul că perioada de incubație poate varia în funcție de vârstă și de doza infecțioasă, iar varianta Omicron și unele sublinii ale acestuia modifică aceste valori [126,127,128].

**Perioada de infecțiozitate.** Conform datelor din literatura de specialitate, durata perioadei de infecțiozitate, perioada în care un pacient cu COVID-19 rămâne infecțios, este diferită, acesta putând elimina virusul chiar și după dispariția simptomelor. Cercetătorul chinez Zhou a stabilit că în timpul pandemiei durata mediană a eliminării virusului în rândul supraviețuitorilor a fost de 20 de zile [125]. Du și colab. au identificat ca factori de risc pentru eliminarea virală prelungită genul masculin, spitalizarea de lungă durată și ventilația mecanică invazivă [127,129,130].

**Factori de risc ai infecției COVID-19.** Infecția cu SARS-CoV-2 are un spectru clinic larg de la asimptomatică, oligosimptomatică până la boală moderată sau chiar severă, cu insuficiență multiorganică. Rata infecțiilor asimptomatice cu SARS-CoV-2 a fost estimată pe

baza urmăririi intensive a focarelor regionale și retrospectiv în studii de seroprevalență. Astfel, numeroase cercetări au arătat că pe durata pandemiei ratele infecțiilor asimptomatice a variat între 27 și 40 %. În general, evaluarea impactului pandemiei a arătat că aproximativ 90 % dintre infecțiile cu acest virus au fost necomplicate, oligosimptomatice sau cu simptome moderate care nu au necesitat spitalizare [131,132,133].

Factori de risc pentru formele severe de COVID-19 s-au dovedit a fi vârsta înaintată, hipertensiunea arterială, bolile cardiace sau pulmonare cronice și imunosupresia. Ratele de spitalizare au variat, în diferite populații, între 4 și 7 %, iar 25 % dintre pacienții spitalizați au necesitat terapie intensivă, cu o rată ridicată de terapie de substituție a funcției organelor (75 % – ventilație invazivă, 25 % – terapie de substituție renală) [134,135,136].

Printre factorii de risc ai infecției COVID-19 se numără factorii de mediu, virali și cei legați de organismul-gazdă. Aglomerarea umană, expunerea ocupațională, ventilația deficitară și contactul cu animalele reprezintă factorii de mediu care influențează răspândirea virusului. Factorii de risc virali sunt asociați cu evoluția rapidă a virusului SARS-CoV-2 pe parcursul pandemiei și includ capacitatea de transmitere, mutațiile evazive și încărcăturile virale asociate cu o anumită variantă [137].

Factorii legați de gazdă includ vârsta, variația genetică umană, sexul biologic și sarcina, comorbiditățile netransmisibile, coinfecții și/sau superinfecții, fragilitatea, istoricul imunologic, microbiota și stilul de viață al pacientului. Diferite studii științifice au demonstrat rolul semnificativ al diferitor factori legați de gazdă în dezvoltarea și severitatea bolii. Au fost identificați cei mai frecvent întâlniți factori de risc pentru formele severe ale bolii, inclusiv vârsta înaintată, obezitatea și imunodeficiența [138].

Vaccinarea este considerată una dintre cele mai eficiente măsuri de protecția a indivizilor și a populațiilor de riscurile asociate cu expunerea la diverși agenți patogeni. Dezvoltarea și implementarea rapidă a vaccinurilor împotriva infecției COVID-19 și a noilor opțiuni de tratament a contribuit semnificativ la scăderea atât a ratelor de infecție, cât și a mortalității în timpul pandemiei, salvând milioane de vieți [139].

Impactul global al COVID-19, cu sute de milioane de cazuri confirmate și peste șapte milioane de decese, a stârnit un interes științific semnificativ. Cercetătorii s-au concentrat pe înțelegerea patogenzei bolii, a epidemiologiei și a evoluției acesteia în funcție de vârstă sau de afecțiunile clinice preexistente. O atenție deosebită se acordă explorării metodelor de prevenire și de tratament a infecției cu SARS-CoV-2 [140].

#### **1.4. Metode de diagnostic a infecției cu SARS-CoV-2, de analiză filogenetică și de bioinformatică**

Identificarea agenților patogeni poate fi prin imagistică, prin izolare virală și detectarea culturilor, detectarea prin biologie moleculară a ARN-ului viral și depistarea imunologică bazată pe reacția antigenului viral și a anticorpilor [141,142].

**Teste pentru depistarea virusului SARS-CoV-2.** În timpul pandemiei de COVID-19 au fost dezvoltate numeroase teste pentru depistarea virusului SARS-CoV-2, inclusiv teste de amplificare a acidului nucleic (NAAT), teste de antigen și teste de detectare a anticorpilor. NAAT și testele de antigen sunt utilizate pentru a depista prezența ARN-ului viral, iar testele de detectare a anticorpilor au ca scop depistarea anticorpilor pe care organismul-gazda îi produce împotriva SARS-CoV-2 [122].

Trebuie menționat faptul că testele de antigen pot fi utilizate pentru a detecta rapid infecția cu SARS-CoV-2, însă sensibilitatea și specificitatea lor sunt net inferioare testelor NAAT, considerate „standardul de aur” în diagnosticarea COVID-19. Această metodă de diagnostic utilizează probe nazo- sau orofaringiene, în care transcriptaza inversă transformă ARN-ul extras în ADN complementar (ADNc). Ulterior, o secvență-țintă este amplificată, folosind ADN polimerază și primeri specifici. Pentru a spori fiabilitatea testului, este recomandabil să se amplifice două sau mai multe gene, inclusiv una specifică și una conservată. Astfel au fost dezvoltată o varietate de teste RT-qPCR care utilizează diverse combinații de gene. În prezent, există numeroase kituri RT-PCR comerciale care detectează genele virusului SARS-CoV-2 pentru stabilirea diagnosticului de laborator [122,143,144].

Metodele clasice de diagnosticare oferă date despre prezența sau absența virusului/ anticorpului în proba umană, dar nu și informații despre varianta sau mutația virusului pe care cercetătorii din domeniul sănătății publice le pot utiliza pentru modelarea transmiterii și luarea deciziilor de politici publice. Astfel, implementarea și utilizarea metodelor de secvențiere de generație următoare (NGS), prin care se determină secvența genomului agentului patogen, furnizează mult mai multe informații decât procedurile standard de testare, inclusiv pentru dezvoltarea de terapii și de vaccinuri, monitorizarea modificărilor virusului pe măsură ce acesta circulă în populație, și perspective mai profunde asupra tiparelor de transmitere în timp și geografic [145].

Metodele de secvențiere genomică permit urmărirea precisă a agenților patogeni, evaluarea riscurilor și formularea strategiilor de intervenție prin furnizarea de date genomice esențiale despre agenții patogeni. Aceste date nu numai că ajută la identificarea diferitor variante ale virusului, dar oferă și informații valoroase despre transmisibilitatea și severitatea acestora, ceea ce are un impact semnificativ asupra măsurilor de sănătate publică, cum ar fi

dezvoltarea vaccinurilor, studii epidemiologice și elaborarea unor politici specifice de sănătate publică [146,147].

La sfârșitul anilor 1970, metodele de secvențiere a ADN-ului, și anume secvențierea Sanger și utilizarea ruperii chimice, au fost prezentate de Edward Sanger și, respectiv, Maxam-Gilbert. În anul 2005, Roche a lansat tehnologia „454” mai rapidă, denumită „tehnologie de secvențiere de generație următoare”. În prezent există mai multe tehnologii de secvențiere care includ tehnologia de secvențiere de primă generație (tehnologia Sanger); tehnologia de secvențiere de generație următoare (NGS, Illumina și Ion Torrent); tehnologia de secvențiere de a doua generație (genomica tehnologică completă), tehnologia de secvențiere de a treia generație (*Oxford Nanopore Technology* (ONT) și tehnologia în timp real cu o singură moleculă (SMRT) [148,149].

Deci, diferite platforme tehnologice s-au impus ca soluții de referință, fiecare evidențiindu-se prin caracteristici adaptate unor aplicații biologice distincte.

*Sistemul Illumina.* Este cel mai răspândit sistem care datorează popularitatea acurateței excepționale oferite de metoda „sequencing by synthesis” pe bază de fluorescență, citirile scurte fiind în general livrate cu o precizie de aproximativ 99,9 %. Sistemele Illumina (de ex., HiSeq, NovaSeq și MiSeq) sunt folosite frecvent în proiecte de mare amploare datorită randamentului înalt și a costului eficient per bază [150].

Platforma Illumina de secvențiere prin sinteză (SBS) se bazează pe metoda de terminare reversibilă și presupune amplificarea fragmentelor de ADN studiate pe un suport solid (crearea de clustere), denaturarea acestora și apoi secvențierea lor folosind nucleotide de terminare marcate cu fluorocrom. Tipul de nucleotid atașat este determinat de emisia de fluorocrom, care este excitată de un impuls laser. Nucleotidul înregistrat este apoi modificat chimic pentru a permite următorului nucleotid de terminare să se atașeze la el și așa mai departe. Dispozitivul detectează fluorescența din sute de milioane de puncte de cluster simultan.

Acest tip de secvențiere este caracterizat de precizie ridicată, randament și un raport performanță-cost avantajos. Lungimea de citire este de până la 2×250 perechi de baze (Illumina MiSeq), la o rată de eroare de 0,5-2 %. Procesul de secvențiere cu tehnologia Illumina include patru etape principale: pregătirea probei, generarea de clustere, secvențierea și analiza datelor [151,152].

*Tehnologia Ion Torrent* reprezintă o secvențiere de ultimă generație care utilizează detectarea directă a ionilor de hidrogen eliberați în cursul încorporării nucleotidului, tradusă electronic printr-un senzor ISFET (*Ion-Sensitive Field-Effect Transistor*), evitându-se astfel utilizarea tehnicilor optice costisitoare. Această abordare conferă avantajele unui proces rapid, economic și compact [153].

Platforma Ion Torrent, fiind prima tehnologie care nu utilizează senzori optici, lumina acționând ca un mesager, pentru identificarea secvențierii semiconductoare folosește un sistem bazat pe detectarea ionilor de hidrogen, care sunt produse secundare ale adăugării de nucleotide la catena șablon în timpul polimerizării. Probele, care conțin ADN îmbogățit, sunt adăugate într-un microgodeu de pe cip. Microgodeurile cu molecula de ADN șablon care urmează să fie secvențiată sunt umplute cu un singur tip de dezoxiribonucleotid trifosfat (dNTP). Dacă dNTP-ul introdus este complementar nucleotidului principal al șablonului, acesta este încorporat în catena complementară în creștere, provocând eliberarea de ioni de hidrogen, ceea ce declanșează senzorul de ioni ISFET, indicând că reacția a avut loc. În cazul când secvența catenei șablon conține o repetare a unui nucleotid, mai multe molecule de dNTP vor fi încorporate într-un singur ciclu, generând creșterea numărului de ioni de hidrogen formați și formarea unui semnal electric proporțional mai mare [154,155].

*Soluțiile de long-read sequencing.* Pentru analiza genomilor complecși, aceste soluții, oferite de *Pacific Biosciences* (PacBio) și *Oxford Nanopore*, sunt deosebit de valoroase. Această tehnologie oferă avantaje precum capacitatea de a genera citiri ultralungi, eficiență ridicată, monitorizare și analiză în timp real, portabilitate și capacitatea de a secvenția direct molecule de ARN sau de ADN. Drept urmare, tehnologia se distinge prin aplicabilitate și o flexibilitate excelente în cercetarea virusurilor, inclusiv detectarea și supravegherea virală, asamblarea genomului, descoperirea de noi variante și virusuri, și identificarea modificărilor chimice. Tehnologia dată are și dezavantaje în ceea ce privește acuratețea și probabilitatea apariției erorilor [156,157].

**Analiza bioinformatică și profilarea filogenetică a rezultatelor obținute.** Indiferent de tehnologia utilizată la identificarea virusului SARS-CoV-2, sunt necesare cunoștințe de bioinformatică pentru procesarea și analiza filogenetică a datelor obținute [158].

Bioinformatica include un set de metode computaționale care acoperă etapele fundamentale ale analizei NGS: evaluarea calității datelor, preprocesarea citirilor brute, alinierea la un genom de referință, identificarea variantelor genetice, adnotarea lor funcțională și interpretarea rezultatelor [158].

Analiza filogenetică este o metodă fundamentală de cercetare în genetică și în biologia moleculară care permite reconstrucția istoriei evolutive a organismelor sau a genelor pe baza asemănarilor și a diferențelor dintre secvențele de ARN sau de ADN, sau dintre proteine. Scopul principal al acestei analize este de a determina relațiile dintre diferite specii, tulpini sau gene, permițând trasarea istoriei lor evolutive comune. Rezultatele unor astfel de analize sunt de obicei prezentate sub forma unui arbore filogenetic, o reprezentare grafică a relațiilor evolutive

formată din ramuri, care simbolizează liniile evolutive, și noduri, care reprezintă strămoșii comuni [158].

Exista și o serie de baze de date legate de SARS-CoV-2, cum ar fi Inițiativa Globală pentru Partajarea Tuturor Datelor despre Gripă (GISAID, <https://www.gisaid.org/>), Centrul Național pentru Informații Biotehnologice (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>), Genome Warehouse (<https://bigd.big.ac.cn/gwh/>), baza de date a Centrului Național de Bioinformatică (CNCB)/Centrului Național de Date Genomice (NGDC) (<https://bigd.big.ac.cn/ncov/>) și *Virus Pathogen Resource* (<https://www.viprbrc.org/>). Aceste baze de date joacă un rol important în arhivarea secvențelor, căutarea omologiilor, descoperirea variațiilor, asocierea fenotipurilor bolii [159].

### **1.5. Monitorizarea virusului SARS-CoV-2 în apele uzate: modelare versus realitate, frecvența relativă pentru identificarea liniilor genetice**

Luând în considerare evoluția constantă a virusului SARS-CoV-2 în timpul pandemiei de COVID-19, monitorizarea continuă a tulpinilor emergente a devenit extrem de importantă pentru sănătatea publică. În perioada postpandemică, odată cu reducerea testării probelor umane pentru detectarea SARS-CoV-2, testarea apelor uzate a devenit din ce în ce mai importantă pentru urmărirea variantelor circulante ale virusului și prognozarea noilor valuri de infecție ca urmare a faptului că persoanele infectate elimină particule virale în mediul ambiant pentru o perioadă adițională de trei luni [160,161].

Conform datelor obținute de Foladori și colab. (2020), de Zhang și colab.(2021), aproximativ 50 % din persoanele infectate cu COVID-19 elimină virusul prin fecale. Prelevarea probelor de ape uzate de la stațiile de epurare care deservesc populații mari, urmată de detectarea agentului patogen folosind metode moleculare, poate asigura o supraveghere de rutină a bolii [158,159]. Această prelevare pasivă a probelor, care poate include persoane asimptomatice sau cu un nivel scăzut de participare la programele de testare clinică, este foarte importantă în perioada postpandemică de COVID-19 [162,163].

Numeroase studii au arătat că înainte de debutul fazei acute, cu o săptămână înainte de apariția simptomelor clinice de COVID-19, virusul SARS-CoV-2 poate fi detectat în apele uzate, în nămolul activ și în rezervoarele de apă, ceea ce indică posibilitatea unei avertizări timpurii privind COVID-19 și identificarea tendințelor de răspândire a infecției. Așadar, testarea apelor uzate permite studierea diversității genetice și a variantelor de SARS-CoV-2, și corelarea variantelor virusului cu severitatea bolii și cu imunitatea, factori ce determină situația epidemiologică generală [164,165,166,167].

Monitorizarea virusului SARS-CoV-2 în apele uzate se bazează pe metoda de cuantificare a ARN-ului viral bazată pe qPCR, care oferă o estimare rapidă a ratelor de infectare în populație [168].

Secvențierea genomică a probelor de ape uzate are potențialul de a elucida diversitatea genetică în cadrul speciei, inclusiv liniile virale [169].

Cu toate acestea, deconvoluția amestecului de linii virale prezente în apele uzate pe baza secvențierii cu citire scurtă rămâne o provocare.

Trebuie subliniat faptul că secvențierea genomică a probelor de ape uzate oferă și oportunitatea unei supravegheri epidemiologice eficiente din punct de vedere al costurilor.

Astfel, analizând apele uzate municipale prin tehnici de secvențiere putem obține imaginea reală a morbidității prin COVID-19. Însă calitatea rezultatelor acestor secvențieri poate varia ca urmare a degradării particulelor virale în canalizare (de exemplu, în funcție de pH, temperatură, timpul de deplasare) și a concentrației virale mai mici în comparație cu probele clinice. Întrucât în apele uzate ARN-ul viral reprezintă o fracțiune relativ mică de acid nucleic, inhibitorii PCR din aceste ape pot face ca secvențierea bazată pe ampliconi să fie predispusă la o acoperire inegală pe întregul genom deoarece unii sau toți ampliconii nu reușesc să se amplifice [170,171,172,173].

În vederea adoptării măsurilor în domeniul sănătății publice, alături de metodele tradiționale de supraveghere a agenților patogeni, monitorizarea apelor uzate trebuie să asigure obținerea de date de înaltă calitate. Pentru a valorifica pe deplin potențialul informațiilor obținute în urma analizei probelor de ape uzate sunt necesare progrese în domenii-cheie precum: elaborarea de proceduri standardizate de colectare, de prelucrare și de secvențiere genomică a probelor care depind de condițiile specifice și sunt selectate pentru o eficiență optimă; metode inovatoare de îmbogățire pentru a spori eficiența extracției acidului nucleic; metode bioinformatic specializate și baze de date special concepute pentru date privind apele uzate [174].

Pentru a rezolva problemele legate de secvențierea genomică a probelor de ape uzate, cu scopul general de a determina prezența și (în majoritatea cazurilor) abundența relativă a diferitor linii SARS-CoV-2, au fost dezvoltate diverse mecanisme de modelare.

Sutcliffe și echipa au comparat performanța și rezultatele a două instrumente de modelare utilizate frecvent pentru analiza datelor de secvențiere a apelor uzate. Aceste instrumente diferă prin metodele statistice precise utilizate pentru identificarea liniilor virusului SARS-CoV-2. Majoritatea instrumentelor folosite de autori s-au dovedit a fi eficiente în identificarea liniilor reale prezente și în evaluarea prevalenței relative a acestora. Multe instrumente au identificat

liniile prezente cu o frecvență de până la 1%, rezultatele fiind mai fiabile la frecvențe mai mari de 5 % [157,175].

Astfel, unii algoritmi pentru analiza datelor de secvențiere a apelor uzate pot să nu identifice liniile prezente în proporție mai mică de 5 %, ceea ce reprezintă, de asemenea, un obstacol în implementarea monitorizării apelor uzate pentru supravegherea de rutină a infecției. Rezultatele acestor studii sunt foarte importante, deoarece, în realitate, virusul SARS-CoV-2 se află într-o stare foarte diluată în apele uzate, ceea ce poate perturba imaginea reală a distribuției subvariantelor circulante. Cu toate acestea, avantajele monitorizării apelor uzate prin secvențiere prevalează asupra tuturor obstacolelor detectate.

### **1.6. Concluzii la capitolul 1**

1. COVID-19 este o boală infecțioasă cauzată de noul tip de coronavirus SARS-CoV-2 care, ca urmare a variabilității sale genetice, a provocat peste șapte milioane de decese la nivel global.
2. Apariția mai multor mutații ale virusului SARS-CoV-2 au determinat organizații și platforme internaționale precum OMS, PANGO, GISAID și Nextstrain să le clasifice în variante, clade sau linii, să identifice răspândirea lor globală și să evalueze potențialul apariției de noi mutații.
3. Evoluția continuă a virusului SARS-CoV-2, soldată cu apariția unor variante emergente precum Alpha, Beta, Gamma, Delta și Omicron, subliniază adaptabilitatea virusului și implicațiile sale semnificative în sănătatea publică.
4. Mutațiile genetice, în special în proteina Spike, au schimbat unele proprietăți fenotipice ale virusului SARS-CoV-2 precum transmiterea, evaziunea imună și virulența. Cunoașterea acestor particularități ale mutațiilor genetice ale virusului este esențială pentru actualizarea permanentă a compoziției vaccinurilor și perfecționarea strategiilor de control al infecției la nivel local, regional și global.
5. Monitorizarea virusului SARS-CoV-2 prin testarea apelor uzate este o abordare inovatoare care poate fi adoptată în țările cu venituri mici și medii pentru a supraveghea evoluția acestui virus și a altor agenți patogeni. Această metodă oferă informație importantă în procesul decizional de sănătate publică pentru a răspunde la actuala răspândire a virusului SARS-CoV-2, precum și la viitoarele amenințări de sănătate publică.
6. Pandemia de COVID-19 a evidențiat faptul că monitorizarea apelor uzate oferă informație veridică privind prezența agenților patogeni în comunități întregi și poate servi ca instrument de prognozare a creșterii sau a scăderii ratelor de infectare.

## 2. MATERIAL ȘI METODE UTILIZATE ÎN CERCETARE

### 2.1. Caracteristică generală și etapele cercetării. Designul studiului

Cercetarea a fost inițiată în anul 2022, în cadrul Laboratorului virusologic al ANSP 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).

#### Obiectul de studiu și volumul eșantionului cercetat

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. Astfel, probele biologice pentru studiul dat au fost prelevate de la pacienții care întruneau definiția de caz expusă în protocolul clinic național „Infecția cu coronavirus de tip nou (COVID-19)”. Prezența virusului SARS-CoV-2 a fost confirmată prin reacția de polimerizare în lanț (RT-PCR), utilizând diferite kituri de reactivi comerciali. Din totalul probelor pozitive la prezența virusului SARS-CoV-2 (COVID-19) și confirmate prin tehnici de biologie moleculară, mostrele pentru reacția de secvențiere au fost selectate pe baza criteriilor de includere și de excludere.

**Volumul eșantionului cercetat.** În studiu a fost cercetate un număr reprezentativ de probe biologice din diferite teritorii administrative ale republicii, prelevate în perioade diferite de timp de la pacienți cu diferite date demografice și cu diferite grade de severitate a infecției COVID-19, precum și probe din ape uzate.

Numărul de probe a fost calculat luând în considerare nivelul de veridicitate egal cu 95 % și eroarea medie de 5 % (nu mai puțin de 240 de probe).

Eșantionul reprezentativ a fost calculat în baza formulei:

$$n = P(1-P)(Z\alpha/d)^2, \text{ unde:}$$

d – distanța sau toleranța (în limitele 0,05);

P – proporția sau valoarea proporției cercetate  $P = 0,278$

$Z\alpha$  = valoarea tabelară. Când „ $\alpha$ ”, pragul de semnificație, este de 5 %, atunci coeficientul  $Z\alpha = 1,96$ .

**Volumul investigațiilor.** Pentru monitorizarea circulației virusului SARS-CoV-2 prin secvențierea întregului genom și analiza filogenetică au fost examinate 733 de probe biologice recoltate de la pacienți care întrunesc definiția de caz COVID-19 în perioada noiembrie 2021–noiembrie 2024. Întrucât cu scăderea numărului de adresări la medic cu simptome de COVID-19 s-au redus testările PCR, a fost implementată o metodă alternativă de monitorizare a circulației virusului SARS-CoV-2 din apele uzate. În perioada 2024-2025 au fost secvențiate 31 de probe de ape uzate, ceea ce a permis identificarea tulpinilor circulante de SARS-CoV-2.

**Criterii de includere.** Probele au fost selectate în baza criteriilor epidemiologice, clinice și de laborator:

1. Creșterea sau modificarea neașteptată a transmisibilității și/sau a virulenței tulpinii circulante de SARS-CoV-2 în teritoriu.
2. Înregistrarea unei izbucniri în grupuri de populație cu risc sporit, care poate contribui la clarificarea transmisibilității, descoperirea de noi variante genetice și evaluarea asocierii tulpinilor de virus cu izbucniri.
3. Stabilirea unui rezultat pozitiv SARS-CoV-2 la persoane revenite din țările în care sunt depistate variante noi ale virusului SARS-CoV-2 cu mutații genetice.
4. Detectarea de tulpini de SARS-CoV-2 necunoscute sau de tulpini divergente.
5. Cazuri simptomatice cu statut vaccinal complet contra COVID-19, cu minim zece zile de la încheierea vaccinării complete, dar care ulterior s-au infectat cu SARS-CoV-2.
6. Probe de la grupuri de risc (ex., pacienți imunocompromiși, mai ales dacă primesc terapie cu anticorpi anti-SARS-CoV-2).
7. Debut agresiv și fulminant al bolii COVID-19, cu afectare pulmonară primară pronunțată și detresă respiratorie exprimată.
8. Probe biologice cu ciclul prag (Ct) mai mic de 22.00 – 25.00 (în funcție de setul de amplificare).

**Criterii de excludere:**

1. Probe biologice selectate conform criteriilor epidemiologice și clinice, dar cu ciclul prag (Ct) mai mare de 25.00.

Criteriul principal și decisiv pentru trimiterea probelor pozitive la reacția de secvențiere genomică a fost o valoare a ciclului prag (Ct) de maximum 25.00, obținută utilizând sisteme de testare PCR înregistrate ca indicator de laborator. Drept urmare, probele care au îndeplinit criteriile de includere cu excepția criteriului de laborator au fost excluse, fiind incluse în studiu doar probele cu încărcătură virală ridicată, ce pot furniza rezultate calitative de secvențiere.

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. Pentru realizarea acestei etape au fost folosite baze de date internaționale cu acces deschis precum PubMed și Google Scholar, MEDLINE. Pentru a asigura exhaustivitatea și relevanța materialelor identificate, referințe suplimentare au fost obținute prin revizuirea manuală a bibliografiilor și a citărilor din articolele selectate inițial. Totodată, au fost studiate și sursele bibliografice naționale cu referire la monitorizarea circulației virusului SARS-CoV-2 și la situația epidemiologică prin COVID-19 în țară.

La **etapa a doua** a fost stabilit eșantionul reprezentativ și selectate probele adecvate, pe baza criteriilor de includere și de excludere, pentru secvențierea întregului genom al virusului SARS-CoV-2. Izolatele destinate secvențierii au fost selectate din probe pozitive procesate prin tehnica de biologie moleculară - RT-PCR. Variantele genetice și tipul de mutație s-a determinat prin metoda de secvențiere a fragmentelor cu ajutorul instrumentelor Ion Torrent Genexus și Illumina MiSeq. Rezultatele obținute au fost analizate cu ajutorul bazelor de date internaționale și a instrumentelor bioinformatică Nexclade, Nexttrain, GISAID, Pangolino, Freyja și Kallisto.

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

Design-ul studiului este redat în figura 5.

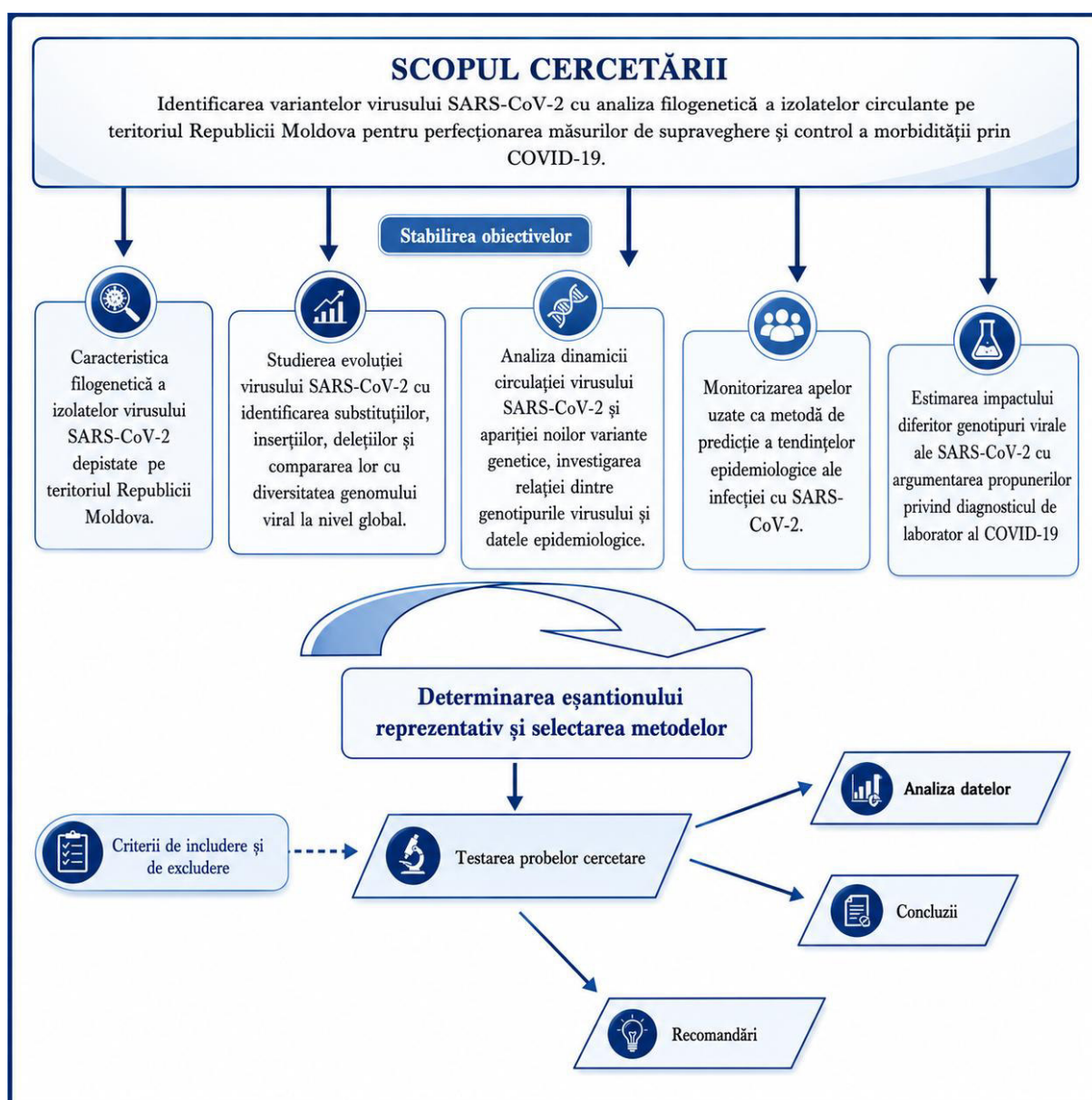


Figura 5. Designul studiului

## **2.2. Metodologia cercetării**

Pentru monitorizarea circulației virusului SARS-CoV-2 prin secvențierea întregului genom și analiza filogenetică a izolatelor SARS-CoV-2 a fost utilizat un complex de metode epidemiologice, de laborator (tehnici de biologie moleculară) și statistice.

### **2.3.1. Metode epidemiologice**

În studiu s-au utilizat tehnici de analiza epidemiologică descriptivă pentru stabilirea prevalenței diferitor variante de mutații ale virusului SARS-CoV-2. În funcție de varianta genetică circulantă a virusului, au fost analizate ratele de incidență, ratele de creștere a cazurilor de COVID-19 în rândul populației din Republica Moldova. Pentru evaluarea procesului epidemic COVID-19 în republică, a fost aplicată analiza epidemiologică retrospectivă pentru perioada 2021-2024.

### **2.3.2. Metode de laborator**

**Metoda de secvențiere a întregului genom pentru detectarea și supravegherea variantelor de SARS-CoV-2 din probele umane**

Probele de tampon nazal și orofaringiene au fost obținute din rețeaua de laboratoare ANSP implicate în diagnosticarea infecției COVID-19. Tamponurile au fost colectate în mediu de transport viral VTM sau într-un echivalent care conține glicerol și antibiotice/antimicotice. Criteriul final pentru expedierea probelor destinate procesului de secvențiere a fost un ciclu prag (Ct) de 25.00 sau mai mic, obținut folosind kiturile RT-PCR.

Procesul de secvențiere a întregului genom al virusului SARS-CoV-2 a inclus următoarele etape principale: extracția acidului nucleic, pregătirea bibliotecilor cu amplificarea clonală, secvențierea propriu-zisă și analiza bioinformatică a rezultatelor obținute (figura 6).



**Figura 6. Etapele principale ale procesului de secvențiere de generație următoare a genomului SARS-CoV-2**

*Extracția ARN-ului.* ARN-ul virusului SARS-CoV-2 a fost izolat din 140  $\mu$ l de probe folosind kitul comercial *QIAamp Viral RNA Mini* (QIAGEN), conform protocolului producătorului. Fiecare probă de ARN izolată a fost dizolvată în 60  $\mu$ l de apă distilată fără RNază și depozitată la  $-70$  °C până la etapa de secvențiere.

Procesul de extracție a ARN-ului viral folosind kitul *QIAGEN QIAamp* a început cu adăugarea a 560  $\mu$ l de tampon de liză AVL în fiecare tub care conținea 140  $\mu$ l de probă de testare. Probele au fost lizate în condiții de denaturare ridicată pentru a inactiva RNaza și a asigura izolarea completă a ARN-ului viral intact. Lizatul a fost apoi aplicat pe o coloană *QIAamp Mini*. Contaminanții au fost îndepărtați eficient folosind două soluții tampon de spălare: 500  $\mu$ l de AW1 și 500  $\mu$ l de AW2. Eluția a fost efectuată cu 60  $\mu$ l de tampon AVE, care este necesar pentru a obține cel puțin 90 % din ARN-ul viral din coloana *QIAamp Mini*. Acest ARN purificat nu conține proteine, nucleaze și alte impurități sau inhibitori.

*Secvențierea întregului genom.* Toate probele analizate au fost secvențiate utilizând platforme de secvențiere de ultima generație, cunoscute sub numele de secvențiere de a doua generație: platformele *Illumina MiSeq Dx* și *Ion Torrent Genexus*.

*Platforma Ion Torrent Genexus.* Din totalul de 733 de probe biologice analizate, 664 de probe au fost secvențiate cu ajutorul echipamentului de ultima generație *Ion Torrent Genexus*

(*Thermo Fisher Scientific*), utilizând testul *Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Insight Research Assay—GX* (*Thermo Fisher Scientific*). Panoul de cercetare utilizat (*Ion AmpliSeq™ SARS-CoV-2 Insight Panel - Pool 1 și SARS-CoV-2 Insight Panel - Pool 2*). Fiecare pool de primeri conține 237 de ampliconi specifici pentru SARS-CoV-2 și mai multe controale pentru expresia genelor umane. Cu un interval de lungime a ampliconului de 125–275 pb, panelul oferă o acoperire >99 % a genomului SARS-CoV-2 (~30 kb) și acoperă toate ser tipurile potențiale.

Rulările de secvențiere au fost create în software-ul *Genexus™*, care conține toate setările utilizate în pregătirea bibliotecii, începând cu crearea șabloanelor, secvențiere și analiză, inclusiv informații despre probă, locația plăcii, testele și codurile de bare folosite pentru reacție.

Pentru generarea raportului final, în timpul creării runde de secvențiere au fost folosite următoarele pluginuri: *SARS\_CoV\_2\_annotateSnpEff*, *generate Consensus*, *SARS\_CoV\_2\_lineageID*. Pluginul *SARS\_CoV\_2\_annotateSnpEff* a fost utilizat pentru generarea variantelor și a tipurilor de mutații (inserția, deleția sau înlocuirea unei secvențe) depistate în genomul virusului secvențiat. Pluginul *generate Consensus* emite o secvență de genom din una sau din mai multe probe selectate în formatul FASTA ce poate fi încărcat direct pe site-ul web GISAID. Pluginul *SARS\_CoV\_2\_lineageID* determină originea secvenței folosind software-ul Pangolin. Ulterior, fișierele FASTQ se filtrează din punct de vedere al calității, iar citirile sunt mapate cu pluginul *SARS-CoV-2-Pangolin* (<https://cov-lineages.org/resources/pangolin.html>), pluginul automat „COVID19AnnotateSnpEff” (*Thermo Fisher Scientific*), precum și cu instrumentul *Nextclade* (<https://clades.nextstrain.org>), în raport cu genomul de referință din Wuhan pentru a obține secvențele complete ale genomului viral.

*Platforma Illumina MiSeq Dx*. Începând cu anul 2024, altele 69 de probe biologice au fost secvențiate cu ajutorul secvențiatorului *Illumina MiSeq Dx*, disponibil în laboratoarele Agenției Naționale pentru Sănătatea Publică. Procesul de secvențiere a ampliconilor SARS-CoV-2 a fost efectuată cu o versiune modificată a protocolului de creare și de secvențiere a bibliotecii ARTIC v4 COVID-19 (*Illumina COVIDSeq v4 Primer Pools*, compatibil cu *COVID SeqAssay index 1*, varianta ARTICV4, care operează toate mutațiile corespunzătoare regiunii spike).

În timpul procesului de aliniere, ARN-ul izolat este tratat cu hexameri aleatori în vederea sintezei ADNc. La etapa de sinteză a ADNc, fragmentele de ARN tratate cu hexameri aleatori sunt invers transcrise în prima catenă de ADNc folosind enzima transcriptaza inversă. Această etapă a fost efectuată în două tuburi paralele per fiecare probă, cu două amestecuri de reacție preparate pentru fiecare grup de primeri: *COVIDSeq PCR Master Mix 1* și *COVIDSeq PCR Master Mix 2*.

Amestecul de reacție a fost incubat la temperatura de 98 °C timp de trei minute și apoi amplificat timp de 35 de cicluri la 98 °C timp de 15 secunde, la 63 °C – timp de cinci minute și menținut la 4 °C pe un termociclator *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System*.

Amplificonii din reacțiile de amplificare Pool 1 și Pool 2 au fost reuniți, purificați cu particule magnetice AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, SUA) la un raport particule magnetice - probă de 1:1, eluați în 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) și cuantificați, folosind un kit de testare *Qubit™ IX dsDNA High Sensitivity (HS) dsDNA* pe un fluorometru *Invitrogen Qubit 4*.

Bibliotecile au fost generate folosind kitul de pregătire a bibliotecii *Illumina COVIDSeq RUO* cu adaptoare index Illumina și secvențiate pe un instrument MiSeq (Illumina, San Diego, CA, SUA).

Probele au fost secvențiate folosind citiri pereche de 300×150 pb. Platforma *Illumina BaseSpace* (<https://basespace.illumina.com>) a fost utilizată pentru controlul calității datelor, generarea FASTQ, asamblarea genomului și detectarea variantelor SARS-CoV-2.

Fișierele FASTQ brute au fost procesate și supuse procedurii de control a calității (Q > 30), utilizând aplicația FASTQ-QC de la BaseSpace. Fișierele FASTQ aprobate prin QC au fost aliniat la genomul de referință SARS-CoV-2 (*NCBI Reference Sequence: NC\_045512.2*). Linia genetică DRAGEN COVID de la BaseSpace a fost utilizată pentru a determina varianta SARS-CoV-2 și pentru a genera un singur fișier FASTA consens.

Fișierele FASTA individuale consens au fost, de asemenea, analizate pentru atribuirea genealogică, utilizând versiunea online a programului *Phylogenetic Assignment of Named Global Epidemic Lineages* (Pangolin) (<https://pangolin.cog-uk.io>).

Pentru analize ulterioare au fost folosite doar variantele consens identificate de ambele aplicații.

**Analiza bioinformatică și profilarea filogenetică** a tuturor rezultatelor secvențierii au fost efectuate utilizând baze de date internaționale cu acces deschis. Rezultatele bioinformatică au inclus analiza NextClade și Pangolin, inclusiv denumirile cladelor conform nomenclaturii GISAD și Pangolin. Recunoașterea liniilor genealogice și detectarea variantelor au fost efectuate utilizând aplicația web Pangolin (<https://cov-lineages.org/resources/pangolin.html>). Variantele identificate au fost verificate și analizate utilizând baza de date Nexclade (<https://clades.nextstrain.org/>).

Toate secvențele obținute au fost comparate cu genomul de referință SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (*NCBI Reference Sequence: NC\_045512.2*) pentru identificarea mutațiilor. Toate liniile/variantele identificate ca variantă recombinantă de către Pangolin sunt indicate ca recombinante în toți arborii filogenetici. Arborele filogenetic a fost construit utilizând

Nextclade descărcat în format JPEG. Datele au fost apoi trimise către baze de date cu acces deschis, cum ar fi Inițiativa Globală pentru Partajarea Tuturor Datelor despre Gripă (GISAID).

### Metodologia de secvențiere a virusului SARS-CoV-2 din ape uzate pentru supravegherea circulației virale

Procesul tehnologic de investigare a probelor de ape uzate include câteva etape principale: prelevarea probelor, transportul conform cerințelor frigorifice cu recepționarea în laborator, prelucrarea primară, extracția acizilor nucleici, analiza probelor prin tehnici de biologie moleculară (RT-PCR, secvențierea genomului) și prelucrarea datelor obținute (figura 7).

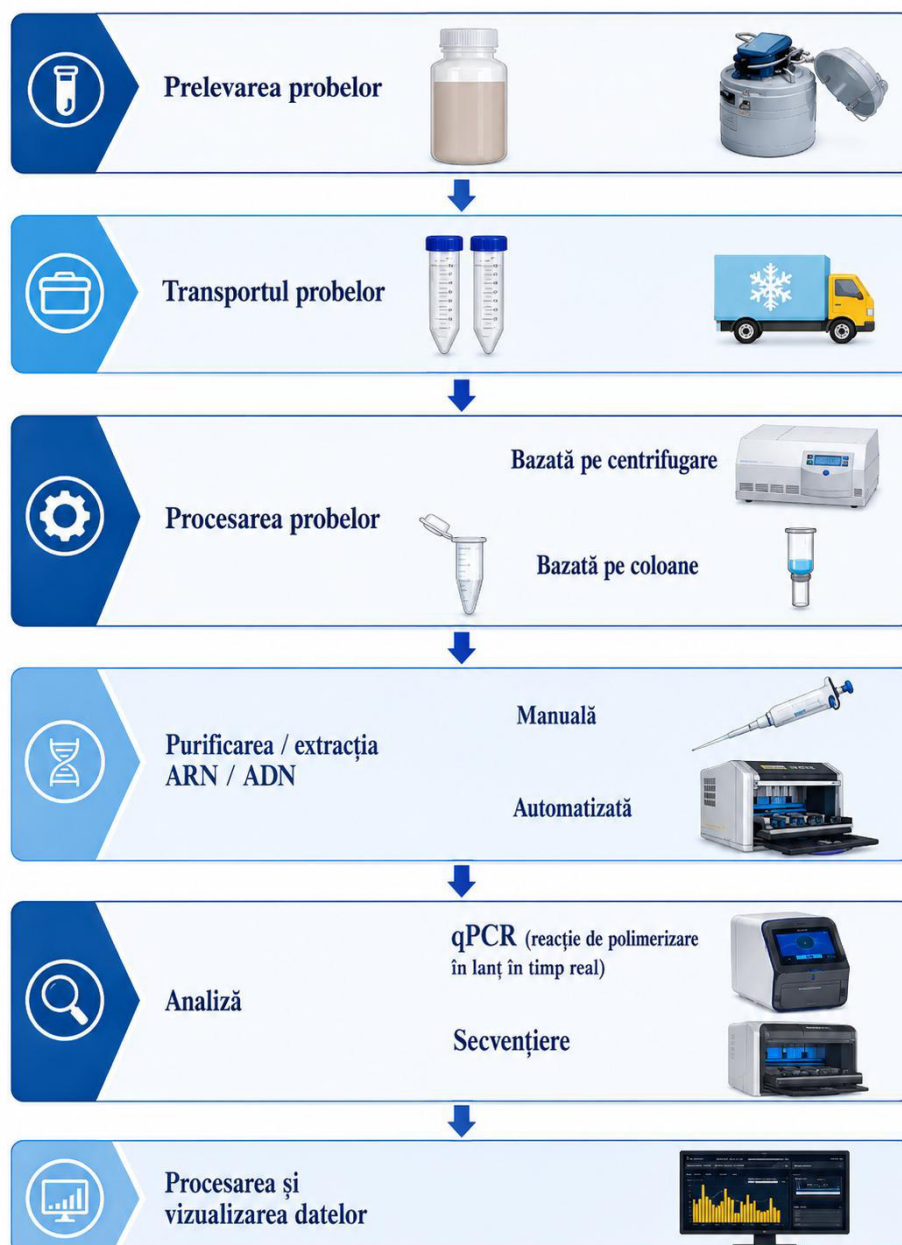


Figura 7. Procesul de investigare a apelor uzate în contextul monitorizării pandemiei de COVID-19

Probele de ape uzate destinate reacției de secvențiere au fost prelevate pe o perioadă de 24 de ore, utilizând un debit sau un eșantion compozit în timp. Prelevările au fost efectuate în timpul perioadelor uscate, iar în cazul în care a fost posibil s-au corectat – prin normalizare – în funcție de influența evenimentelor meteorologice, utilizând debitul de apă uzată de 24 de ore în timpul prelevării.

Probele au fost prelevate de două ori pe săptămână (în fiecare zi de luni și de miercuri) de la Stația de epurare a apelor uzate din mun. Chișinău și au fost transportate în condiții frigorifice (+2 - +8 °C) către laboratorul virusologic pentru efectuarea analizelor ulterioare.

*Prelucrarea primară a probelor de ape uzate.* Prelucrarea probelor de ape uzate a început cu centrifugarea a 50 ml de probă timp de 30 de minute la 4500 rpm. La 40 ml din supernatantul obținut după prima centrifugare s-au adăugat 4 g de PEG8000 (polietilenglicol 8000) și 0,9 g de clorură de sodiu. Amestecul obținut a fost centrifugat timp de 1 oră și 30 de minute (90 de minute) la 4 °C la 12 000 rpm fără frânare, pentru depunerea unui sediment pe fundul tubului sub forma unei pelicule (sediment) care a concentrat toate microorganismele prezente în probă. Supernatantul a fost aruncat, iar sedimentul obținut cu toate particule virale a fost dizolvat în 200 μl de tampon de lucru (tampon CTAB (bromură de cetrimoniu) cu apă PCR într-un raport de 1:1). Suspensia este gata pentru etapa de extracție a ARN-ului, folosind orice metodă și kit de extracție disponibile în laborator.

*Extracția ARN-ului din ape uzate.* Extracția ARN-ului viral a fost efectuată imediat după prelucrarea primară a probelor de apă uzată, utilizând kiturile comerciale *ПРОБА-НК-S (ДНК-Технология)* și *QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN)*. Extracția cu kitul comercial *QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN)* a fost efectuată după metoda descrisă mai sus.

Principiul de funcționare al kitului *ПРОБА-НК-S (ДНК-Технология)* se bazează pe eliberarea acizilor nucleici sub influența unui agent haotropic (tiocianat de guanidină), urmată de precipitare și de purificarea de impurități. Suspensia obținută a fost lizată cu 300 μl de soluție de liză și incubată la 65 °C timp de cinci minute. După adăugarea a 400 μl de tampon de precipitare, lizatul a fost centrifugat la 12 000-16 000 rpm timp de cinci minute pentru a forma un precipitat dens. Pentru a îndepărta toate impuritățile, precipitatul a fost spălat de două ori cu 500 μl de soluție de spălare și dizolvat în 50 μl de tampon prin incubarea tuburilor la 65 °C timp de cinci minute pentru a obține un extract pur.

*Investigații de biologie moleculară RT-PCR pentru selectarea probelor din ape uzate pentru secvențiere.* Toate extractele obținute au fost investigate prin tehnici de biologie moleculară utilizând kitul comercial *PROMEGA GoTaq® Enviro RT-PCR* pentru detectarea virusului SARS-CoV-2. Fiecare reacție RT-PCR în timp real a fost efectuată cu 5 μl de ARN izolat per reacție într-un volum total al amestecului de reacție RT-PCR de 15 μl.

Analiza RT-PCR în timp real a fost efectuată utilizând un sistem *Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System*, cu 96 de godeuri (*Thermo Fisher Scientific, SUA*), cu parametri de ciclare recomandați de producătorul kitului.

Datele au fost analizate cu un software de echipament *Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* cu ajustare automată a liniei de bază și a pragului pentru analizele canalului de detecție. Fiecare curbă de amplificare a fost inspectată manual, iar rezultatul a fost considerat pozitiv dacă a produs o curbă de amplificare exponențială distinctă de controalele negative. În aceste cazuri au fost calculate valorile Ct.

Fiecare placă RT-PCR în timp real a inclus controale pozitive și un control negativ. Controalele pozitive au inclus fragmente sintetice de ARN monocatenar (ssRNA) ale SARS-CoV-2 diluate de 1000 de ori (Ct 21 așteptat) și de 100 de ori (Ct 28 așteptat) în apă fără nucleaze. Rezultatele controlului pozitiv au fost monitorizate folosind o diagramă de control, care indică dacă valorile s-au încadrat în intervalul specificat ( $\pm 3Ct$ , date neprezentate). Probele cu valori Ct până la ciclul 35 au fost apoi selectate pentru reacția de secvențiere a genomului.

*Secvențierea întregului genom al probelor din ape uzate.* Ulterior, probele selectate după Ct au fost luate la etapa de pregătire pentru reacția de secvențiere. Pentru prepararea bibliotecilor genomice a fost utilizat setul comercial de reagenți *NEBNext® ARTIC SARS-CoV-2 Library Prep Kit (Illumina®)*, care constă în indexarea cu barcoduri, efectuarea reacției de PCR și selectarea dimensiunii fragmentelor utilizând bile magnetice.

La etapa de creare a bibliotecilor a fost utilizat setul de primeri *ARTIC v4 (COVIDSeq v4 Primer Pools)*, modificat și optimizat pentru îmbunătățirea acoperirii genomului viral.

Procesul de secvențiere a fost efectuat cu ajutorul instrumentului *Illumina MiSeq Dx* utilizând cartușul *MiSeq Reagent Kit v2* (300 cicluri) cu obținerea de readuri *paired-end* ( $2 \times 150$  nucleotide).

Imaginile fluorescente au fost analizate utilizând platforma de recunoaștere a bazelor *Illumina* pentru a produce date demultiplexate în format *FASTQ*. Astfel, în urma secvențierii a 31 probe de mediu au fost obținute 62 de fișiere *FASTQ pair-end*.

Evaluarea calității datelor genomice a fost efectuată cu *Samtools* și *Fastqc*, iar pentru agregarea rezultatelor tuturor probelor a fost utilizat algoritmul *Multiqc*. Alinierea la genomul de referință SARS-CoV-2 și determinarea abundenței variantelor virale au fost realizate cu instrumentele *Minimap* și, respectiv, *Freyja*, iar pentru reprezentarea grafică s-a utilizat limbajul R.

Pentru a cuprinde în totalitate diversitatea virală din probele biologice comunitare a fost folosit instrumentul *Freyja*. Acest instrument folosește pentru estimarea abundenței relative a

liniilor virale într-o probă mixtă o bibliotecă de „coduri de bare” ale mutațiilor definitorii pentru a reprezenta fiecare linie SARS-CoV-2 în filogenia globală.

### **Instrumentele Freyja și Kallisto de analiză bioinformatică a secvențelor genetice ale SARS-CoV-2 izolate din ape uzate**

În vederea determinării celui mai potrivit instrument pentru utilizare viitoare în domeniul analizei datelor de secvențiere au fost evaluate două instrumente computaționale — *Freyja* (bazat pe variante) și *Kallisto* (fără aliniere). În acest scop a fost utilizat un set de date sintetice din 42 de probe de ape uzate conținând amestecuri cunoscute din 11 linii genetice ale virusului SARS-CoV-2 clasificate după OMS (Alpha, Beta, Delta, Epsilon, Eta, Gamma, Iota, Kappa, Lambda, Theta, Zeta). Fiecare probă conținea aproximativ 1,09 milioane de citiri de secvențieri mapate la genomul de referință NC\_045512.2. Abundențele liniilor celulare au variat de la < 0,01 % până la > 99 %, permițând o evaluare cuprinzătoare pe întregul spectru de detecție.

Pentru a genera amestecuri de secvențe realiste, care să reflecte raporturile de prevalență ale liniilor și ale subliniilor virale observate în timpul pandemiei, s-au utilizat date săptămânale privind numărul de linii și de sublinii ale virusului SARS-CoV-2 raportate în Statele Unite în perioada ianuarie 2020 - decembrie 2022. Aceste secvențe au fost descărcate și luate din baza de date a Inițiativei Globale privind Partajarea Tuturor Datelor Gripei (GISAID). În această perioadă au fost detectate 11 linii genetice: B.1.1.7, B.1.351, B.1.617.2, B.1.429, B.1.525, P.1, B.1.526, B.1.617.1, C.37, P.3 și P.2. Numărul săptămânal raportat de linii a fost normalizat în procente care și au fost utilizate pentru a genera un total de 42 de amestecuri ordonate cronologic pentru grupul corespunzător de linii genetice. Fiecare amestec individual reprezintă frecvențele reale observate într-o anumită săptămână din perioada menționată.

**Instrumentul Freyja.** Procesul de analiză a datelor de secvențiere a genomului SARS-CoV-2 cu instrumentul *Freyja* include cinci etape principale executate pentru fiecare probă. Prima etapă include alinierea citirilor folosind *minimap2* versiunea 2.28. Acest instrument aliniază secvențele analizate la genomul de referință folosind modul de citire scurtă optimizat pentru datele Illumina. În a doua etapă, modulul de variante *Freyja* determină variantele genetice ale virusului SARS-CoV-2. Acest proces identifică mutațiile prezente în fiecare probă prin compararea citirilor aliniată cu genomul de referință. Modulul instrumentului a aplicat un prag minim de calitate – 20 de baze – pentru a exclude variantele cu calitate scăzută care ar putea reprezenta mai degrabă erori de secvențiere, decât variante biologice reale. Rezultatul a inclus un tabel de variante care listează toate mutațiile detectate și un fișier de adâncime care înregistrează acoperirea secvențierii la fiecare poziție genomică.

În a treia etapă a fost efectuată demixarea liniilor genetice folosind modulul de demixare *Freyja*. Acest algoritm a estimat abundențele liniilor genetice prin găsirea combinației de linii

genetice cunoscute ale căror profiluri de mutație au explicat cel mai bine variantele observate. Optimizarea a utilizat un algoritm de maximizare a așteptărilor cu un prag de convergență de 0,001 pentru o precizie ridicată. Modulul a aplicat o limită de acoperire de  $10\times$  – adâncimea minimă pentru identificarea variantelor. Analiza a inclus toate liniile genetice din baza de date, nu doar variantele confirmate oficial. Fiecare eșantion a generat un fișier de ieșire semimixat care conține procente de abundență estimate pentru toate liniile genetice detectate.

În cea de-a patra etapă au fost agregate rezultatele din toate cele 42 de eșantioane folosind modulul de agregare Freyja, ceea ce a permis combinarea rezultatelor individuale ale eșantioanelor într-un singur tabel principal. La agregare a fost aplicat un prag minim de acoperire care impune ca 60 % din genomul viral să fie acoperit de citiri de secvențiere pentru fiecare din liniile genetice.

**Instrumentul Kallisto.** Procesul de analiză bioinformatică cu instrumentul Kallisto include trei etape principale. La prima etapă a fost elaborat un indice de referință din 11 secvențe genomice SARS-CoV-2 folosind k-mer cu dimensiuni de 31 de perechi de baze, care echilibrează specificitatea pentru distingerea liniilor virale cu sensibilitate similară pentru atribuirea citirilor.

La a doua etapă s-a efectuat pseudoalinierea și cuantificarea pentru fiecare probă. Spre deosebire de metodele tradiționale de aliniere, care determină poziția genomică precisă a fiecărei citiri, instrumentul Kallisto utilizează o abordare rapidă de potrivire k-mer pentru a atribui citirile celor mai compatibile secvențe de referință. Procesul de cuantificare a rulat cu 32 de fire de execuție și a produs estimări de abundență în unități TPM (*transcripte per milion*) pentru fiecare linie genetică. Această abordare a evitat crearea de fișiere de aliniere intermediare de dimensiuni mari, reducând atât timpul de procesare, cât și cerințele de stocare.

La a treia etapă, valorile TPM au fost normalizate la procente de abundență pentru a permite compararea directă cu datele reale. Pentru fiecare probă a fost calculată abundența procentuală a fiecărei linii genetice ca valoare TPM împărțită la suma valorilor TPM din toate liniile celulare, apoi înmulțită cu 100. Această normalizare ia în considerare conținutul viral total detectat în fiecare probă și asigură ca suma procentelor este de aproximativ 100.

### **Indicatorii de performanță ai instrumentelor Freyja și Kallisto, și analiza statistică a rezultatelor obținute**

Pentru evaluarea performanței instrumentelor Freyja și Kallisto s-au folosit indicatori statistici standard. Coeficientul de determinare ( $R^2$ ) a măsurat proporția variației abundențelor reale exprimată prin predicții, valorile mai apropiate de 1 indicând o mai bună potrivire a modelului. Coeficientul de corelație Pearson ( $r$ ) a evaluat puterea relației liniare dintre abundențele prezise și cele reale, iar corelația rangului Spearman ( $\rho$ ) a examinat relațiile

monotonice robuste față de valorile aberante. Eroarea absolută medie (MAE - *mean absolute error*) reflectă magnitudinea medie a erorilor de predicție în puncte procentuale, iar eroarea medie pătratică (RMSE - *root mean squared error*) – rădăcina pătrată a erorilor medii pătratice, ceea ce penalizează abaterile mari mai puternic decât MAE.

Acești indicatori au fost calculați pentru fiecare linie OMS a virusului SARS-CoV-2 pentru a identifica variația performanței în funcție de tipul de variantă. Rezultatele au fost stratificate în funcție de intervalele de abundență (mai puțin de 0,1 %, 0,1-1 %, 1-5 %, 5-20% și mai mult de 20 %), pentru a caracteriza limitele de detecție și intervalele optime de operare. Toate analizele statistice au utilizat Python 3.11 cu bibliotecile scipy, scikit-learn și numpy. Semnificația statistică a fost evaluată folosind teste bilaterale cu alfa egal cu 0,05.

### **2.3 Prelucrarea statistică**

Prelucrarea statistică a datelor obținute a fost realizată cu ajutorul mediului statistic RStudio (versiunea 2024.04.1+748) care a permis efectuarea unei analize statistice reproductibile și transparente.

Pentru variabilele numerice, au fost calculate statisticile descriptive standard: valoarea minimă, valoarea maximă, media însoțită de intervalul de încredere de 95 % (95 % CI) și abaterea standard, precum și mediana împreună cu abaterea interquartilă (AI).

Comparația între grupuri pentru variabilele numerice a fost realizată cu teste neparametrice adecvate pentru distribuții negausiene: testul Mann–Whitney–Wilcoxon pentru două grupuri independente și testul Kruskal–Wallis rank sum pentru mai multe grupuri independente. Rezultatele au fost reprezentate grafic prin boxplot-uri și heatmap-uri, facilitând interpretarea vizuală a distribuțiilor și a relațiilor dintre variabile. Pentru controlul erorilor de tip I asociate testărilor multiple a fost aplicată corecția Benjamini–Hochberg.

Pentru variabilele categoricale au fost estimate frecvențele absolute și relative, completate cu intervale de încredere de 95 % pentru frecvențele relative. Vizualizarea rezultatelor a fost realizată prin diagrame cu bare (barplot).

În vederea testării ipotezelor privind asocierea dintre variabilele categoricale s-a aplicat testul Chi-pătrat al lui Pearson, în varianta Monte Carlo cu 10 000 de repetiții, pentru a asigura robustețea estimării valorii  $p$ .

Nivelul de semnificație statistică ( $\alpha$ ) pentru toate analizele efectuate a fost stabilit la 0,05.

### **2.4 Concluzii la capitolul 2**

1. Acest studiu a inclus un număr reprezentativ de probe clinice și de mediu (ape uzate), ceea ce a permis identificarea liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 circulante în Republica Moldova, precum și determinarea mecanismelor de mutație.

2. Tehnologia de secvențiere de ultimă generație a întregului genom cu utilizarea platformelor *Ion Torrent Genexus* și *Illumina MiSeq* a permis monitorizarea evoluției virusului SARS-CoV-2 în Republica Moldova.
3. Fiabilitatea rezultatelor obținute este determinată de volumul reprezentativ al secvențelor analizate, precum și de utilizarea diferitor platforme și instrumente bioinformatică, și de aplicarea metodelor statistice pentru analiza acestora.
4. Compararea instrumentelor de analiza bioinformatică *Freyja* și *Kallisto* a permis determinarea celui mai potrivit pentru vizualizarea datelor de secvențiere a genomului virusului SARS-CoV-2 izolat din apele uzate.

### 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 (92,8 %) – 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  $\pm$  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, cu 79,1 %, (95 % CI: 76 %, 82%), și 20,9 % - cea rurală (95 % CI: 18 %, 24 %).

Datele studiului arată că persoanele în vârstă, în special cele trecute de 60 de ani, prezintă un risc ridicat de a fi spitalizate în stare gravă cu diagnosticul COVID-19, în comparație cu alte grupe de vârstă, posibil din cauza modificărilor fiziopatologice asociate cu îmbătrânirea (figura 8). Drept urmare, rata mortalității în această grupă de vârstă tinde să fie mai mare.

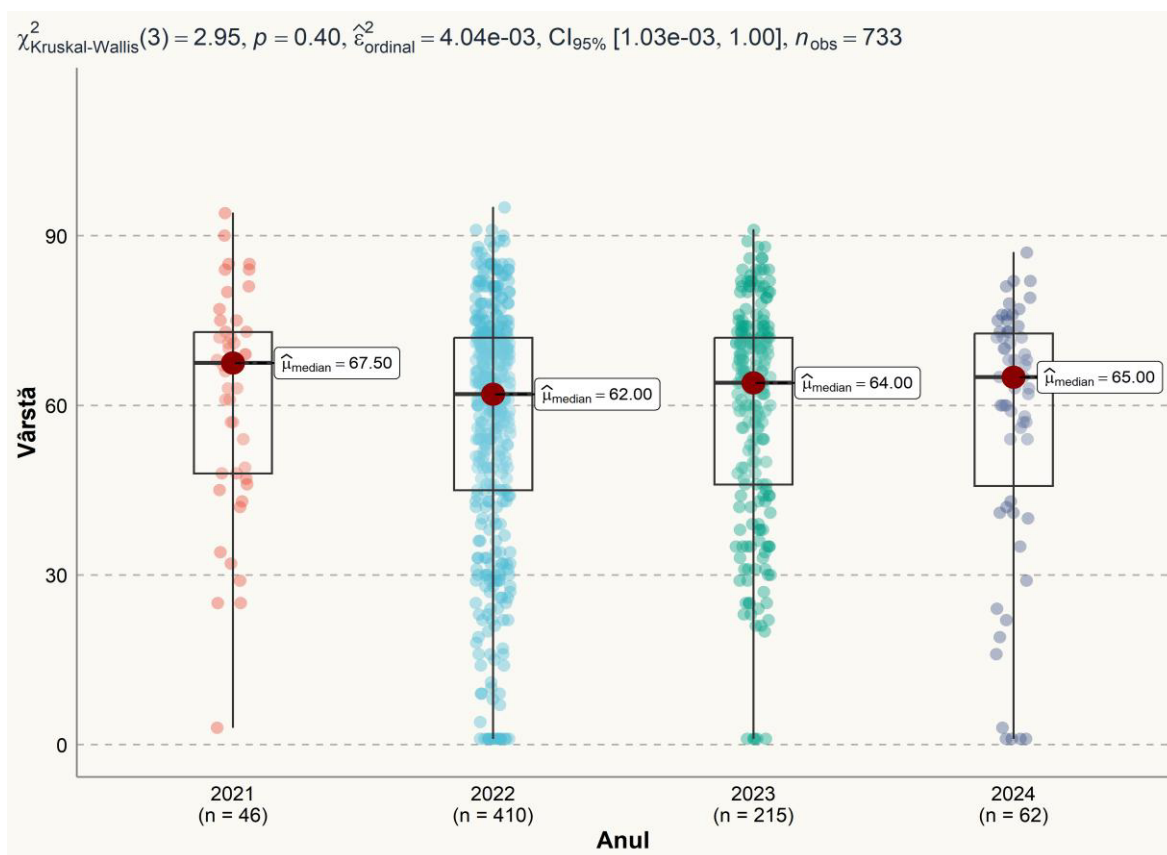


Figura 8. Incidența COVID-19 pe grupe de vârstă

Conform datelor obținute, vârsta medie a pacienților în 2021, în timpul circulației variantei Delta, a fost de 67,5 ani, pe baza a 46 de pacienți testați. În 2022, când a apărut varianta Omicron și numărul de probe testate a fost mai mare decât în alți ani (n=410), vârsta medie a pacienților a fost de 62 de ani. În 2023, cu n=215 probe secvențiate, vârsta medie a pacienților a fost de 64 de ani, iar în 2024, cu n=62 de probe testate, aceasta a fost de 65 de ani. Astfel, datele studiului nostru indică o predominanță a pacienților cu vârsta de peste 60 de ani. Trebuie însă remarcat faptul că studiul a inclus pacienți spitalizați în unități medicale, ceea ce înseamnă că probele au fost colectate și secvențiate în principal de la pacienți cu forme clinice moderate și severe care, în majoritatea cazurilor, făceau parte din populația mai în vârstă din cauza comorbidităților cronice asociate cu îmbătrânirea.

Interpretarea statistică a distribuției cazurilor de COVID-19 pe grupe de vârstă și evaluarea comparativă a fost efectuată prin testul neparametric Kruskal Wallis, care nu a evidențiat diferențe statistice semnificative - valoarea testului fiind 2,95,  $p = 0.4$ , și 95 % CI având zero în limite.

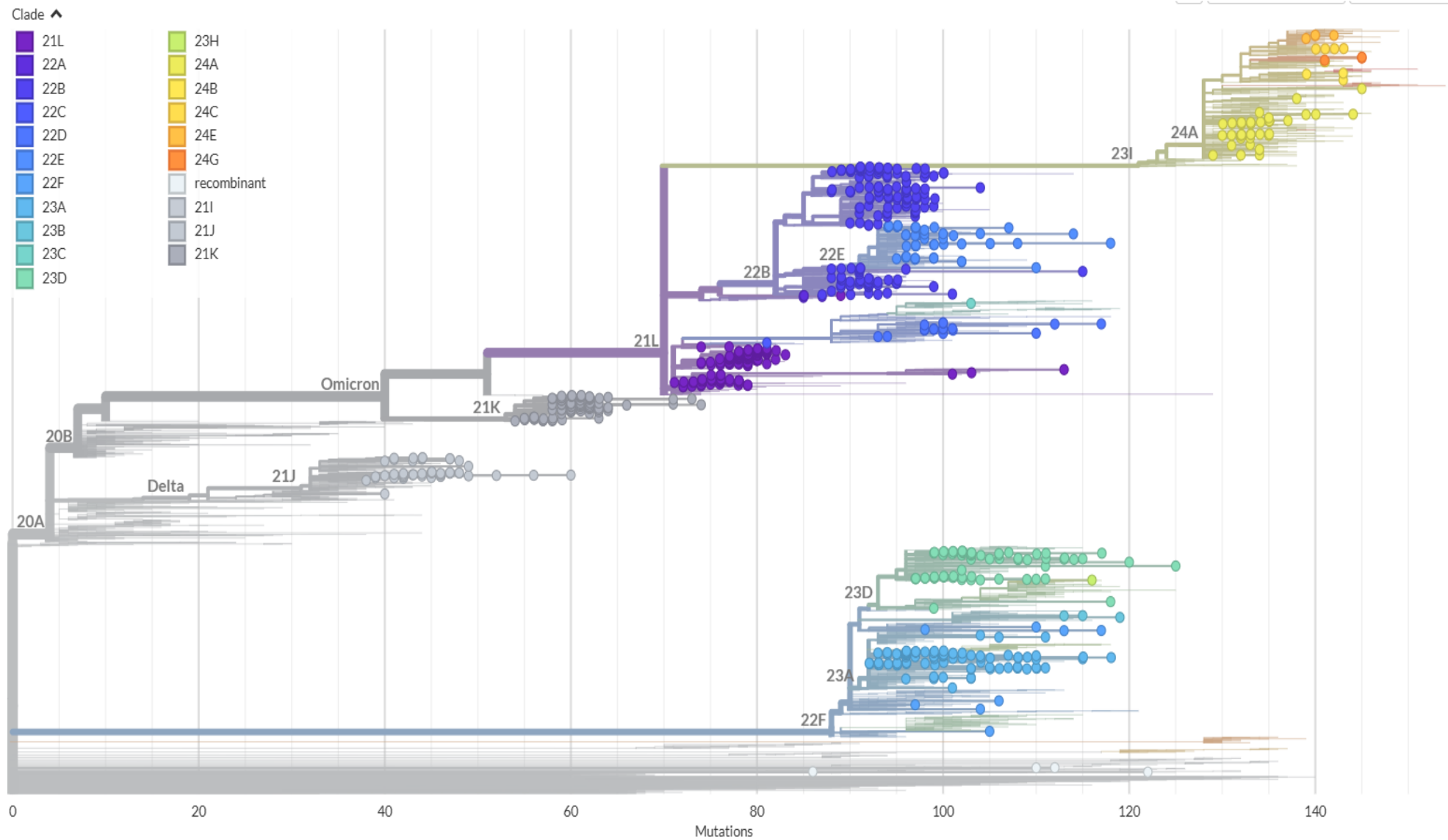
În 2021 au fost secvențiate 46 (6,3 %, 95 % CI: 4,5 %, 8,0 %) de izolate, toate aparținând variantei Delta. În 2022 au fost secvențiate cele mai multe probe din întreaga perioadă de studiu – 410 (55,9 %, 95 % CI: 52%, 60%), în trei izolate (6,1%, 95 % CI: 0,00 %, 13 %) fiind detectată varianta Delta și în 407 (59,9 %, 95 % CI: 56 %, 64 %) – varianta Omicron.

În 2023, în perioada de scădere a incidenței COVID-19, au fost secvențiate și analizate 215 (29,3 %) (95 % CI: 26 %, 33 %) izolate, dintre care 212 (31,2 %) (95 % CI: 28 %, 35 %) aparțineau variantei Omicron și trei (75,0 %) (95 % CI: 33 %, 100 %) – variantei recombinante.

În 2024, ca urmare a scăderii incidenței și a numărului pacienților care au solicitat diagnostic medical, a fost secvențiate 62 (8,5 %) (95 % CI: 6,4 %, 10 %) de izolate, în 61 (9,0 %) (95 % CI: 6,8 %, 11 %), fiind detectată varianta Omicron și doar în una (25,0 %) (95 % CI: 0,00 %, 67 %) – varianta recombinantă.

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.

Toate secvențele genomice ale virusului SARS-CoV-2 au fost analizate pentru a determina poziția lor filogenetică în contextul evoluției globale a virusului, utilizând programul Nextclade (figura 9).



**Figura 9. Relația filogenetică dintre izolatele virusului SARS-CoV-2 în cadrul prezentului studiu**

Arborele filogenetic al secvențelor SARS-CoV-2 indică distanța filogenetică a „divergenței” fiecărei variante a virusului SARS-CoV-2 care este calculată prin algoritmul din Nextstrain. Acesta a fost creat în funcție de numărul total de mutații acumulate (axa X), iar legenda reflectă apartenența probelor la cladele Nextstrain. Nodurile reprezintă genomi virali, iar ramurile evidențiază relațiile evolutive dintre genomi oferind o imagine clară asupra diversității genetice a virusului în perioada 2021-2024. Punctul din centru este cea mai timpurie variantă de SARS-CoV-2 detectată care servește drept referință pentru calcularea distanței filogenetice.

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.

Conform rezultatelor, 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 numărât în jur de 120-140 de mutații.

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, nefiind însă observată vreo modificare a scorului de afinitate ACE2 sau eventuale consecințe epidemiologice.

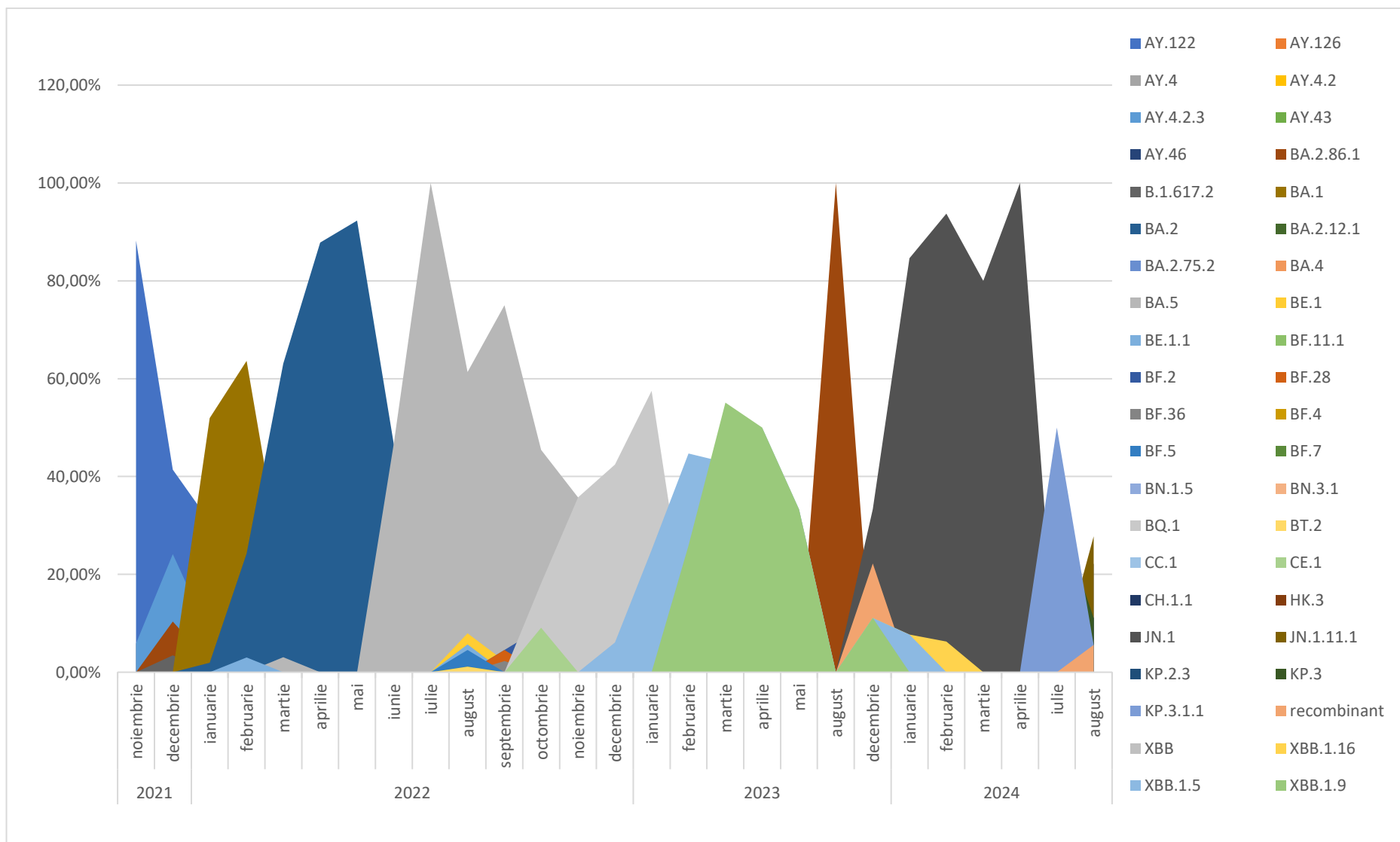
Analiza datelor epidemiologice privind numărul de probe investigate și de persoane pozitive COVID-19 în Republica Moldova (figura 10) și a datelor de distribuție a liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 a arătat că pe parcursul perioadei de secvențiere a genomului virusului SARS-CoV-2 s-au înregistrat numeroase valuri epidemice. Fiecare val a fost explicat prin apariția în populație a unei noi variante de mutație, care a și provocat creșterea numărului de cazuri de COVID-19. Astfel, în primul val al pandemiei, în ianuarie 2022, incidența maximă a cazurilor de COVID-19 a fost de 1205 cazuri la 100 000 populație și a coincis cu apariția variantei Omicron în Republica Moldova care a înlocuit complet varianta Delta (B.1.617.2).

Pe tot parcursul circulației pe teritoriul republicii, varianta Omicron a suferit mai multe schimbări genetice și a provocat apariția mai multor linii care au avut semnificație epidemiologică. Astfel, primul val epidemiologic, cauzat de apariția variantei Omicron, se caracterizează prin predominarea liniei BA.1\* cu descendenții săi (BA.1.1, BA.1.1.1, BA.1.1.13, BA.1.15, BA.1.17 ș. a.), marcat cu culoarea maro pe figura 10.

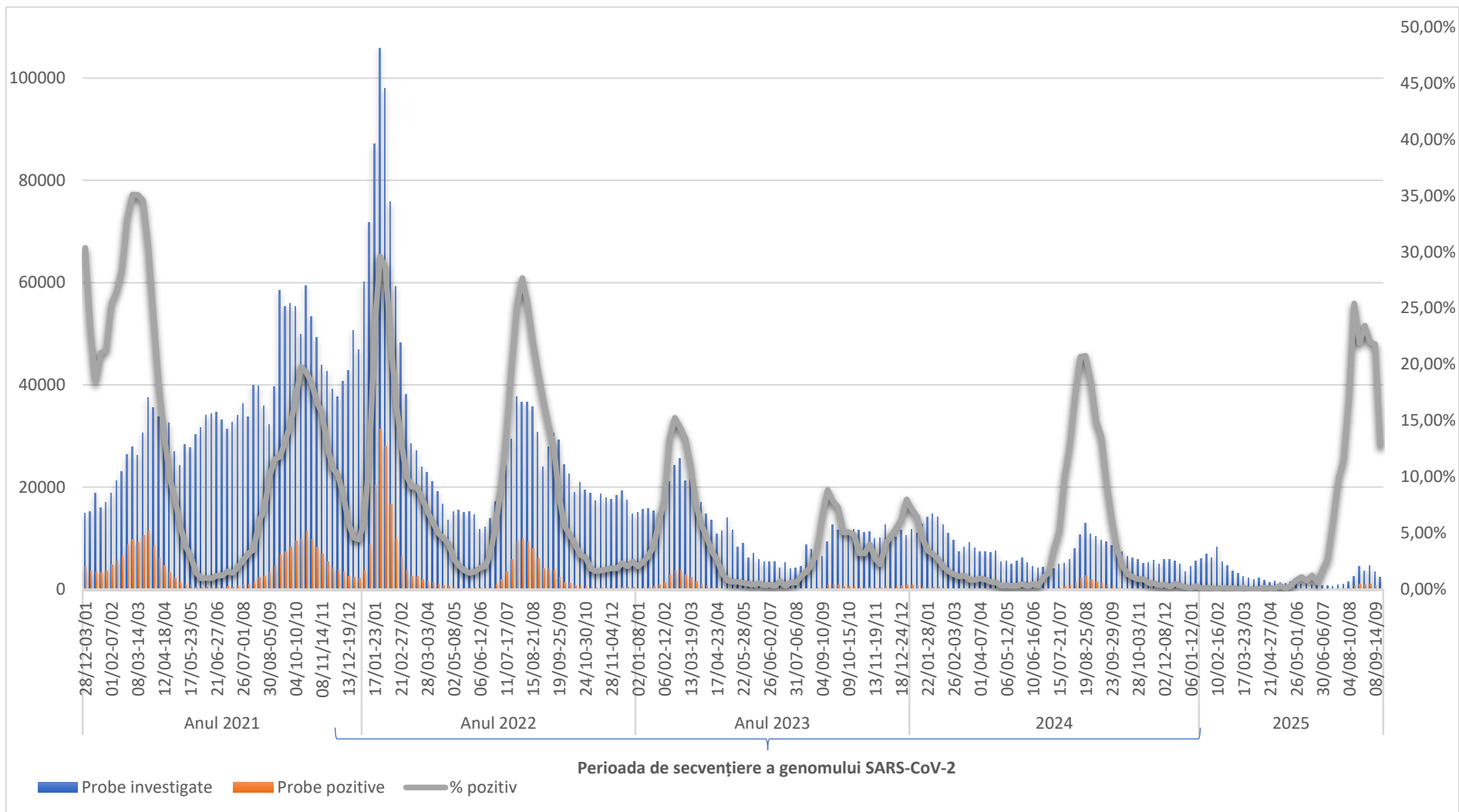
Al doilea val al pandemiei a avut o creștere mai lentă, atingând valoarea maximă de 389 de cazuri de COVID-19 la 100 000 populație în perioada caldă a anului 2022, în special în luna august, ceea ce a coincis cu apariția noilor mutații ale virusului SARS-CoV-2, subliniile BA.4 și BA.5, reprezentate cu culoarea gri în graficul din figura 10.

Al treilea val al pandemiei s-a înregistrat în perioada februarie-martie 2023 și se explică prin apariția liniei XBB\* cu descendenții săi - XBB.1.5 (neoficial denumit Kraken) și XBB.1.9\*. Varianta Omicron-XBB, probabil apărută ca urmare a recombinării a doi descendenți ai BA.2, BJ.1 și BM.1.1.1, descendent al BA.2.75. Sublinia XBB.1.5 a fost descoperită pentru prima dată în octombrie 2022 în SUA și este o sublinie a XBB cu o mutație suplimentară în proteina Spike S486P.

Anterior, această mutație (S486P) a fost rar întâlnită pe parcursul pandemiei, probabil din cauza faptului că a fost necesară modificarea a două nucleotide în același codon pentru a înlocui fenilalanina cu prolina. Deși XBB.1.5 și XBB.1.9.1 au aceleași substituții de aminoacizi în proteina Spike, RdRp și proteaza principală, există substituții aminoacidice suplimentare în alte proteine virale care pot afecta infecțiozitatea, replicarea, transmisibilitatea și/sau patogenitatea virusului.



**Figura 10. Distribuția liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 circulante în Republica Moldova în perioada postpandemică**



**Figura 11. Numărul de probe investigate și persoane pozitive la COVID-19 (săptămânal) în perioada anilor 2021-2025**

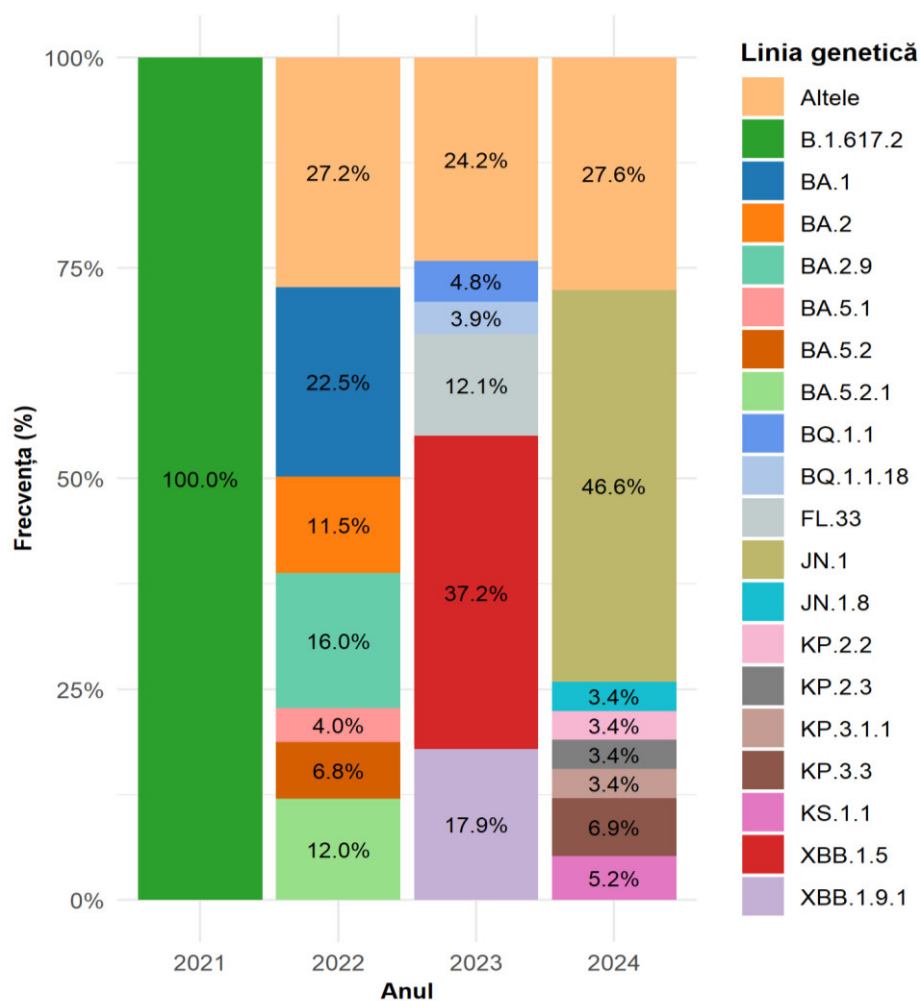
Al patrulea val al pandemiei, atestat în luna septembrie 2023, se explică prin apariția unei linii separate a virusului SARS-CoV-2, varianta BA.2.86, care diferă filogenetic de alte sublinii Omicron, acumulând peste 30 de mutații aminoacidice în proteina Spike.

La sfârșitul anului 2023 și începutul anului 2024 s-a înregistrat unui nou val, al cincilea, de îmbolnăviri de COVID-19, cauzat de apariția unei noi sublinii JN.1, devenită tulpina dominantă la nivel mondial la sfârșitul anului 2023, inclusiv în Republica Moldova. Fiind o subclasă a variantei BA.2.86, JN.1 reprezintă o combinație unică de mutații moștenite de la linia BA.2.86, în special o nouă mutație L455S în domeniul de legare la receptor. Această mutație a fost asociată cu o transmisibilitate crescută și cu o capacitate îmbunătățită de evitare a răspunsului imun. În timp ce BA.2.86 s-a dovedit a fi o variantă mai puțin dominantă, JN.1, care are doar o mutație suplimentară L455S în proteina Spike în comparație cu BA.2.86, a crescut semnificativ evitarea anticorpilor neutralizanți și a devenit varianta dominantă care a circulat atât în republică, cât și în alte țări.

Al șaselea val al pandemiei, care a avut loc în perioada caldă a anului 2024, se caracterizează prin apariția subvariantelor KP.2 și KP.3, obținute din JN.1, care au devenit dominante. Odată cu apariția descendenților, JN.1 a fost înlocuit treptat de subvariantele sale. În special, KP.2 și KP.3 cu mutațiile L455S, F456L și V1104L au apărut simultan. KP.3.1.1 a dobândit o contagiozitate mai mare și un nivel de neutralizare a anticorpilor mai ridicat decât KP.3 și variantele anterioare, ceea ce explică dominanța sa în comparație cu alte subvariante. Astfel, în comparație cu JN.1, KP.3 și KP.3.1.1 au două mutații comune, F456L și Q493E, în domeniul de legare a receptorului (RBD) al proteinei Spike. Aceste mutații contribuie împreună la o mai bună evadare de anticorpi și la o mai bună legare de receptorul gazdei.

*Liniile genetice ale virusului SARS-CoV-2 și prevalența variantelor.* Analiza liniilor genetice a oferit o imagine detaliată a evoluției și a circulației variantelor SARS-CoV-2 pe teritoriul Republicii Moldova în perioada 2021-2024 (figura 12).

Conform datelor obținute, în anul 2021 a existat o circulație exclusivă a liniei B.1.617.2, cunoscută pentru severitatea ridicată a bolii. Datele de secvențiere a genomului evidențiază că în anul 2021 au circulat câteva sublinii ale variantei Delta (AY.122, AY.126, AY.4, AY.4.2, AY.4.2.3, AY.43, AY.46, AY.46.6). Trebuie menționat faptul că toate aceste sublinii au mutații critice în genomii lor, cum ar fi D614G, L452R, P681R și T478K, care se află în proteina S și contribuie la creșterea infecțiozității acestei variante.



**Figura 12. Distribuția temporală a liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 identificate în perioada 2021-2024**

Analiza datelor distribuției temporale a liniilor genetice identificate în perioada 2021-2024 a arătat că varianta Omicron a virusului SARS-CoV-2 a apărut la începutul anului 2022 și a înlocuit varianta Delta, predominantă anterior. Rezultatele secvențierii genomice, începând cu luna iunie 2022, au demonstrat apariția unor noi sublinii BA.4 și BA.5 ale variantei Omicron ca urmare a mutațiilor permanente ale genomului virusului. În anul 2022 au dominat subliniile BA.1 (22,5%), BA.2.9 (16%) și BA.5.2.1 (12%), BA.2 (11,5%) ș.a., iar în perioada anilor 2023 și 2024 variantele predominante au fost XBB.1.5 (37,2%), XBB.1.9.1 (17,9%) și JN.1 (46,6%).

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

Modificările evolutive ale genomului virusului SARS-CoV-2 sunt rezultatul apariției diferitor tipuri de mutații, cum ar fi substituții, delețiile, inserțiile nucleotidice și aminoacidice, DCC (deplasarea cadrului de citire a genei cauzată de inserție sau de deleție). 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  $72,6 \pm 21,1$  per 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.

Un număr semnificativ de substituții nucleotidice a fost detectat la varianta Omicron, cu un număr mediu de  $74,6 \pm 20,1$  substituții pe genom (95 % CI: 73, 76), și la variantele recombinante -  $99,8 \pm 24,2$  (95% CI: 61, 138), în timp ce la varianta Delta a fost înregistrat cel mai mic număr de substituții -  $42,9 \pm 4,5$  (95% CI: 42, 44). Evaluarea comparativă efectuată prin testul neparametric Kruskal Wallis a evidențiat diferențe statistic semnificative ale numărului de substituții de nucleotide în funcție de varianta OMS a virusului SARS-CoV-2 - valoarea testului fiind 124,  $p < 0,001$ .

Aceeași situație a fost observată și în cazul delețiilor. Cel mai mare număr de deleții a fost înregistrat în genomul variantei Omicron -  $50,9 \pm 18,6$  (95 % CI: 49, 52) și în variantele recombinante -  $44,8 \pm 22,7$  (95 % CI: 8,6, 81). Pentru comparație, în genomul variantei Delta au fost detectate în medie  $17,0 \pm 11,5$  (95 % CI: 14, 20) de deleții. Astfel, testul neparametric Kruskal Wallis a evidențiat diferențe statistic semnificative ale numărului de deleții de nucleotide în funcție de varianta OMS a virusului SARS-CoV-2 - valoarea  $p < 0,001$ .

Inserțiile s-au dovedit a fi specifice numai variantei Omicron, cu o valoare medie de  $4,8 \pm 8,5$  (95 % CI: 4,2, 5,5) înlocuiri per genom, și în variantele recombinante -  $4,5 \pm 5,7$  (95 % CI: -4,6, 14). În subliniile variantei Delta inserții nu au fost înregistrate. Analiza, prin aplicarea testului neparametric Kruskal Wallis, a evidențiat diferențe statistic semnificative ale numărului de inserții nucleotidice în funcție de varianta OMS a virusului SARS-CoV-2- valoarea testului fiind 24,  $p < 0,001$ .

Trebuie menționat că analiza mutațiilor genomurilor virale secvențiate a fost realizată la două niveluri: la nivel nucleotidic și la nivel aminoacidic. Aceste analize au fost efectuate simultan la ambele niveluri, deoarece nu toate mutațiile identificate la nivel de nucleotide se reflectă în modificări ale secvenței de aminoacizi și, nu determină alterări ale proprietăților fitotipice. Aceste substituții sunt sinonime, adică nu modifică structura proteinelor. Analiza la nivel de aminoacizi reflectă doar mutațiile nesinonime care au un impact funcțional asupra proteinelor virale. Astfel, analiza mutațiilor aminoacidice, care afectează structura și funcția proteinelor, a evidențiat o tendință similară de creștere a ratelor de mutație în varianta Omicron și în variantele recombinante.

În genomul variantei Omicron, toate tipurile de mutații (substituții, deleții și inserții) la nivelul aminoacizilor de asemenea au prezentat o tendință de creșterea a numărului. Astfel, substituțiile aminoacidice au prezentat un număr mai mare de mutații per genom în variantele Omicron și în cele recombinante, cu valori medii de  $42,1 \pm 20,3$  (95 % CI: 41, 44) și, respectiv,

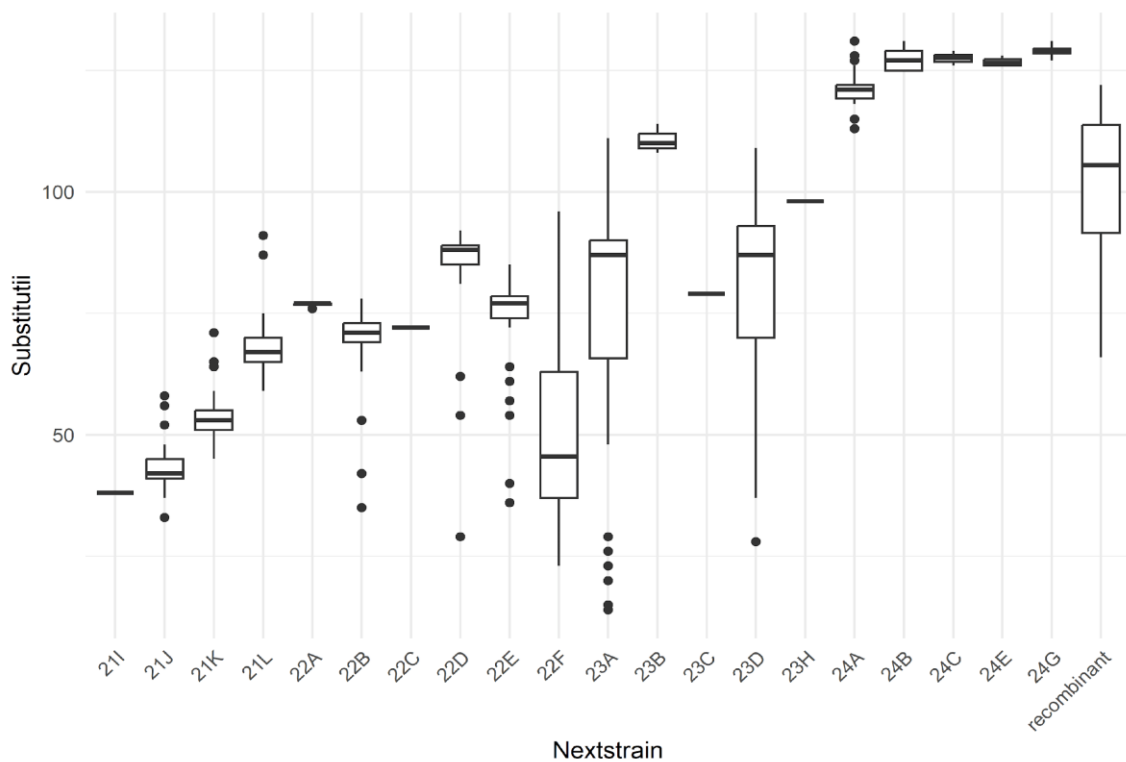
de  $67,8 \pm 27,4$  (95% CI: 24, 111), urmate de varianta Delta cu o medie de  $32,0 \pm 4,2$  (95 % CI: 31, 33). Astfel, testul neparametric Kruskal Wallis a evidențiat diferențe statistic semnificative ale numărului de substituții aminoacidice în funcție de varianta OMS a virusului SARS-CoV-2 - valoarea testului fiind 13,  $p = 0,002$ .

Numărul de deleții aminoacidice a fost mai mare în varianta Omicron –  $12,4 \pm 4,9$  (95 % CI: 12, 13) – și în variantele recombinante –  $13,8 \pm 3,0$  (95 % CI: 9, 19) –, și într-o măsură mai mică în varianta Delta -  $11,9 \pm 5,1$  (95 % CI: 12, 12). Analiza statistică cu ajutorul testului neparametric Kruskal Wallis evidențiat o diferență semnificativă a numărului de deleții aminoacidice în funcție de varianta OMS a virusului SARS-CoV-2, valoarea testului fiind 102,  $p < 0,001$ .

Inserțiile aminoacidice au fost detectate exclusiv în subliniile variantei Omicron, cu o valoare medie de  $0,6 \pm 1,4$  (95 % CI: 0,46–0,67), și în variantele recombinante, cu o valoare medie de  $0,5 \pm 0,6$  (95 % CI: -0,42–1,4). Analiza comparativă detaliată a distribuției inserțiilor aminoacidice și a celorlalte caracteristici genomice ale izolatelor secvențiate, în raport cu variantele OMS ale virusului SARS-CoV-2, este prezentată în tabelul 1, Anexa 1. Testul neparametric Kruskal Wallis a evidențiat diferențe statistic semnificative ale numărului de inserții aminoacidice în funcție de varianta OMS a virusului SARS-CoV-2, valoarea testului fiind 17,  $p < 0,001$ .

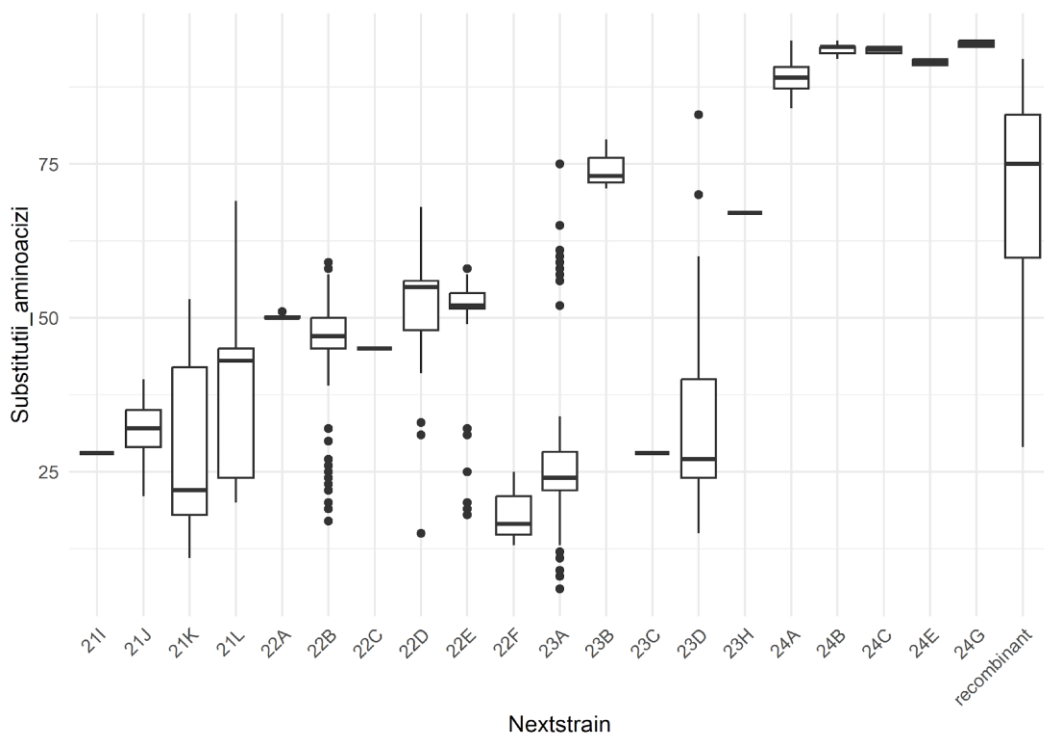
Pe parcursul perioadei de studiu s-a constatat că virusul SARS-CoV-2 a acumulat numeroase mutații. Deși mutațiile care duc la înlocuirea aminoacizilor constituie baza variabilității genetice, multe evenimente de inserție, de deleție și de recombinare sunt probabil elemente critice ale evoluției coronavirusului. Înțelegerea mecanismelor moleculare ale mutațiilor este esențială pentru înțelegerea rolului noilor mutații și pentru descoperirea căilor prin care acestea apar.

În cazul virusului SARS-CoV-2, o mare parte din substituții sunt cauzate de erori de transcripție RdRp apărute în timpul replicării. Diagrama boxplot afișează valoarea medie a substituțiilor în genomul diferitor clade SARS-CoV-2, fiecare punct afișând valoarea medie a mutațiilor în genele sau în proteinele virale. În figura 13 este redată valoarea medie a substituțiilor nucleotidice în funcție de cladele Nextrain, iar în figura 14 — valoarea medie a substituțiilor aminoacidice în diferite clade. Aceste boxploturi foarte clar arată că în timp (din 2021 până în 2024) numărul de substituții nucleotidice și aminoacidice 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 13. Diagrama boxplot a dependenței numărului de substituții nucleotidice de cladele SARS-CoV-2**

Conform datelor rezultatelor, valorile medii ale mutațiilor au variat de la 40 de substituții nucleotidice până la 120 și de la 20 de substituții aminoacidice la aproximativ 80 în comparație cu genomul de referință.



**Figura 14. Diagrama boxplot a dependenței numărului de substituții aminoacidice de cladele SARS-CoV-2**

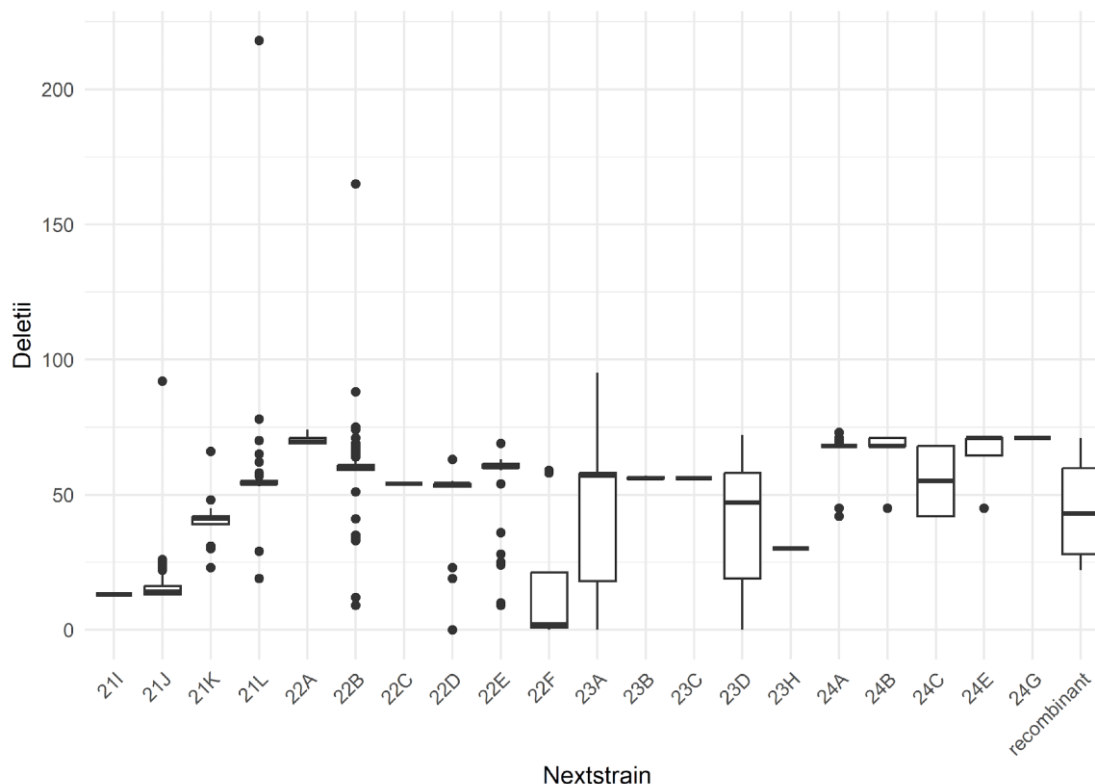
Trebuie remarcat faptul că în graficele de mai sus se observă clar dependența numărului total de substituții de clada virusului SARS-CoV-2. Astfel, numărul de substituții nucleotidice și aminoacidice crește odată cu evoluția virusului și cu apariția de noi clade. Cea mai mare diversitate genetică a fost 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.

Analiza statistică cu ajutorul testului Wilcoxon a dependenței numărului de substituții nucleotidice și aminoacidice de cladele SARS-CoV-2 a arătat că acesta a crescut semnificativ în timp. Compararea cladelor variantei Delta, care au circulat în anul 2021, cu varianta recombinantă a arătat că clada 21I nu s-a diferențiat statistic de varianta recombinantă, având valori  $p=0,469$ . În cazul reprezentanților cladelor ulterioare ale variantei Delta (21J, 21K, 21L) s-a constatat o diferență statistic semnificativă în raport cu numărul de substituții nucleotidice, atât cu variantele recombinante, cât și cu majoritatea reprezentanților variantei Omicron (22A, 22B, 22D, 22E, 23A, 23B, 23D, 24A, 24B, 24C, 24E, 24G) cu valoarea  $p$  în intervalul 0,000 - 0,009.

La aplicarea testului Wilcoxon s-au identificat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între cladele circulante în 2024 (24A, 24B, 24C, 24E, 24G), în 2022 și în 2023 (22D, 22E, 22F, 23A) referitor la numărul de substituții nucleotidice, având valori  $p$  cuprinse între 0,000 și 0,007. Această analiză statistică demonstrează că virusul continuă să muteze și să dobândească noi substituții în timp. În figura 1, Anexa 2 este redat grafic testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de substituții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2.

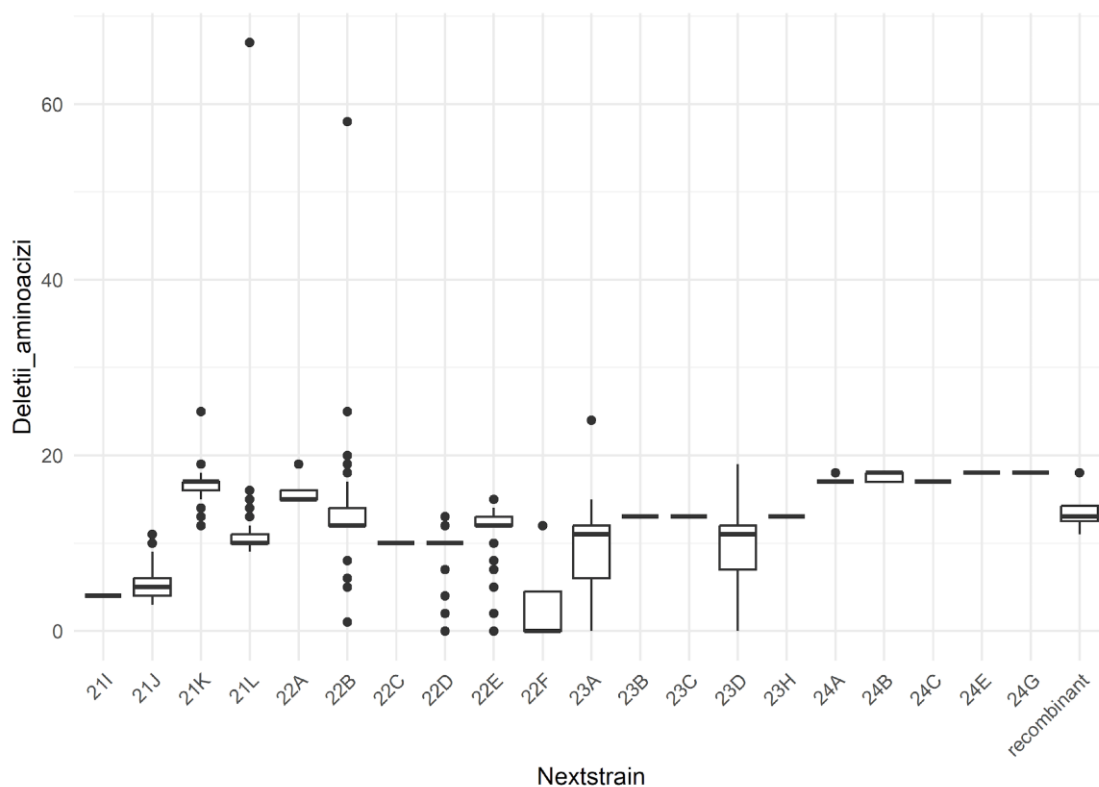
Aplicarea testului Wilcoxon pentru elucidarea dependenței numărului de substituții aminoacidice de cladele SARS-CoV-2 a arătat aceeași tendință de acumulare a acestora în timp. Astfel s-a constatat că cladele variantei Delta (21J, 21K, 21L) diferă statistic semnificativ de majoritatea reprezentanților cladelor variantei Omicron (22A, 22B, 22D, 22E, 23B, 23D, 24A, 24B, 24C, 24E, 24G) și de variantele recombinante în funcție de numărul de substituții aminoacidice, având valori  $p < 0,05$ . În consecință, cladele din 2024 diferă statistic semnificativ de cladele din 2022 și din 2023. Mai precis, toate cladele din 2024 (24A, 24B, 24C, 24E, 24G) diferă statistic semnificativ de cladele 22D, 22E, 22F, 23A în raport cu numărul de substituții aminoacidice, având valori ale  $p < 0,05$ . Corelația dintre acumularea substituțiilor aminoacidice în timp este reprezentată grafic în figura 2, Anexa 2.

Diagrama distribuției delețiilor în genomul virusului SARS-COV-2 în funcție de grupul cladei Nextrain este reprezentată în figurile 15 și 16.



**Figura 15. Distribuția numărului de deleții nucleotidice în cladele virusului SARS-CoV-2**

Pe axa X sunt reprezentate cladele conform nomenclaturii Nextrain, iar pe axa Y este indicat numărul de deleții nucleotidice (figura 15) și de deleții aminoacidice (figura 16) descoperite în aceste clade. Mediană este reprezentată de o bandă orizontală în interiorul dreptunghiurilor. Mustățile diagramelor boxplot, situate de ambele părți ale dreptunghiului, reprezintă intervale de la 25 la 75 percentile ale valorilor datelor, excluzând valorile aberante. Trebuie remarcat faptul că aceste diagrame nu reflectă în totalitate distribuția delețiilor în genomul SARS-CoV-2 în momente diferite, ci tendința de modificare a valorii medii a numărului total de deleții în timpul evoluției acestuia. Din aceste figuri se poate observa că genomul virusului din diferite clade a fost reprezentat de un număr diferit de deleții.



**Figura 16. Distribuția numărului de deleții aminoacidice în cladele virusului SARS-CoV-2**

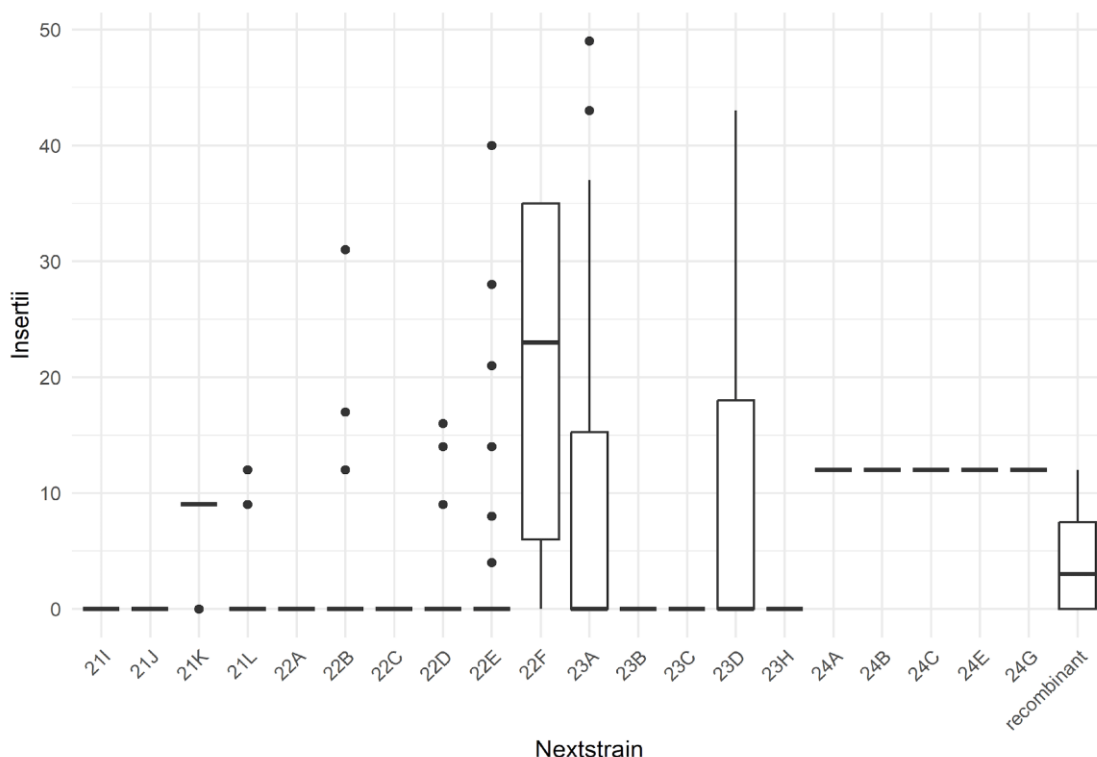
Prezintă interes faptul că creșterea numărului de deleții este vizibilă la compararea cladelor (21I, 21J) variantei Delta, colectate la sfârșitul anului 2021, cu cladele variantei Omicron. În ceea ce privește valoarea medie a numărului total de deleții în cladele variantei Omicron (21K, 21L, 22A, 22B, 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. Trebuie remarcat și faptul că, spre deosebire de genomul de referință, mutațiile din genomii variantelor Delta și Omicron au loc atât în regiunile necodante, ci și codante ale genomului. De exemplu, în comparație cu tulpina de referință, varianta Delta prezintă peste zece deleții în regiunea codantă, șase deleții în gena S, iar pentru Omicron acest număr a crescut la 40-60 după alinierea secvențelor.

Deleția în regiunea codantă nu este la fel de frecventă ca în regiunile necodante, dar este un fenomen comun pentru tulpinile mai recente ale SARS-CoV-2. Această diferență poate fi cauzată de sistemul de degradare asociat cu activitatea endonucleazică a complexului de silențiere a ARN-ului indus în gazdă.

Astfel, analiza statistică cu ajutorul testului Wilcoxon *p*-values a distribuției numărului de deleții nucleotidice în funcție de cladele virusului SARS-CoV-2 a arătat că cladele variantei Delta, care au circulat în 2021 (21J, 21K, 21L), diferă statistic semnificativ în ce privește numărul de deleții nucleotidice de reprezentanții cladei Omicron (22A, 22B, 22D, 22E, 24A, 24B, 24E, 24G),  $p < 0,05$ . Reprezentarea grafică a testului Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de deleții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2 este redată în figura 3, Anexa 2.

În urma analizei valorilor *p* ale testului Wilcoxon privind distribuția numărului de deleții aminoacidice în diferite clade de SARS-CoV-2 se poate concluziona că cladele care au circulat în 2021 (21J, 21K, 21L) diferă statistic semnificativ în ce privește numărul de deleții aminoacidice de cladele din 2022 (22B, 22D, 22E, 22F), având valori *p* cuprinse între 0,000 și 0,044. Totodată, cladele circulante în anul 2024 (24A, 24B, 24C, 24E, 24G) diferă statistic semnificativ în raport cu acest criteriu de cladele din anii 2022 și 2023 (22D, 22E, 22F, 23A, 23B), având valori  $p < 0,05$ . Reprezentarea grafică a testului Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de deleții aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2 este redată în figura 4, Anexa 2.

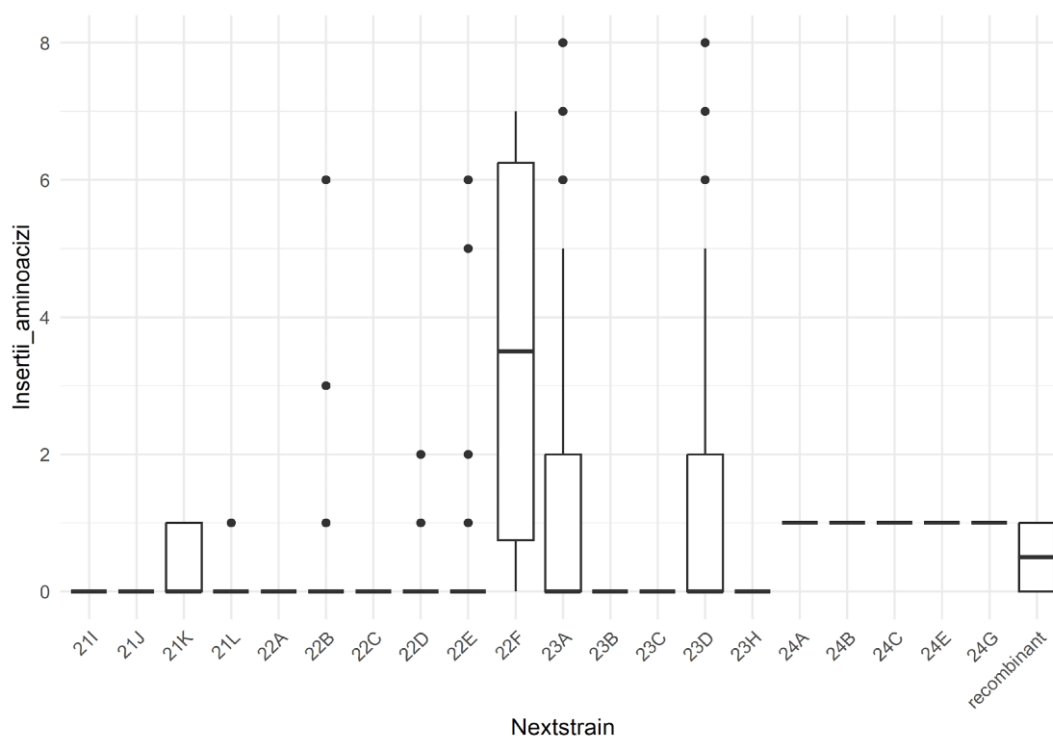
Analiza evoluției virusului SARS-CoV-2 în funcție de apariția inserțiilor în genom a arătat că în majoritatea cazurilor se observă un număr minim de inserții sau chiar absența acestora. Conform datelor obținute, inserțiile nucleotidice (figura 17) și aminoacidice (figura 18) au apărut în principal în 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 17. Distribuția numărului de inserții nucleotidice în cladele 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.

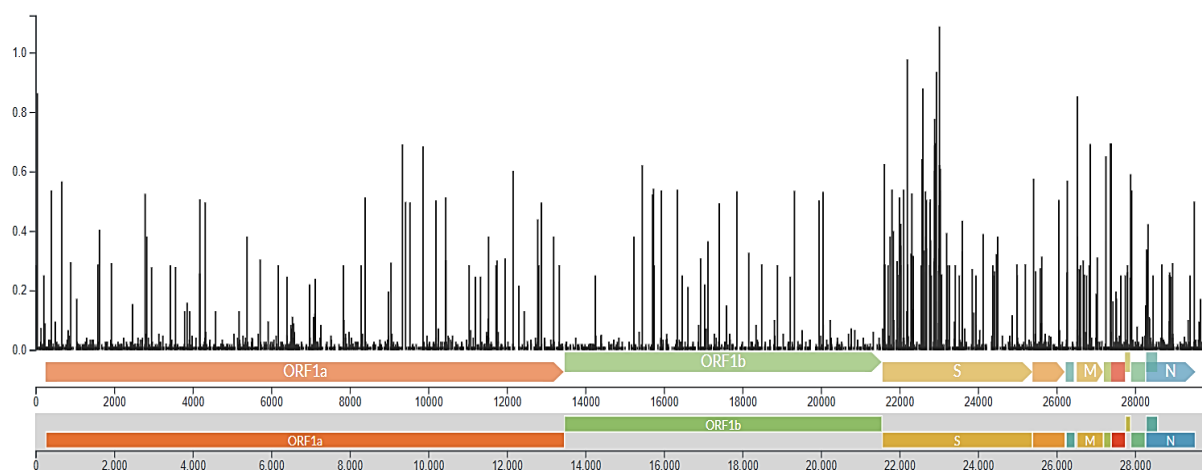
Analiza statistică a repartiției numărului de inserții nucleotidice în genomul virusului SARS-CoV-2 cu ajutorul testului Wilcoxon a evidențiat ca cladele circulante în anul 2024 (24A, 24B, 24C, 24E, 24G) diferă statistic semnificativ de cladele din anii 2021 (21J, 21K, 21L) și 2022 (22A, 22B, 22D, 22E) în raport cu numărul de inserții, având valori  $p < 0,05$ . Reprezentarea grafică a rezultatelor testului Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de inserții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2 este prezentată în figura 5, Anexa 2.



**Figura 18. Distribuția numărului de inserții aminoacidice în cladele virusului SARS-CoV-2**

Totodată, interpretarea statistică a testului Wilcoxon privind repartiția numărului de inserții aminoacidice în funcție de clada virusului SARS-CoV-2, la fel ca testul Wilcoxon privind dependența de numărul de inserții nucleotidice, a evidențiat ca cladele circulante în anul 2024 diferă statistic semnificativ în raport cu acest criteriu de cladele din anii 2021 (21J, 21K, 21L) și 2022 (22A, 22B, 22D, 22E), având valori  $p < 0,05$ . Reprezentarea grafică a rezultatelor testului Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de inserții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2 este prezentată în figura 6, Anexa 2.

Indicele *Shannon* al diversității nucleotidelor în cei 733 de genomi ai virusului SARS-CoV-2 secvențiate este reprezentat pe figura 19, pe axa X fiind indicată poziția genomică, iar pe Y – diversitatea nucleotidelor.



**Figura 19. Diversitatea nucleotidelor în genomii analizați ai virusului SARS-CoV-2**

În conformitate cu datele înregistrate, cea mai mare diversitate a nucleotidelor se află în regiunea codificatoare (CDS) a proteinei Spike. Regiunile cu diversitate ridicată a nucleotidelor reprezintă hotspoturi în genom predispuse mutațiilor și sunt determinate de presiuni evolutive, cum ar fi evadarea imună, iar regiunile cu diversitate scăzută a nucleotidelor au un grad mai mare de conservare și, de regulă, codifică proteine responsabile de funcționarea genomului viral. Cele cinci poziții genomice cu cea mai mare diversitate a nucleotidelor sunt prezentate în tabelul 1.

**Tabelul 1. Poziții genomice ale virusului SARS-CoV-2 cu cea mai mare diversitate a nucleotidelor**

N/o	Poziția genomică	Poziția nucleotidică în CDS	Poziția aminoacidică	CDS	Indicele Shannon	Variante genetice
1.	23018	1456	486	S	1,087	C, G, T
2.	22200	638	213	S	0,976	G, A, T
3.	22942	1380	460	S	0,934	A, G, T
4.	22599	1037	346	S	0,879	G, C, A, T
5.	26529	7	3	M	0,852	C, A, G

CDS – Coding DNA Sequence (secvență codantă de ADN; regiunea genomică care este tradusă în proteină);  
 S – Spike protein (glicoproteina S; proteina de suprafață responsabilă de atașarea virusului la celula gazdă), M – Membrane protein (proteina M; implicată în formarea și structura particulei virale);  
 C – Citozină (bază azotată), G – Guanină (bază azotată), T – Timină (bază azotată), A – Adenină (bază azotată).

### **Profilul mutațiilor nucleotidice (indeluri și substituții).**

Distribuția tipurilor de mutații în probele studiate relevă localizarea preferențială a acestora în genele Spike – ORF1a și ORF1b (tabelul 2).

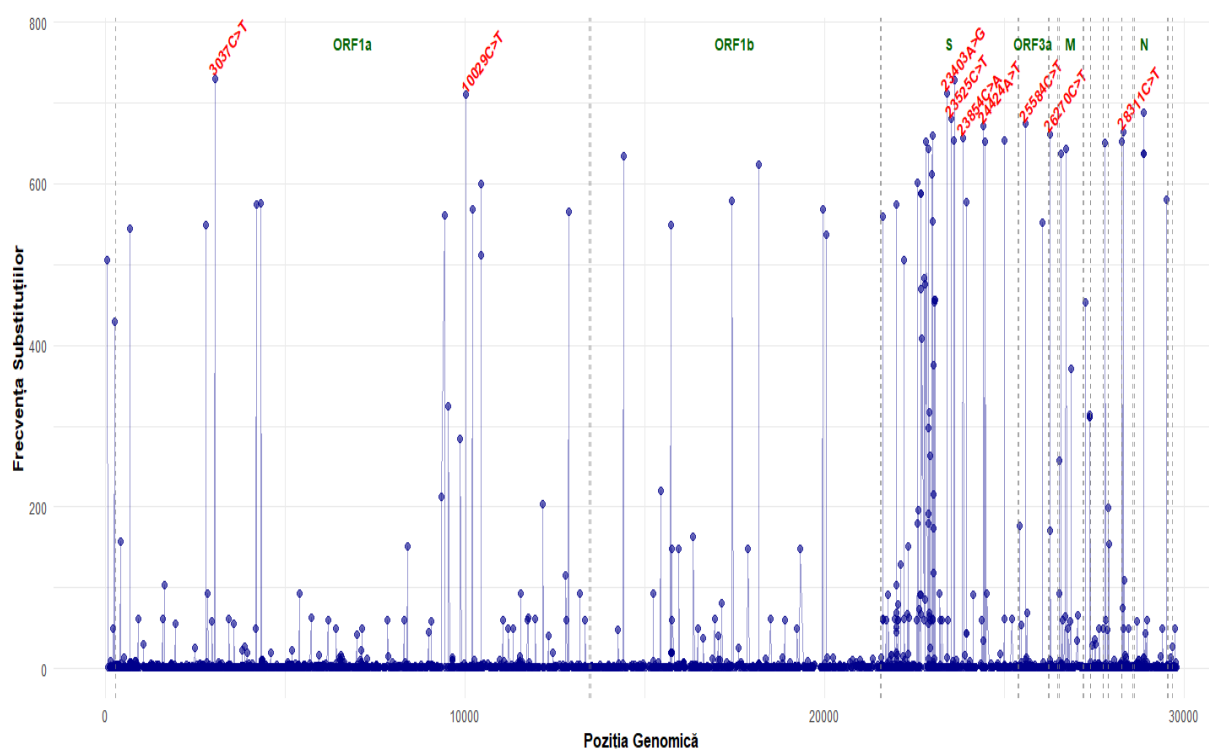
**Tabelul 2. Distribuția per genă a indelurilor și a substituțiilor în genomul virusului SARS-CoV-2**

Genă	Nr. de substituții	Nr. de deleții	Nr. de inserții	Nr. total de mutații
E	925	1	33	959
M	2467	7	7	2481
N	3916	657	14	4587
ORF10	64	0	0	64
ORF14	2085	6	1	2092
ORF1ab	24420	1468	616	26504
ORF3a	1721	13	18	1752
ORF6	1406	1	3	1410
ORF7a	281	9	11	301
ORF7b	804	4	10	818
ORF8	270	50	21	341
ORF9b	1034	637	3	1674
S	22160	2361	248	24769
Toate genele	61553	5214	985	67752

ORF – Open Reading Frame (cadru deschis de citire); E – Envelope protein (proteina de înveliș; implicată în asamblarea și eliberarea particulelor virale); M – Membrane protein (proteina de membrană; rol structural major în organizarea virionului); N – Nucleocapsid protein (proteina nucleocapsidică; leagă ARN-ul viral și participă la replicare și ambalare) S – Spike protein (glicoproteina S; mediază atașarea și pătrunderea virusului în celula gazdă).

Genele ORF1a și ORF1b (împreună ORF1ab), în pofida faptului că reprezintă aproximativ 2/3 din genomul SARS-CoV-2, au acumulat un număr de mutații similar cu gena S care, deși este mai scurtă, prezintă locații funcționale importante ca urmare a rolului central în transmiterea virusului și ca țintă principală pentru sistemul imunitar. Gena N de asemenea reprezintă un număr mare de substituții și de deleții, indicând o variabilitate crescută chiar și în elementele structurale interne ale virusului. Celorlalte gene le revine un număr mai mic de mutații, cu un anumit grad de conservare în gena ORF10 în care nu au fost identificate mutații de tip indel.

Frecvența numerică și poziția genomică a substituțiilor identificate ale virusului SARS-CoV-2 sunt reflectate în figurile 20.



**Figura 20. Numărul de apariții și locația în genom a substituțiilor identificate ale virusului SARS-CoV-2**

Pe axa X este reprezentată poziția genomică (de la 1 la ~30000 perechi de baze), iar pe Y – frecvența substituțiilor/indelurilor, indicând câte probe din eșantionul analizat prezintă o mutație la o anumită poziție. Graficul substituțiilor evidențiază o distribuție neuniformă cu vârfuri proeminente ce indică prezența unor zone hotspot cu o frecvență înaltă a mutațiilor. Cele mai frecvente sunt etichetate și includ mutații precum:

- 3037C >T, 10029C >T – mutații situate în prima jumătate a genomului viral, în gena ORF1a, având o frecvență semnificativă. 3037C >T este o mutație sinonimă timpurie identificată încă în fazele timpurii ale pandemiei, iar 10029C >T a fost prezentă în toate variantele dominante la nivel global începând cu jumătatea anului 2021.
- 23403A >G, 23854C >A, 23525C >T – substituții localizate în gena Spike cu o frecvență de peste 600 de apariții. Primele două sunt mutații nonsinonime semnificative, cu impact funcțional major și cu variante translate în molecula de proteină (D614G și N764K).
- 28311C >T – mutație frecventă nonsinonimă cu impact funcțional situată în gena N. Translarea acesteia în nucleocapsidă este P13L.

Figura 21, ce reflectă distribuția și frecvența mutațiilor de tip indel ale virusului SARS-CoV-2, oferă o imagine detaliată asupra pozițiilor din genom în care apar modificări structurale semnificative. Marcajul verde corespunde delețiilor, iar cel albastru inserțiilor, fiecare punct

fiind plasat în dreptul poziției genomice unde apare modificarea. În ansamblu se observă că deși majoritatea indelurilor au frecvențe reduse comparativ cu substituțiile, apărând în doar câteva secvențe, există poziții unde numărul acestora este foarte ridicat. Astfel, frecvența în aceste poziții genomice cheie depășește câteva sute de apariții, ceea ce indică la mutații stabile caracteristice variantelor virale dominante.



**Figura 21. Numărul de apariții și locația în genom a indelurilor identificate**

Printre cele mai notabile deleții evidențiate în grafic se numără deleția de la pozițiile 11288–11296 (excluderea secvenței TCTGGTTTT), situată în cadrul de citire ORF1ab și care apare cu o frecvență extrem de ridicată (în peste 500 de probe). Deleția induce translarea în mutația aminoacidică p.3675–3677del care rezultă în excluderea serinei, glicinei și fenilalaninei din molecula de proteină.

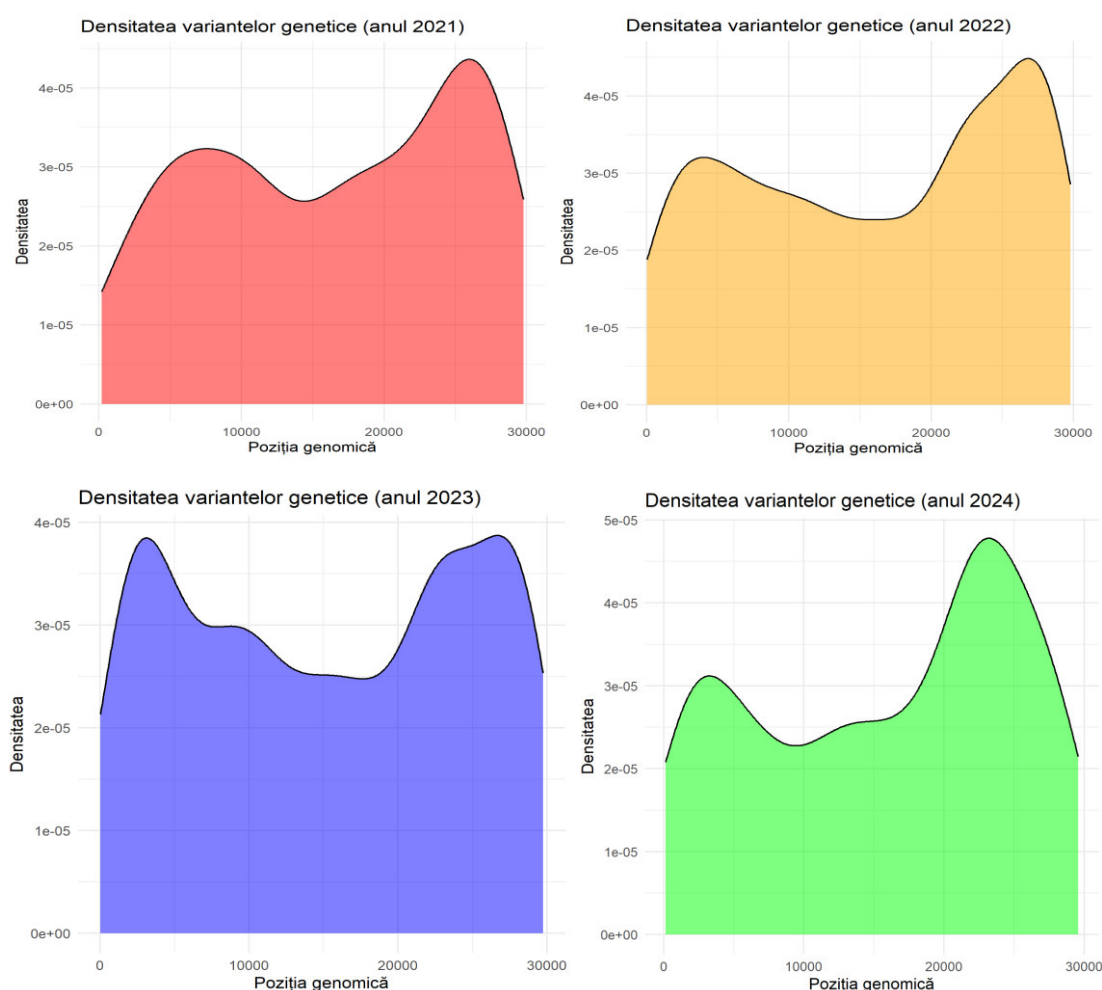
O frecvență înaltă au înregistrat de asemenea delețiile 21633–21641delTACCCCCTG și 21766–21771delACATGT, ambele localizate în gena Spike și cunoscute pentru asocierea lor cu modificări structurale ale proteinei S ce pot influența recunoașterea virusului de către anticorpi și eficiența neutralizării acestuia.

Alte evenimente importante includ mutația 28362–28370del, situată la începutul genei N, care se translatează în mutația AA ERS31-33 (acid glutamic - E, arginină - R și serină - S) și este

specifică unor variante Omicron. Această deleție induce fenomenul NGTF (*N-gene target failure*) și permite diagnosticarea rapidă a variantelor Omicron prin utilizarea metodei RT-PCR.

Astfel, zonele esențiale pentru funcțiile bazale ale virusului rămân în mare parte intacte în timp ce domenii expuse la presiune imună, cum este proteina Spike, reprezintă o acumulare mai mare de indeluri. Inserțiile, reprezentate prin puncte albastre, sunt mai rare și au frecvențe generale scăzute, ceea ce sugerează fie o instabilitate mai mare a acestui tip de mutație, fie o influență mai redusă asupra adaptabilității virale comparativ cu delețiile. Tabloul molecular al indelurilor confirmă prezența unor deleții majore care au jucat un rol central în evoluția virusului, devenind markeri importanți pentru identificarea liniilor genetice predominante.

Graficele de densitate a mutațiilor în genom pentru perioada 2021-2024 relevă imaginea evoluției SARS-CoV-2 în acești ani (figura 22).



**Figura 22. Densitatea substituțiilor nucleotidice în genomul virusului SARS-CoV-2 în perioada 2021-2024**

Vârfurile de densitate scot în evidență hotspoturi persistente în genele ORF1a și S, dar și schimbări dinamice, precum concentrarea mutațiilor ORF1a în 2023 și în 2024. Comparativ cu ceilalți ani, în 2023 se observă o activitate mutațională sporită în gena ORF1a, sugerând

prezența unor presiuni selective intense asupra acestei regiuni genomice care codifică proteine responsabile pentru replicarea ARN-ului viral și alte procese esențiale pentru ciclul de viață al virusului.

În perioada 2023-2024 se disting vârfuri și în regiuni genomice noi (10 mii pentru 2023 și 10-15 mii pentru 2024), indicând o tendință de schimbare a focusului evolutiv. În 2024, cea mai mare presiune evolutivă se remarcă asupra genei S, această tendință reflectând adaptarea virusului la imunitate, la vaccinuri și la posibile tratamente.

Mutațiile în proteina Spike sunt cele mai importante din punct de vedere al semnificației clinice, deoarece influențează direct transmisibilitatea virusului, eficacitatea vaccinurilor și severitatea bolii COVID-19. Lista celor mai relevante mutații identificate și care joacă un rol crucial în evadarea imună, în capacitatea virusului SARS-CoV-2 de a infecta sau în rezistența la anticorpi monoclonali este prezentată în tabelul 2.

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

**Mutații sinonime (synonymous mutations) și nonsinonime (non-synonymous mutations).** Identificarea și clasificarea mutațiilor genomice după efectul asupra proteinelor reprezintă o etapă fundamentală în înțelegerea mecanismelor de adaptare și a potențialului patogenic al diferitor variante virale.

Mutațiile sinonime (sau silențioase) sunt modificări nucleotidice care nu duc la schimbarea aminoacidului codificat. Acest fenomen este posibil ca urmare a degenerării codului genetic unde un singur aminoacid poate fi codificat de mai mulți codoni diferiți. Deși nu modifică proteina rezultată, aceste mutații pot influența stabilitatea ARN-ului mesager, rata translației sau pot avea alte efecte subtile asupra biologiei virale.

Mutațiile nonsinonime (sau *missense/nonsense*) sunt modificări nucleotidice care duc la schimbarea aminoacidului codificat sau la apariția unui codon stop prematur și la biosinteza unor proteine incomplete. Aceste mutații au un impact direct asupra structurii și funcției proteinelor virale, putând modifica proprietăți esențiale ale virusului precum transmisibilitatea, patogenitatea sau capacitatea de a evada răspunsul imun al gazdei. Distribuția mutațiilor sinonime și nonsinonime per genă în genomul SARS-CoV-2 este reprezentată în tabelul 3.

În total, în setul de date au fost identificate 13 672 de mutații sinonime și 54 080 de mutații nonsinonime. Astfel, se observă o presiune selectivă puternică, care favorizează modificările proteice, și vizibilă pe întreg genomul, dar cu diferențe semnificative de la o genă la alta.

**Tabelul 3. Distribuția per genă a mutațiilor sinonime și nonsinonime ale virusului SARS-CoV-2**

<b>Genă/Genom</b>	<b>Mutații sinonime</b>	<b>Mutații nonsinonime</b>
E	23	936
M	589	1892
N	111	4476
ORF10	24	40
ORF14	0	2092
ORF1ab	9157	17347
ORF3a	931	821
ORF6	459	951
ORF7a	95	206
ORF7b	659	159
ORF8	24	317
ORF9b	0	1674
S	1600	23169
Toate genele	13672	54080

ORF – Open Reading Frame (cadru deschis de citire); E – Envelope protein (proteina de înveliș; implicată în asamblarea și eliberarea particulelor virale); M – Membrane protein (proteina de membrană; rol structural major în organizarea virionului); N – Nucleocapsid protein (proteina nucleocapsidică; leagă ARN-ul viral și participă la replicare și ambalare) S – Spike protein (glicoproteina S; mediază atașarea și pătrunderea virusului în celula gazdă).

Gena Spike prezintă 1600 de mutații sinonime și 23 169 de mutații nonsinonime, fiind cel mai mare număr absolut de mutații nonsinonime comparativ cu alte gene. Având în vedere rolul crucial al proteinei Spike în legarea de receptorul celular ACE2 și în evaziunea imună, mutațiile nonsinonime pot oferi virusului avantaje competitive în termeni de transmisibilitate și evadare imună, explicând astfel evoluția rapidă a variantelor.

Gena N, responsabilă pentru proteina care încapsulează genomul viral, prezintă de asemenea un număr foarte mare de mutații nonsinonime (4 476) pentru dimensiunea sa, indicând o adaptare continuă a virusului. Mutațiile nonsinonime din această genă pot influența asamblarea virionului, stabilitatea genomului și interacțiunile cu sistemul imunitar al gazdei.

Gena ORF1ab codifică poliproteine complexe esențiale pentru replicarea virală și are un număr mare de mutații atât sinonime (9 157), cât și nonsinonime (17 347). Acest fapt reflectă dimensiunea sa și importanța centrală în ciclul de viață al virusului. Totuși, presiunea selectivă pare a fi mai echilibrată decât în cazul genei Spike, sugerând că multe mutații nonsinonime din această regiune pot fi dăunătoare, în timp ce altele contribuie la optimizarea replicării virale.

Gena E codifică o proteină mică, dar esențială pentru asamblarea și eliberarea virionilor, și prezintă un număr foarte mic de mutații sinonime (23). Majoritatea celor 936 de mutații nonsinonime reprezintă cel mai probabil mutații care apar aleatoriu, dar care nu sunt fixate în populația virală.

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 23) 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.

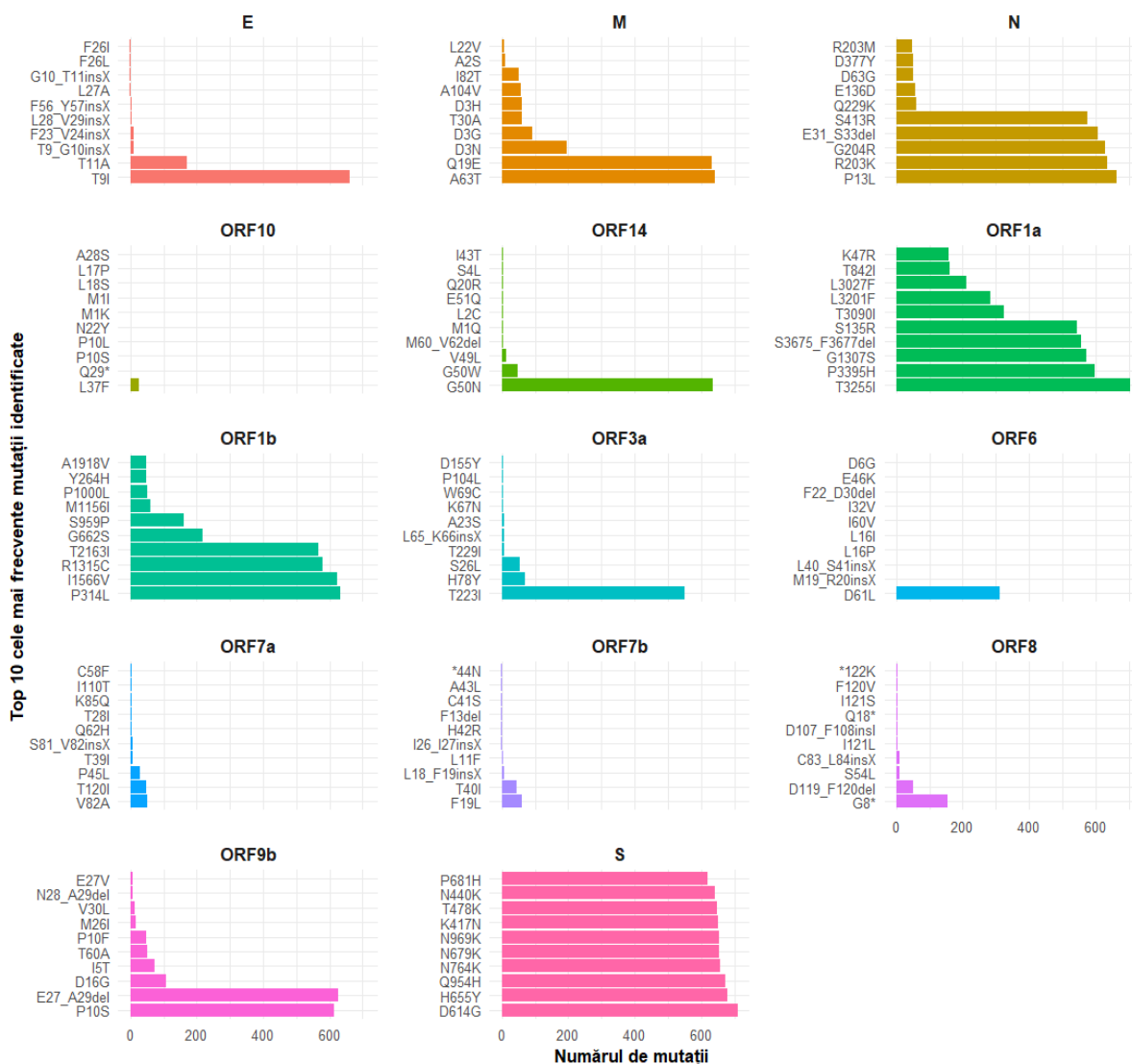


Figura 23. Top 10 cele mai frecvente mutații aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2

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.

**Mutații semnificative.** Mutațiile cu impact funcțional semnificativ pot modifica proprietăți esențiale ale virusului precum transmisibilitatea, capacitatea de evadare imună și răspunsul la terapii antivirale sau la anticorpi monoclonali. Acestea nu sunt doar mutații aleatorii ale proteinelor virale, ci modificări selectate și fixate în populația virală datorită avantajelor competitive majore pe care le conferă. Ele se întâlnesc frecvent la variantele de îngrijorare (VOC) și reprezintă adaptarea virusului la utilizarea pe scară largă a măsurilor de prevenție și tratament.

Cele mai relevante mutații cu impact funcțional major, identificate în setul de date analizat, sunt prezentate în tabelul 1 și 2, Anexa 3 și includ, în mare parte, modificări caracteristice variantelor VOC.

Substituția D614G, detectată în 711 de secvențe analizate, este una dintre cele mai timpurii și semnificative mutații în proteina Spike care a devenit rapid dominantă la nivel global ca urmare a creșterii transmisibilității și a infecțiozității virusului. Această substituția stabilizează proteina Spike facilitând legarea la receptorul ACE2 și fuziunea membranei.

Substituția P13L, localizată în nucleocapsidă, a fost depistată în 664 de probe. Deși impactul direct al P13L nu este pe deplin elucidat, poziția sa sugerează o influență asupra stabilității ARN-ului viral sau a interacțiunilor proteinei N cu alte componente virale sau celulare. Este știut că proteina N este multifuncțională, esențială pentru replicarea ARN-ului viral și evaziunea răspunsului imun al gazdei.

Alte modificări semnificative localizate în proteina S sunt următoarele: N764K, K417N, T478K, N440K. Substituția N764K, detectată în 657 de secvențe, generează situsuri de clivaj pentru proteaza SKI-1/S1P, contribuind la creșterea infecțiozității. K417N, identificată în 652 de secvențe, este situată în regiunea RBD a proteinei Spike și ajută la evaziunea imună prin modificarea afinității de legare a anticorpilor la RBD, fiind o mutație-cheie în varianta Beta. T478K, depistată în 649 de izolate, la fel este situată în regiunea RBD a proteinei Spike și a fost frecventă în varianta Delta și în unele linii Omicron, facilitând evaziunea imună și influențând probabil afinitatea legării la receptorul ACE2, sporind astfel transmisibilitatea virusului. N440K, determinată în 641 de secvențe și care modifică proteina S, reducând detectarea și neutralizarea acesteia de către unii anticorpi, a fost prezentă în diverse linii filogenetice.

Substituția R203K înregistrată în 636 de secvențe, în proteina N, corelează cu o creștere semnificativă a replicării virale. Aminoacizii din pozițiile 203 și 204 se află într-o regiune intrinsec dezordonată a proteinei N, crucială pentru interacțiunile proteice și reglarea ciclului de viață viral. Mutația poate optimiza aceste interacțiuni, facilitând replicarea.

P314L (detectată în 633 de secvențe) este una dintre cele mai răspândite mutații în genomul SARS-CoV-2 și servește adesea ca marker filogenetic. Localizată în regiunea ORF1ab, această mutație ar putea influența rata de elongație a lanțului de ARN și stabilitatea complexului de replicare, contribuind astfel la fitnessul general al virusului.

Substituția G204R, identificată în 629 de secvențe, frecvent în coprezență cu R203K, contribuie la creșterea replicării virale prin optimizarea organizării ribonucleoproteinei virale. Această combinație de mutații în proteina N a fost asociată cu o virulență sporită în anumite variante.

Printre mutațiile semnificative localizate în proteina Spike se numără următoarele: P681H, G142D, S373P, E484A, S371F, N501Y, L452R, Q493R, Y144del, P681R, S371L, E484K, R346K. Mutația P681H, detectată în 619 secvențe și specifică pentru varianta Alpha, facilitează fuziunea virală cu membranele celulare, contribuind astfel la o transmisibilitate sporită.

G142D, depistată în 614 probe și localizată în domeniul N-terminal (NTD) al proteinei Spike, este implicată în evaziunea imună, modificând epitopi recunoscuți de anumite clase de anticorpi neutralizanți.

S373P, identificată în 588 de secvențe și specifică variantelor Omicron, are un impact în anumite schimbări conformaționale RBD, facilitând legarea la ACE2 și reducând recunoașterea de către anticorpi.

E484A, întâlnită în 552 de probe, contribuie la evaziunea imună, modifică epitopii recunoscuți de anticorpii generați prin infecție naturală sau vaccinare.

S371F, detectată în 496 de probe, este o mutație caracteristică pentru varianta Omicron și contribuie la modificările de conformație RBD și la evaziunea imună.

N501Y, prezentă în 453 de secvențe, este considerată o mutație emblematică în proteina Spike care crește semnificativ afinitatea de legare a virusului la receptorul uman ACE2. Fiind o mutație-cheie în variantele Alpha, Beta, Gamma și, ulterior, în Omicron, a avut un rol important în răspândirea pandemiei.

L452R, identificată în 257 de probe, a fost o mutație definitorie pentru varianta Delta, fiind asociată cu o transmisibilitate crescută și o rezistență parțială la anticorpi.

Q493R (216 secvențe), similară cu Q493K, a fost identificată în variantele Omicron și modulează recunoașterea de către anticorpi.

Y144del, detectată în 125 de probe, este o deleție implicată în evaziunea imună prin eliminarea unor epitopi recunoscuți de anumite clase de anticorpi neutralizanți.

P681R (identificată în 110 secvențe), prezentă în variantele Delta și Omicron, induce o creștere a infecțiozității și a transmisibilității.

S371L, înregistrată în 92 de secvențe, în special la varianta Omicron, și similară cu S371F, contribuie la modificări structurale ale domeniului de legare la receptor.

E484K, depistată în 60 de secvențe, este o mutație care reduce semnificativ neutralizarea de către anticorpi, atât de cei induși de vaccin, cât și de cei postinfecție. Prezentă în variante precum Beta și Gamma, contribuie la fenomenul de *immune escape* care permite reinfecția și reduce eficacitatea unor tratamente cu anticorpi monoclonali.

R346K, prezentă în 48 de probe, se întâlnește în special în varianta Omicron și este asociată cu o evaziune imună semnificativă atât față de anticorpii generați de infecții, cât și de vaccinuri.

R203M, localizată în proteina N și detectată în 49 de secvențe, este similară cu R203K, fiind implicată în creșterea replicării virale.

Analiza mutațiilor cu impact funcțional major evidențiază o concentrare a modificărilor în proteina Spike, reflectând importanța acesteia ca determinant central al adaptabilității virale și al răspunsului imun. Mutațiile localizate în domeniul RBD (precum N501Y, L452R, Q493R, E484A/K și S371F/L) modifică direct afinitatea pentru receptorul ACE2 și concomitent alterează recunoașterea de către anticorpii neutralizanți, facilitând fenomenele de *immune escape*. Unele dintre acestea, cum este cazul N501Y și L452R, au fost mutații definitorii pentru variantele Alpha și Delta contribuind la creșterea transmisibilității și la diseminarea rapidă a virusului la nivel global. Alte substituții precum E484A și E484K influențează epitopii recunoscuți de anticorpii postinfecție sau postvaccinare, crescând riscul de reinfecție și reducând eficiența unor terapii cu anticorpi monoclonali.

**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.

Mutația A23048G, care presupune înlocuirea guaninei G cu adenina A în poziția 23048, a fost detectată în 80 (10,9 %) de secvențe, exclusiv în varianta Omicron 80 (11,8 %) (95 % CI: 9,3 %, 14 %), valoarea testului statistic fiind 7,0 și  $p = 0.045$ .

Mutația T22686C a fost identificată în 97 (13,2 %, 95 % CI: 11 %, 16 %) de secvențe, toate aparținând variantei Omicron 97 (14,3%, 95 % CI: 12 %, 17 %). Evaluarea comparativă a testului Chi-pătrat a demonstrat diferențe statistic semnificative, valoarea testului fiind de 8,7,  $p = 0.015$ .

Mutația A10447G ( $n=9$ ), atestată în subliniile variantei Omicron 8 (1,2 %) (95 % CI: 0,37 %, 2,0 %) și la o variantă recombinantă (25,0 %) (95 % CI: 0,00 %, 67 %). Evaluarea comparativă efectuată prin testul Chi-pătrat a evidențiat diferențe statistic semnificative, valoarea testului fiind 19,  $p = 0,034$ .

Mutația privată A10449C, localizată în regiunea ORF1ab, a fost identificată predominant în varianta Omicron 13 (1,9 %) (95 % CI: 0,88 %, 2,9%) și în secvența variantei recombinantă (25,0%) (95 % CI: 0,00 %, 67%). Analiza statistică prin aplicarea testului Chi-pătrat a evidențiat o diferență semnificativă, valorile testului fiind 12,  $p = 0,048$ .

Mutația T44C, în număr de 56 (7,6 %) (95 % CI: 5,7 %, 9,6 %), a fost înregistrată în subliniile variantei Omicron 55 (8,1 %) (95 % CI: 6,0 %, 10,0 %) și la o variantă recombinantă (25,0 %) (95 % CI: 0,00 %, 67,0 %). Evaluarea comparativă cu ajutorul testului Chi-pătrat a evidențiat diferențe statistic semnificative, valoarea testului fiind 6,0,  $p = 0,048$ .

Cea mai des întâlnită mutație privată T9344C, localizată în regiunea ORF1ab, a fost detectată în 280 (38,2 %) (95 % CI: 35 %, 42 %) de secvențe și presupune că timina a fost înlocuită cu citozină în poziția 9344. Drept urmare, această mutație a fost regăsită exclusiv în varianta Omicron 280 (41,2 %) (95 % CI: 37 %, 45 %). Analiza statistică cu ajutorul testului Chi-pătrat a evidențiat diferențe statistic semnificative, valoarea testului fiind 35 și  $p < 0,001$ .

Trebuie menționat faptul că virusul SARS-CoV-2 continuă să evolueze, dobândind diverse mutații, inclusiv private, care adesea îi modifică proprietățile fenotipice, ceea ce influențează negativ eficacitatea vaccinurilor și a metodelor de tratament existente. Prin urmare,

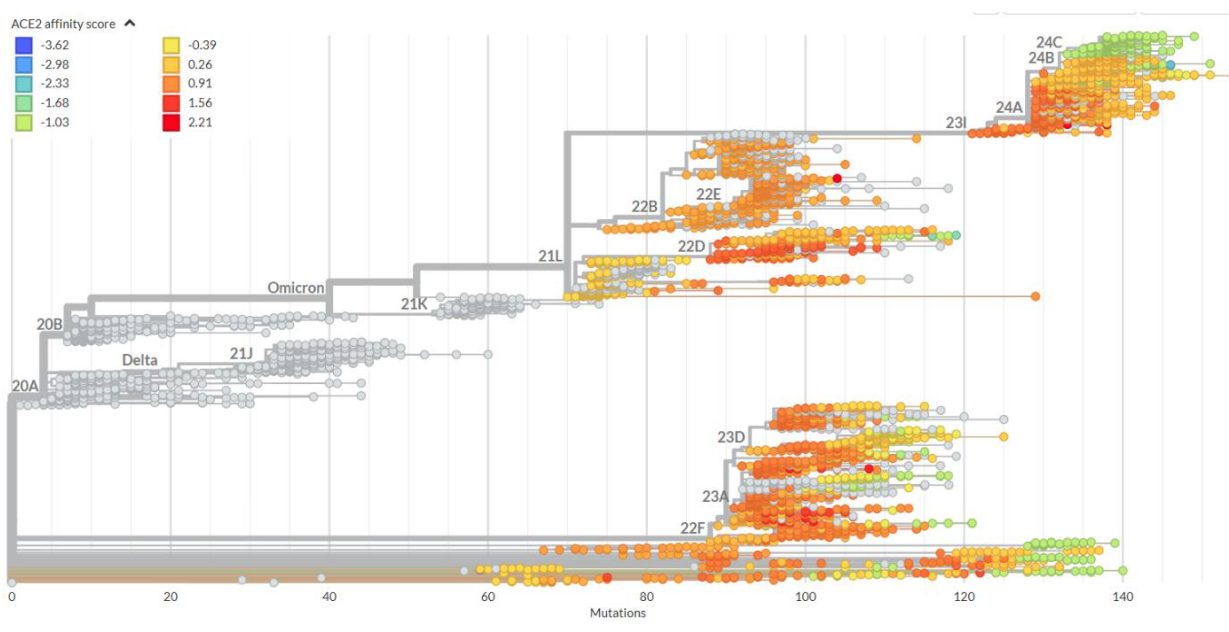
înțelegerea și explicarea răspândirii și a evoluției virusului SARS-CoV-2 sunt esențiale pentru dezvoltarea și perfecționarea vaccinurilor, și îmbunătățirea strategiilor de sănătate publică.

Analiza statistică a tuturor mutațiilor private evaluate în funcție de varianta OMS a virusului SARS-CoV-2 este interpretată în tabelul 2, Anexa 1.

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

Evoluția continuă a 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, 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 24).



**Figura 24. Arborele filogenetic al izolatelor SARS-CoV-2 în funcție de scorul de afinitate ACE-2**

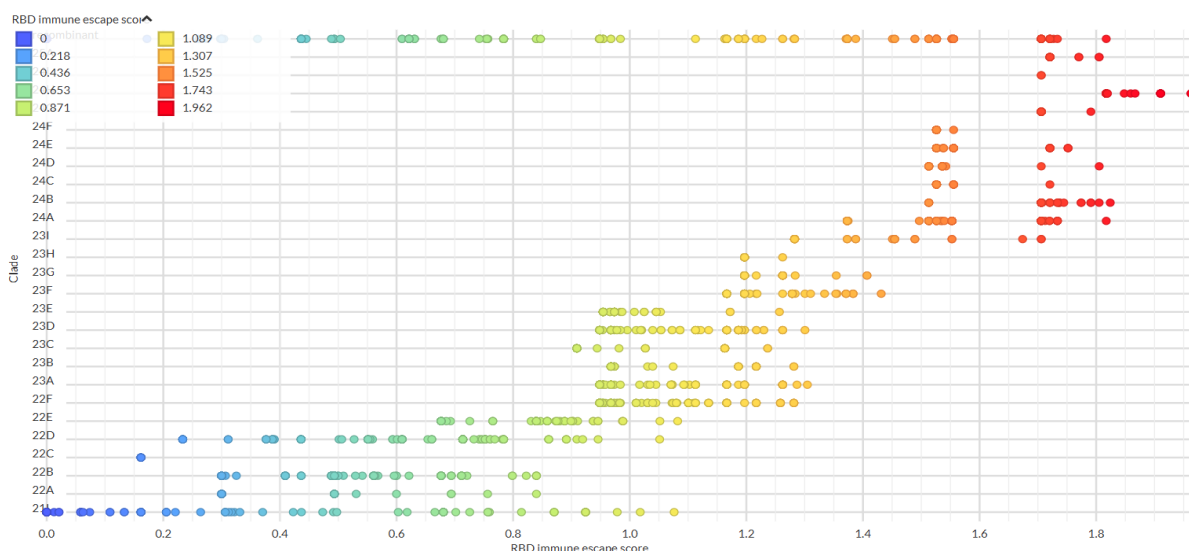
Conform graficului, se observă o creștere bruscă a scorului de afinitate ACE2 la varianta Omicron în comparație cu varianta Delta (21I, 21J) și o tendință clară de creștere a acestuia la subliniile variantei Omicron, ceea ce se explică prin faptul că virusul a devenit mai contagios. Din cladele variantei 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 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 25).



**Figura 25. 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 figura 25) 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 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.

### 3.5. Concluzii la capitolul 3

1. Analiza filogenetică a izolatelor virusului SARS-CoV-2, circulante pe teritoriul Republicii Moldova în perioada 2021-2024, a demonstrat prevalența variantei Omicron (B.1.1.529). Din cele 733 de secvențe analizate, 680 (92,77 %) aparțin variantei Omicron, 49 (6,7 %) – variantei Delta (B.1.617.2) și patru (0,6 %) – variantei recombinante.

2. Varianta Omicron, conform analizei bioinformatică a secvențelor genomului virusului SARS-CoV-2, a apărut pe teritoriul țării la începutul anului 2022, înlocuind varianta Delta.

3. Studiarea relației dintre numărul de persoane pozitive COVID-19 în și distribuția liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 a arătat că apariția în populație a unei noi variante de mutație a provocat majorarea numărului de infectări și, respectiv, un nou val epidemic.

4. Analiza comparativă a variantelor SARS-CoV-2 a demonstrat că evoluția virusului și modificările genomice ale acestuia au fost determinate în principal de substituții, în medie  $72,6 \pm 21,1$  per genom, urmate de deleții, în medie  $48,6 \pm 20,1$  per genom, și mai rar de inserții cu DCC, în medie  $4,5 \pm 8,3$  și, respectiv,  $1,7 \pm 2,2$  per genom.

5. În secvențele genomice ale SARS-CoV-2 obținute au fost identificate 13 672 de mutații sinonime, care provoacă schimbarea aminoacidului codificat și 54 080 de mutații nonsinonime, care cauzează apariția unui codon stop prematur și biosinteza unor proteine incomplete.

6. Depistarea în secvențele genomice ale SARS-CoV-2 analizate de mutații private caracteristice numai pentru tulpinile circulante pe teritoriul Republicii Moldova ilustrează evoluția genomului virusului la nivel național. Analiza statistică a evidențiat o diferență semnificativă pentru zece mutații private, cu valori  $p < 0,05$ .

7. Determinarea în eșantioanele analizate a tendinței de creștere a scorului de afinitate ACE2 la tulpinile cu cel mai mare număr de mutații este o dovadă a sporirii capacității de infectare a virusului odată cu creșterea numărului de mutații.

8. Rezultatele obținute demonstrează elocvent că evoluția a virusului SARS-CoV-2 la nivel național în perioada pandemică și postpandemică continuă. De aceea, pentru a perfecționa măsurile de control a răspândirii virusului este importantă monitorizarea genomică a acestuia.

## 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 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.

Secvențierea genomică a probelor din apele uzate de la sfârșitul anului 2024 a demonstrat ca procentul GC s-a menținut în jurul valorii de 40 %, iar acoperirea genomului a fost de peste 75 % pentru proba umană și sub 25 % pentru majoritatea probelor de apă uzată. Acoperirea de secvențiere a probelor analizate în funcție de poziția genomică este prezentată în figura 26.

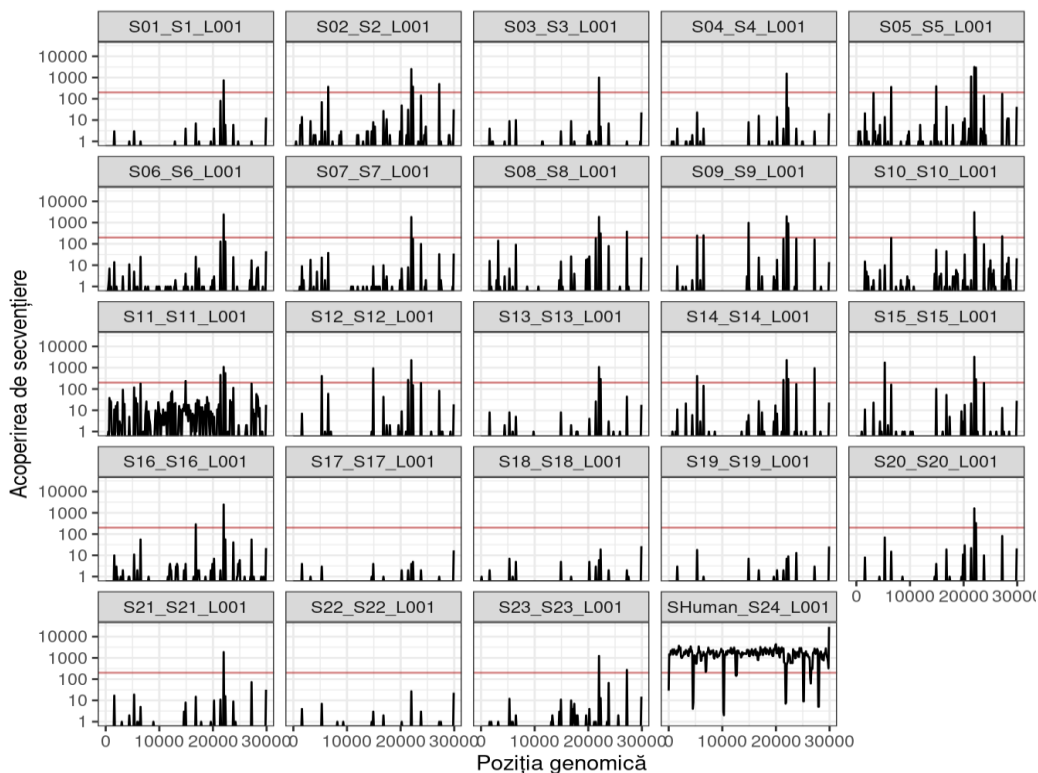


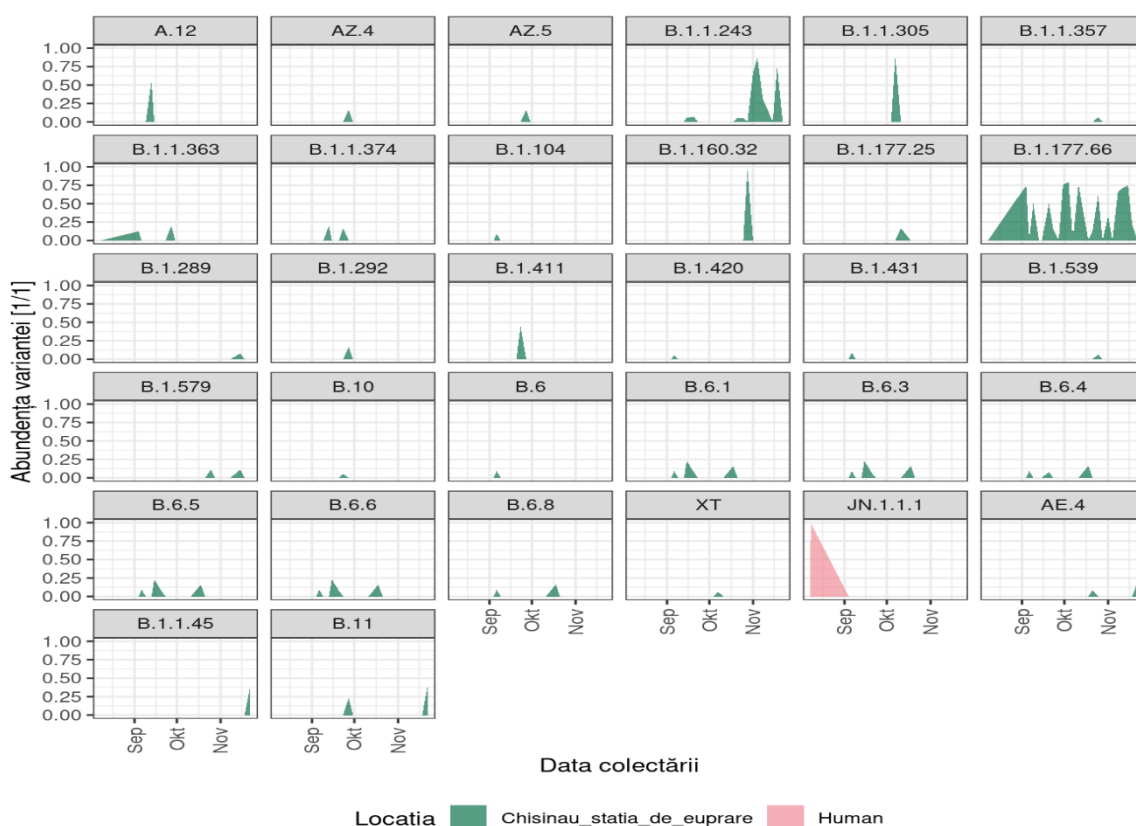
Figura 26. Acoperirea de secvențiere a probelor de ape uzate analizate și secvențiate în anul 2024

Graficul reprezintă acoperirea secvențierii pe întregul genom al virusului SARS-CoV-2 pentru probele analizate de apă uzate și o probă umană de control (fațeta SHuman\_S24\_L001). Axa Y corespunde numărului de citiri mapate la fiecare poziție genomică, linia roșie orizontală indicând un prag de 200 de citiri. Axa X arată poziția genomică de-a lungul genomului SARS-CoV-2 (poziția nucleotidelor). Fiecare fațetă corespunde unei probe individuale.

În pofida faptului că acoperirea insuficientă a genomului viral în probele de ape uzate a reprezentat un factor limitativ pentru interpretarea datelor, analiza bioinformatică a permis detectarea și cuantificarea variantelor prin utilizarea instrumentelor avansate precum algoritmul de aliniere *Minimap* și algoritmul de demultiplexare a liniilor virale *Freyja*.

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 și abundența acestora în timp, sunt reprezentate în figura 27.



**Figura 27. 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**

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 [176], 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.

Varianta JN.1.1.1, detectată în proba umană de control din august 2024, nu a fost identificată în probele de mediu din lunile următoare. Acest fapt indică fie încetarea circulației acestei variante în comunitate, fie o concentrație insuficientă pentru a fi detectată în fluxul de ape uzate, observație ce corelează într-o anumită măsură cu evoluția liniei JN.1.1.1 la nivel global [177].

Fiecare grafic individual din figura 27 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.

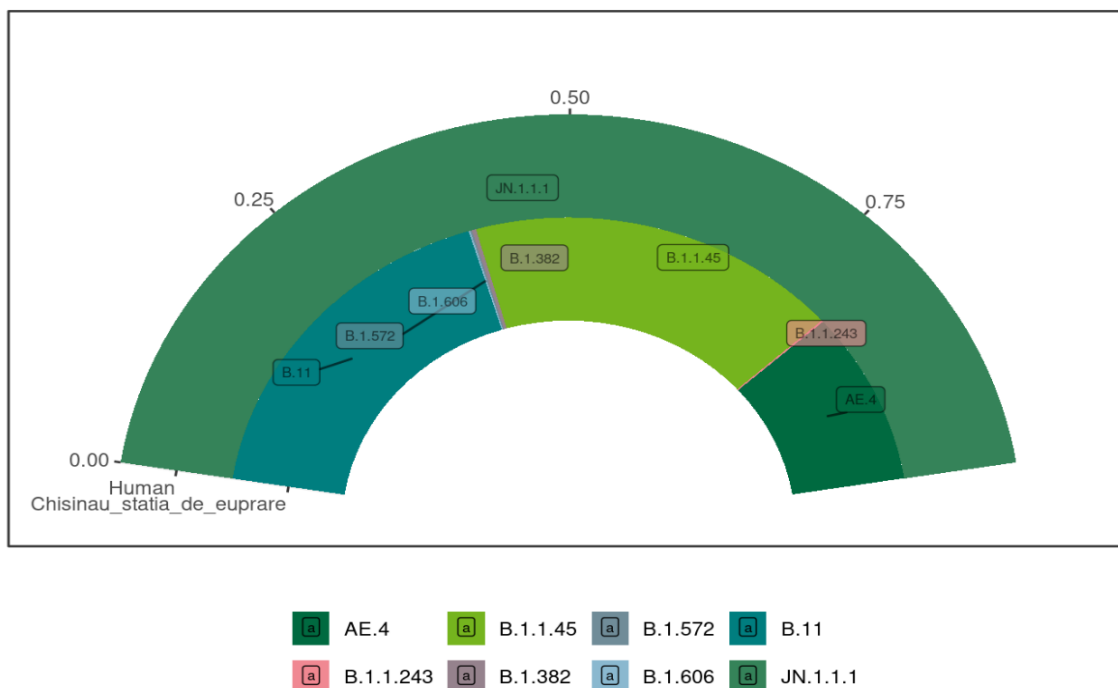
Ultima probă de ape uzate din prima rundă de secvențiere a fost colectată la data de 22.11.2024, iar ponderea variantelor identificate la această dată este specificată în tabelul 4.

**Tabelul 4. Frecvența liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 detectate în proba S23\_S23\_L001**

Denumirea probei	Locul colectării	Data colectării	Linia genetică	Abundența
S23_S23_L001	Stația de epurare din mun. Chișinău	2024-11-22	B.1.1.45	0.394
S23_S23_L001	Stația de epurare din mun. Chișinău	2024-11-22	B.11	0.394
S23_S23_L001	Stația de epurare din mun. Chișinău	2024-11-22	AE.4	0.2
S23_S23_L001	Stația de epurare din mun. Chișinău	2024-11-22	B.1.382	0.004
S23_S23_L001	Stația de epurare din mun. Chișinău	2024-11-22	B.1.1.243	0.002
S23_S23_L001	Stația de epurare din mun. Chișinău	2024-11-22	B.1.606	0.002
S23_S23_L001	Stația de epurare din mun. Chișinău	2024-11-22	B.1.572	0.002

Astfel, cea mai mare pondere la data specificată (aprox. 80 %) au avut-o variantele B.11 și B.1.1.45. Conform platformei *outbreak.info*, [176] 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 28 ilustrează cele mai recente linii genetice ale virusului SARS-CoV-2 identificate în apele uzate concordante cu cele detectate în probele umane, ceea ce confirmă relevanța supravegherii bazate pe apele uzate pentru evaluarea dinamicii circulației virale în comunitate.



**Figura 28. Cele mai recente linii genetice ale virusului SARS-CoV-2 identificate în apele uzate în comparație cu proba umană**

Instrumentul Freyja detectează tot cocktailul de linii genetice în fiecare probă și abundența lor. Astfel, în prima proba (S1\_S1\_L001) de ape uzate analizată au fost identificate liniile genetice B.1.177.66 și B.1.1.363 cu o abundență de 0,75 și 0,125, respectiv. În proba S2\_S2\_L001 au fost detectate liniile genetice B.1.104, B.1.431, B.6, B.6.1, B.6.3, B.6.4, B.6.5, B.6.6 și B.6.8 cu abundența de 0,092, precum și linia B.1.420 cu abundența de 0,056 (tabelul 5). Astfel, toate probele au prezentat amestecuri de mai multe linii genetice cu o abundență diferită, în funcție de variantele circulante.

Studiile genomice ale acestor probe ar putea extinde aplicarea monitorizării apelor uzate nu doar pentru SARS-CoV-2, ci și aplicații metagenomice.

În contextul în care criza globală a bolilor infecțioase, a rezistenței antimicrobiene capătă proporții tot mai îngrijorătoare, apele uzate vor deveni o resursă strategică pentru autoritățile de sănătate publică, oferind date esențiale pentru elaborarea de politici preventive și intervenții țintite la nivel comunitar.

Astfel, supravegherea genomică a probelor de mediu poate servi nu doar ca un instrument de alertă timpurie în fața noilor valuri epidemice sau a emergenței variantelor virale de îngrijorare, ci și ca o abordare robustă de cercetare translațională în domenii conexe precum rezistența la antibiotice, epidemiologia moleculară și evaluarea riscurilor de mediu.

Republica Moldova trebuie să continue investițiile în dezvoltarea capacităților de secvențiere și de analiză genomică, întrucât aceste tehnologii nu reprezintă doar instrumente de

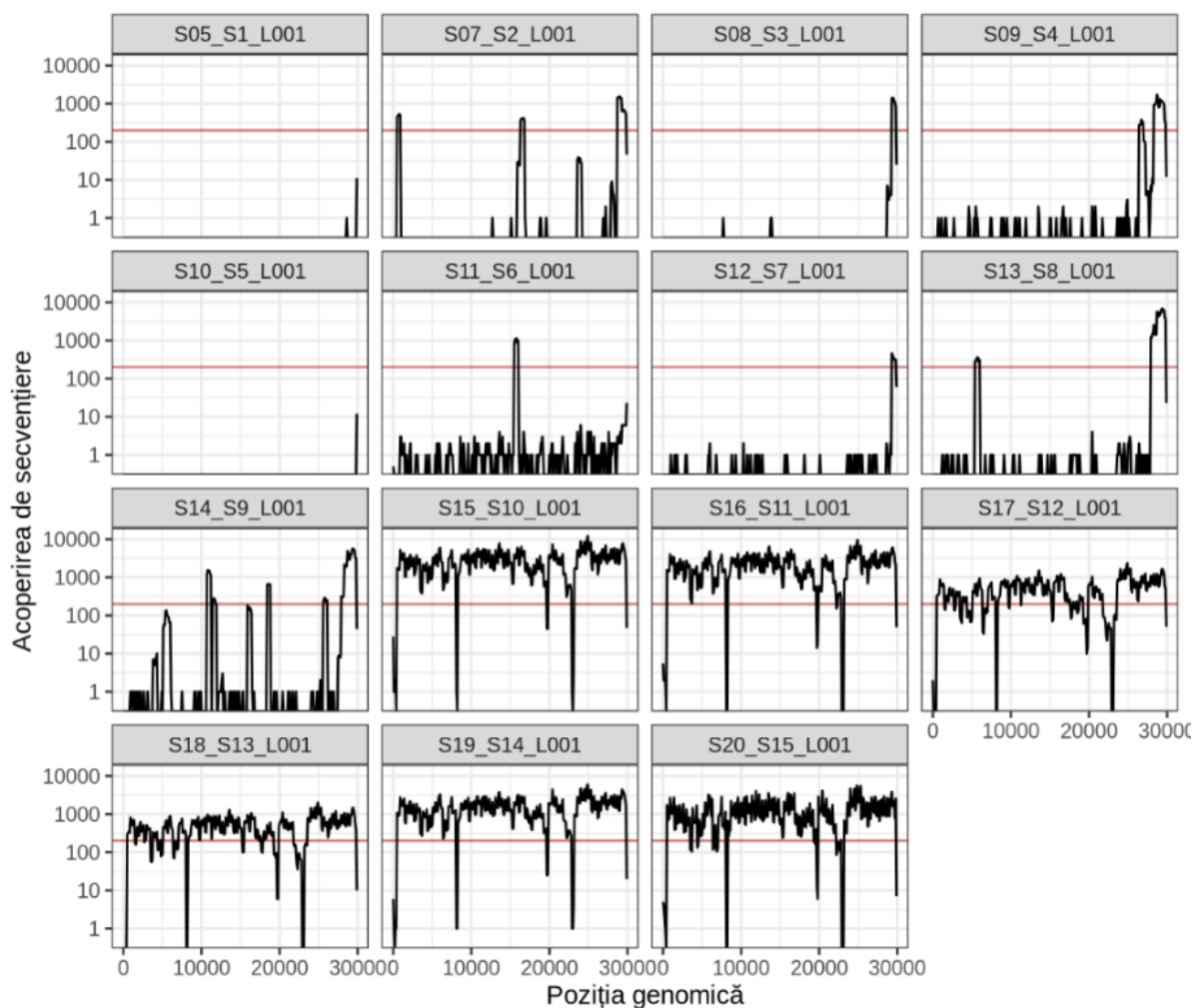
cercetare academică, devenind rapid componente indispensabile ale resurselor globale de sănătate publică, mai ales în fața provocărilor epidemiologice actuale și viitoare.

**Tabelul 5. Frecvența liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 detectate în funcție de perioada colectării probelor de ape uzate**

Locul colectării	Denumirea probei	Perioada colectării	Linie genetică
Proba umană	S24 S24 L001	2024-08-08	JN.1.1.1
Stația de epurare din mun. Chișinău	S1 S1 L001	2024-09-04	B.1.177.66, B.1.1.363
	S2 S2 L001	2024-09-06	B.1.104, B.1.431, B.6, B.6.1, B.6.3, B.6.4, B.6.5, B.6.6, B.6.8, B.1.420
	S3 S3 L001	2024-09-09	B.1.177.66
	S4 S4 L001	2024-09-13	A.12, B.1.1.374
	S5 S5 L001	2024-09-15	B.6.1, B.6.3, B.6.5, B.6.6, B.1.1.243
	S6 S6 L001	2024-09-20	B.1.177.66, B.6.1, B.6.3, B.6.4, B.6.5, B.6.6, B.1.1.243
	S7 S7 L001	2024-09-23	B.1.411, B.1.1.374, B.1.177.66, B.10
	S8 S8 L001	2024-09-27	B.11, B.1.1.363, AZ.4, AZ.5, B.1.292
	S9 S9 L001	2024-09-30	B.1.177.66
	S10 S10 L001	2024-10-04	B.1.177.66
	S11 S11 L001	2024-10-07	B.1.1.305, XT
	S12 S12 L001	2024-10-11	B.1.177.66
	S13 S13 L001	2024-10-14	B.1.177.25
	S14 S14 L001	2024-10-18	B.6.1, B.6.3, B.6.4, B.6.5, B.6.6, B.6.8
	S15 S15 L001	2024-10-21	B.1.177.66, AE.4, B.1.1.243
	S16 S16 L001	2024-10-25	B.1.177.66, B.1.579, B.1.1.357, B.1.539, B.1.1.243
	S17 S17 L001	2024-10-28	B.1.160.32
	S18 S18 L001	2024-11-01	B.1.1.243, B.1.177.66
	S19 S19 L001	2024-11-04	B.1.1.243
	S20 S20 L001	2024-11-08	B.1.177.66, B.1.1.243
S21 S21 L001	2024-11-15	B.1.177.66, B.1.579, B.1.289	
S22 S22 L001	2024-11-18	B.1.1.243, B.1.177.66	
S23 S23 L001	2024-11-22	B.1.1.45, B.11, AE.4	

Datele genomice ale probelor secvențiate în anul 2025, dintre care nouă probe fiind 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 (acoperire mai mică de 25 %), ceea ce a complicat procesul de analiză bioinformatică. Cu toate acestea, a fost posibilă identificarea subliniilor circulante și cuantificarea variantelor SARS-CoV-2 (figura 29).

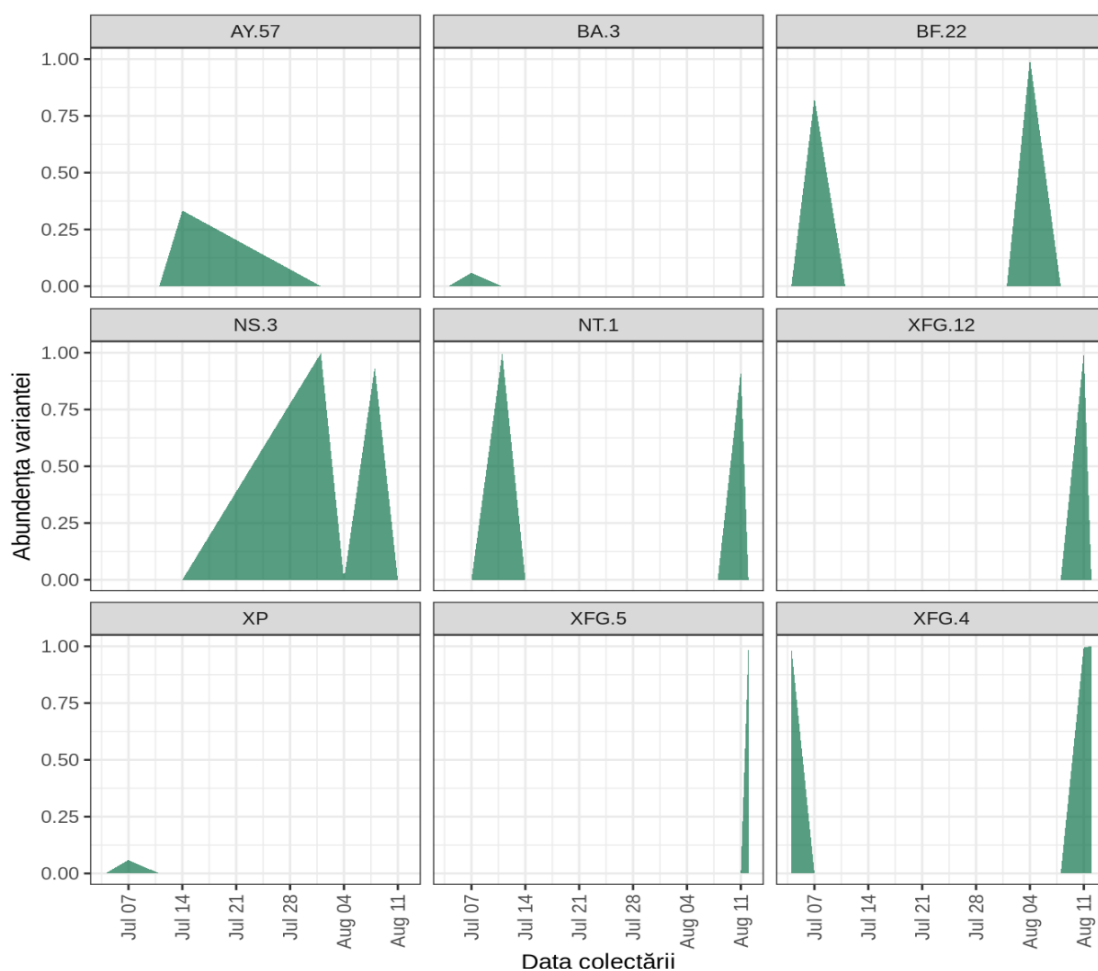
Conform datelor obținute, creșterea concentrației ARN-ului SARS-CoV-2 în apele uzate corelează cu creșterea numărului de cazuri de infectare în mun. Chișinău, ceea ce a fost posibilă secvențierea probelor prelevate în perioada caldă a anului, când numărul de cazuri de COVID-19 a început să crească pe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



**Figura 29. Acoperirea de secvențiere a probelor de ape uzate analizate și secvențiate în anul 2025**

Procesul de supraveghere genomică a virusului SARS-CoV-2 izolat din apele uzate este dificil din punct de vedere tehnic, deoarece încărcăturile virale sunt scăzute, ARN-ul este foarte fragmentat și inhibitorii PCR prezenți în probe duc la o acoperire slabă a secvențierii. Cu toate acestea, analiza bioinformatică a secvențelor obținute a relevat că supravegherea genomică a apelor uzate și a probelor clinice a reflectat modificările abundenței liniilor virale SARS-CoV-2. Pe baza probelor de ape uzate secvențiate a fost identificată o nouă sublinie a variantei Omicron (Varianta XFG „Stratus”), cu confirmarea și detectarea aceleiași variante în probele umane.

Conform datelor din figura 30, 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.



**Figura 30. 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**

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.

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

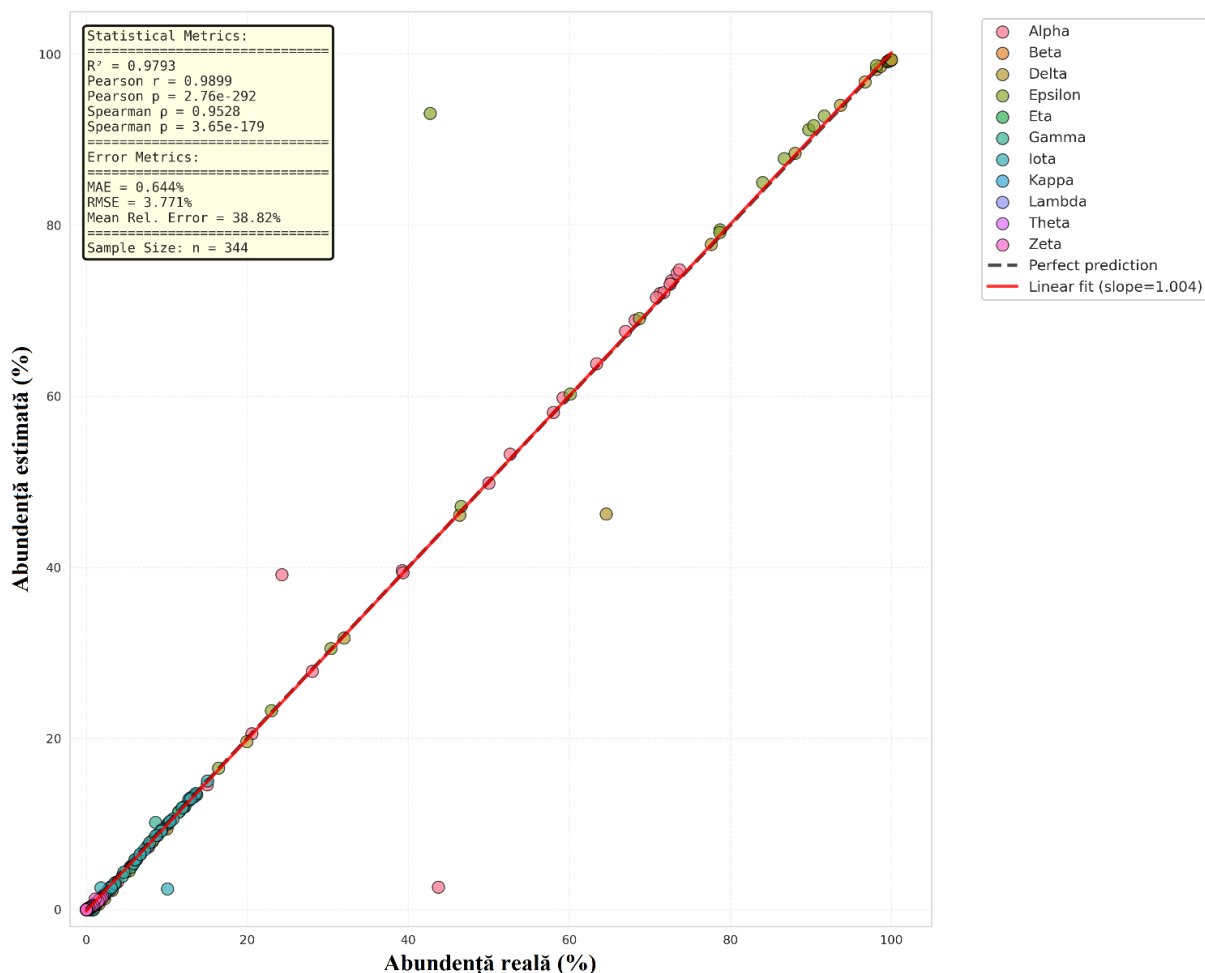
În apele uzate virusul SARS-CoV-2 este foarte dizolvat și deteriorat sub acțiunea diferitor agenți chimici, înregistrând, drept urmare, concentrații virale foarte joase. În acest context,

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, aliniat 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 %.

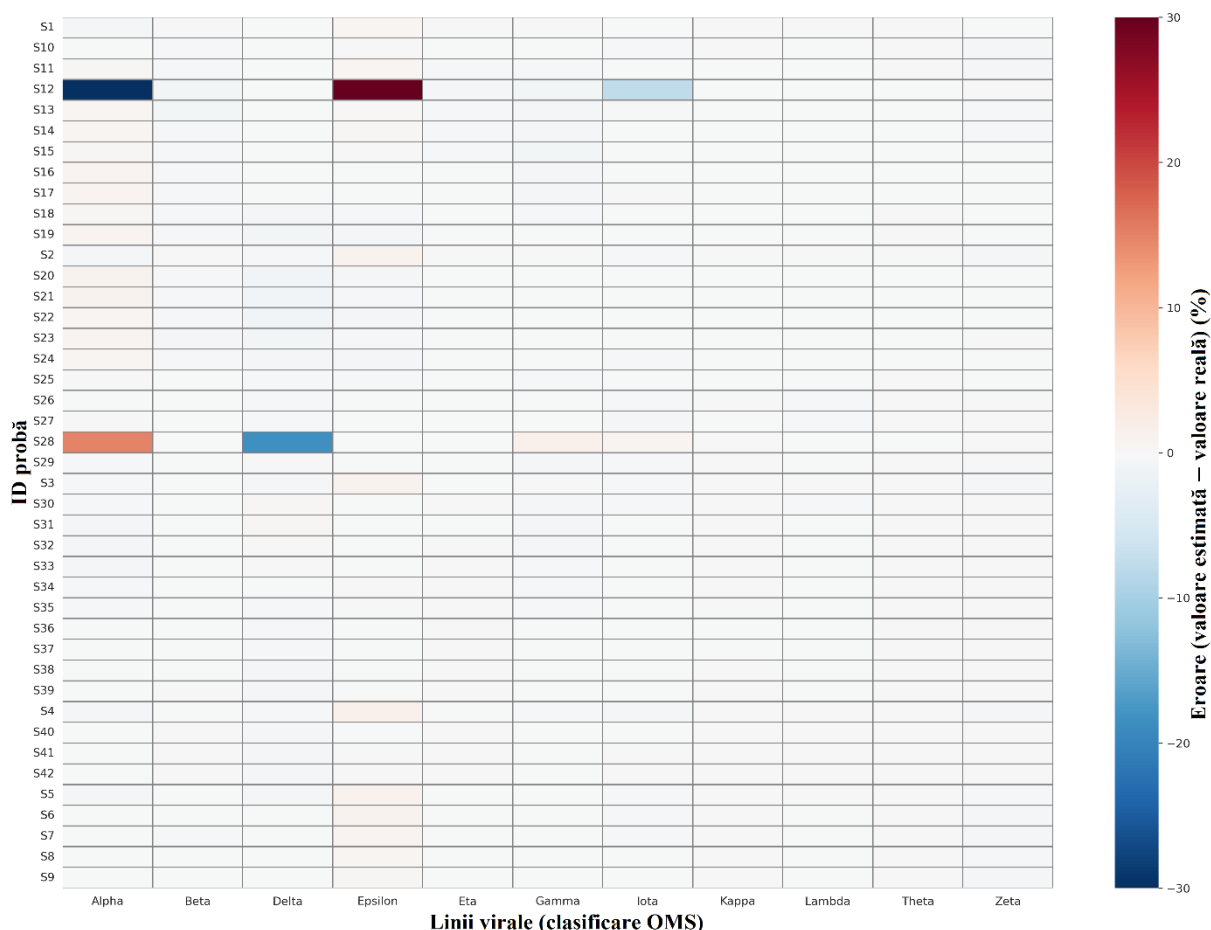
Analiza comparativă a ambelor instrumente a demonstrat corelații generale puternice între abundențele prezise și cele reale, dar cu profiluri de precizie semnificativ diferite. Instrumentul Freyja a înregistrat performanțe excepționale cu indicele statistic  $R^2$  de 0,9793, explicând 97,9 % din variația datelor reale, 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 31).



**Figura 31. Performanța instrumentului Freyja. Semnificația statistică a abundențelor prezise și reale în funcție de varianta genetică a SARS-CoV-2**

Instrumentul Freyja pentru fiecare variantă de mutație a virusului SARS-CoV-2 la fel a arătat că estimările abundenței relative a variantelor Alpha ( $R^2 = 0,945$ ), Delta ( $R^2 = 0,996$ ), Epsilon ( $R^2 = 0,945$ ), Gamma ( $R^2 = 0,991$ ), Iota ( $R^2 = 0,937$ ), Zeta ( $R^2 = 0,737$ ) sunt foarte apropiate de abundențele relative reale. Corelația Pearson în aceste variante a atins  $r = 0,973$  pentru Alpha, Delta ( $r = 0,998$ ), Epsilon ( $r = 0,976$ ), Gamma ( $r = 0,997$ ), Iota ( $r = 0,971$ ), Zeta ( $r = 0,974$ ) cu o valoare  $p$  mai mică de 3,34 pentru Alpha, Delta ( $p = 8,54$ ), Epsilon ( $p = 4,38$ ), Gamma ( $p = 1,93$ ), Iota ( $p = 3,46$ ), Zeta ( $p = 1,36$ ) și a evidențiat o relație liniară extrem de puternică. Rezultatele obținute demonstrează performanța înaltă a instrumentului Freyja în detectarea tulpinilor de SARS-CoV-2 din apele uzate și utilitatea sa în monitorizarea acestora.

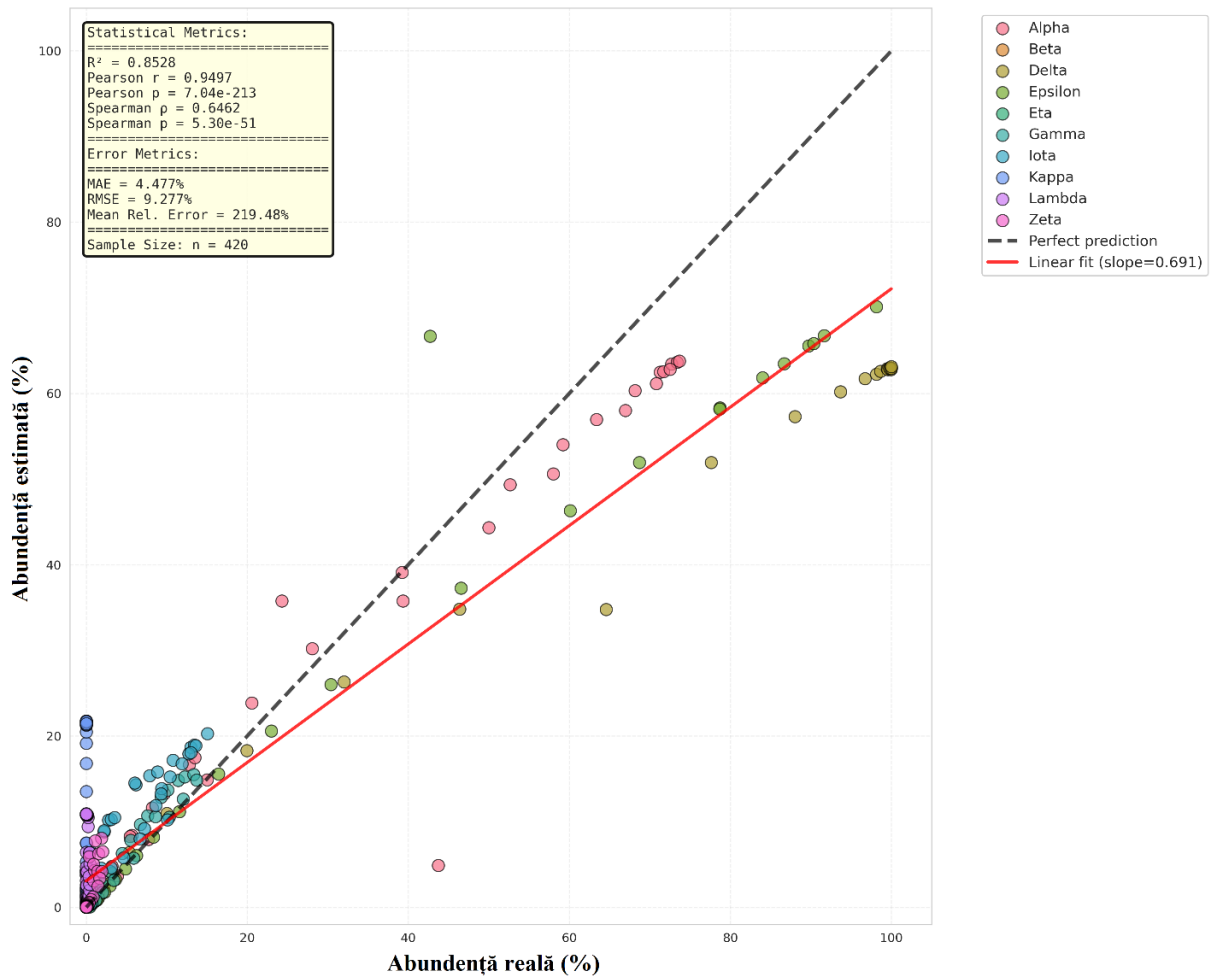
Pentru a demonstra calitatea rezultatelor obținute cu instrumentul Freyja în monitorizarea apelor uzate, a fost analizată harta termică a erorilor de predicție a acestui instrument (figura 32), pe care casețele albe indică că eroarea de predicție a instrumentului nu este semnificativă ( $<1\%$ ) față de rezultatul așteptat.



**Figura 32. Harta termică (heatmap) a erorilor de predicție a instrumentului Freyja**

Așadar, instrumentul Freyja are cea mai mare precizie în identificarea abundenței relative a liniilor genetice ale virusului SARS-CoV-2.

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 33).

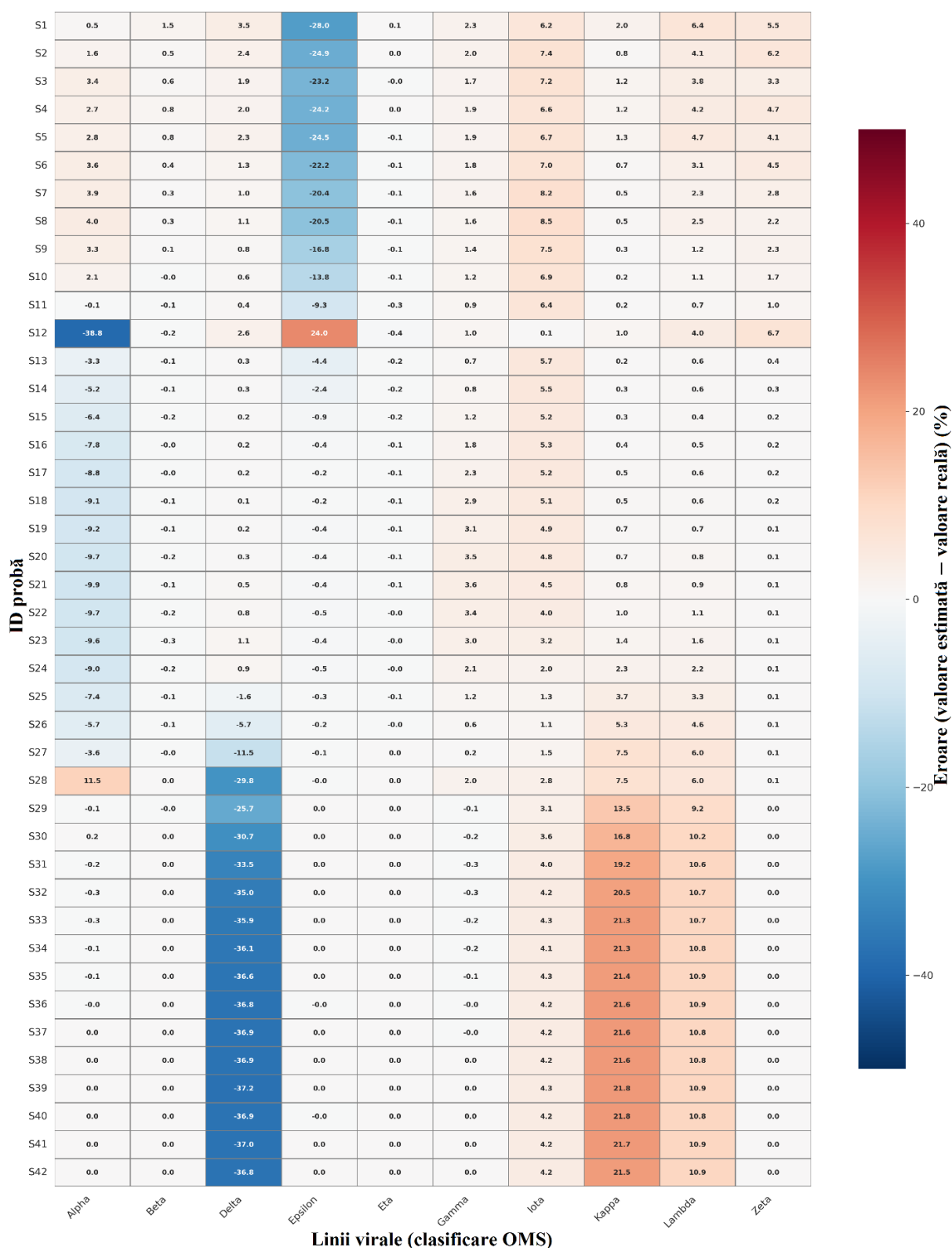


**Figura 33. Performanța instrumentului Kallisto în determinarea semnificației statistice a abundențelor prezise și reale în funcție de varianta genetică a SARS-CoV-2**

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 ( $R^2=-10$ ). 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 diferă semnificativ de cea a instrumentului Freyja. 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 34).



**Figura 34. 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  $\rho$  egal cu 0,953, indicând o conservare excelentă a ordonării rangului chiar și pentru relații neliniare. Instrumentul Kallisto a obținut un  $\rho$  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.

Datele complete referitoare la evaluarea comparativă a performanței instrumentelor Freyja și Kallisto, inclusiv rezultatele privind acuratețea predicțiilor și capacitatea de deconvoluție a variantelor SARS-CoV-2, sunt redată în figura 1 și 2, Anexa 4.

#### **4.3. Concluzii la capitolul 4**

1. Monitorizarea genomică a evoluției virusului SARS-CoV-2 prin investigarea apelor uzate s-a dovedit a fi o strategie eficientă pentru urmărirea dinamicii și prevalenței variantelor acestuia în cadrul unei comunități.
2. Metodele de secvențiere a virusului SARS-CoV-2 din apele uzate și instrumentele bioinformatică utilizate (Freyja și Minimap) au permis identificarea liniilor genetice predominante în perioada investigată.
3. În anul 2024 au fost identificate 32 de linii genetice ale virusului SARS-CoV-2 corespunzătoare sistemului de clasificare Pango Lineages, utilizat la nivel global pentru monitorizarea evoluției virusului, cu predominarea subliniilor B.1.177.66, B.1.1.243, B.1.160.32 și B.1.1.305.
4. În perioada iunie-august 2025, liniile predominante ale virusului SARS-CoV-2 în Republica Moldova 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 OMS pentru perioada respectivă.
5. Instrumentul Freyja asigură identificarea abundenței variantelor genetice ale virusului SARS-CoV-2 cu cea mai apropiată de raporturile așteptate.

## DISCUȚII

La 5 mai 2023, OMS a declarat sfârșitul pandemiei de COVID-19, dar aceasta nu înseamnă ca virusul a dispărut. Subvariantele SARS-CoV-2, care au un potențial ridicat de a afecta sănătatea umană, circulă și în perioada postpandemică. Dificultatea prognozării mutațiilor genetice ale virusului SARS-CoV-2 este un obstacol semnificativ în supravegherea sănătății publice [178,179].

Astfel, intervențiile de sănătate publică continuă să se confrunte probleme majore din cauza apariției noilor sublinii ale variantei Omicron, care îngreunează diagnosticul, tratamentul și reduc eficacitatea vaccinurilor.

Pentru lichidarea obstacolelor în supravegherea sănătății publice în legătură cu virusul SARS-CoV-2 este necesară monitorizarea permanentă a circulației acestuia și investigarea continuă a profilului genetic al variantelor sale.

Carabelli și colab., prin implementarea extinsă a epidemiologiei genomice virale pe perioada pandemică și postpandemică, au urmărit evoluția SARS-CoV-2 aproape că în timp real [174].

Prezentul studiu s-a axat pe monitorizarea circulației virusului SARS-CoV-2 pe teritoriul republicii prin secvențierea întregului genom și analiza filogenetică a rezultatelor obținute. Cu acest scop au fost izolate 733 de secvențe ale virusului SARS-CoV-2 din probe clinice umane și 31 de secvențe din ape uzate. În urma analizei acestor secvențe au fost stabilite tulpinile virale circulante pe teritoriul Republicii Moldova în perioada studiată, mutațiile genetice și modificările fenotipice ale acestora.

Cel mai bine au fost studiate variantele Delta și Omicron și subliniile lor, în legătură cu ratele crescute de mortalitate și de morbiditate asociate cu valurile pandemice provocate de aceste variante.

Tulpina Delta, raportată pentru prima dată în India la sfârșitul anului 2020, pe lângă multe caracteristici biologice ale virusului original, posedă patru caracteristici majore care o diferențiază de acesta: încărcătură virală sporită, concentrație mare a virusului expirat, ceea ce crește semnificativ probabilitatea expunerii persoanelor la virus, simptome discrete [175].

Aceste caracteristici au făcut ca tulpina Delta să fie dificil de prevenit, multe măsuri de protecție fiind ineficiente. Numărul mare de rezultate experimentale au arătat că metodele utilizate pentru prevenirea și tratamentul infecției cu această tulpină (B.1.617.2), precum plasma convalescentă, anumiți anticorpi monoclonali și unele vaccinuri parțiale, nu au funcționat [175,180].

Conform datelor publicate de Focosi D. și colab., Yajima și colab, varianta Omicron a fost identificată pentru prima dată în Africa de Sud la sfârșitul anului 2021, iar pe teritoriul

republicii a fost atestată la începutul anului 2022. Omicron s-a răspândit rapid la nivel mondial, eliminând practic variantele anterioare, cum ar fi Delta, din populațiile umane [176,177].

Yamasoba D și colab. au stabilit că în cazul variantei Omicron primele au apărut următoarele trei linii: BA.1, BA.2 și BA.3. Prima a devenit dominantă la nivel global lina BA.1, înlocuită în scurt timp de BA.2. Atât BA.2, cât și subliniile descendente, inclusiv BA.4 și BA.5, s-au diversificat rapid, generând numeroase variante. De la începutul anului 2022 până în prezent aproape toate variantele circulante ale virusului SARS-CoV-2 sunt descendentele liniei BA.2 [178].

Rezultatele studiului nostru confirmă faptul că virusul SARS-CoV-2 a suferit mai multe modificări genetice și continuă să muteze, și să genereze variante noi. Seria de variante mutante generate de virus în timpul pandemiei și în perioada postpandemică au influențat direct nivelul morbidității, provocând mai multe valuri epidemice. Majoritatea mutațiilor au vizat gena S, ceea ce a afectat semnificativ patogeneza virusului, deoarece proteina Spike, codificată de această genă, este responsabilă pentru multe procese critice în ciclul de replicare al virusului.

În cadrul studiului au fost descoperite patru secvențe recombinante 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.

Cercetările la nivel internațional au constatat că circulația mai multor variante genetice ale virusului SARS-CoV-2 au generat variante recombinante. Yi și colab. au demonstrat că recombinarea între linii evolutiv îndepărtate sau linii strâns înrudite poate determina evoluția SARS-CoV-2 și are potențialul de a duce la o nouă tulpină predominantă, dovadă că recombinarea joacă un rol important în evoluția SARS-CoV-2 [179].

Conform rezultatelor prezentului studiu, în secvențele analizate au fost observate diferite clase de mutații, precum substituții, deleții și inserții de nucleotide și de aminoacizi, deplasarea cadrului de citire a genei, mutații nonsinonime și sinonime, și private. În majoritatea cazurilor, modificările genomice ale virusului SARS-CoV-2 au fost determinate de substituții, în medie  $72,6 \pm 21,1$  de substituții per genom, urmate de deleții, în medie  $48,6 \pm 20,1$  per genom și de inserții cu DCC care au fost detectate foarte rar, în medie  $4,5 \pm 8,3$  și, respectiv,  $1,7 \pm 2,2$  per genom. Cele 13 672 de mutații sinonime și 54 080 nonsinonime identificate în setul de date înregistrate exercită o presiune selectivă puternică care favorizează modificările proteice vizibile la nivelul întregului genom, dar cu diferențe semnificative de la o genă la alta.

Datele obținute de Banu și colab. în 2025 confirmă că în variantele Omicron și Delta, detectate și secvențiate în perioada martie 2021-februarie 2022 în Bangladesh, substituțiile au fost mult mai numeroase decât delețiile și inserțiile. Modelele de modificare a nucleotidelor de înaltă frecvență au fost similare (pentru  $C > T$  și  $A > G$ ) în ambele variante, dar diferite în unele

(de exemplu, G > T, G > A) [180]. Preferințele pentru aminoacizi specifici în substituții și deleții variază în diferite proteine ale acestor variante, iar studiul impactului lor funcțional ar putea dezvălui motivul mutației și modificările fenotipice [180].

Mutațiile virusului SARS-CoV-2 identificate în secvențele analizate în prezentul studiu au fost similare cu constatările numeroaselor cercetări naționale și internaționale precum cele efectuate de Banu și colab. în 2025, Mustafa și colab. în 2024, Aguilar-Martinez și colab. în 2024. Rezultatele acestor studii sugerează că virusul SARS-CoV-2 a suferit un șir de mutații genetice care au influențat direct apariția de schimbări fenotipice [180,181,182].

În perioada postpandemică, în timpul scăderii numărului de testări ale probelor umane la prezența virusului SARS-CoV-2, a fost implementată metoda monitorizării genetice a virusului SARS-CoV-2 prin apele uzate colectate de la Stația de epurare din min. Chișinău.

Spre deosebire de secvențierile genomului virusului SARS-CoV-2 din probele clinice, utilizate pentru obținerea secvențelor calitative necesare pentru dezvoltarea vaccinurilor, metodelor de tratament și de diagnostic, secvențierea genomului viral din probele din mediu și aplicarea diferitor instrumente de calcul din epidemiologia genomică oferă informații despre gama de variații genetice circulante ale virusului SARS-CoV-2, despre originea, diseminarea și varietatea acestor genomi, facilitând astfel predicția valurilor epidemice.

Olanda, Australia, Japonia, India, Italia, Spania, Suedia, Bangladesh și Statele Unite au fost printre primele țări care au raportat detectarea ARN-ului virusului SARS-CoV-2 în apele uzate municipale. Această descoperire ar putea fi o sursă de informații, posibil ascunse, despre frecvența infecțiilor cu SARS-CoV-2, precum și o modalitate eficientă din punct de vedere al costurilor de screening aleatoriu al multor pacienți [183,184,185,186].

Pandemia de COVID-19 a evidențiat importanța epidemiologiei bazate pe ape uzate pentru urmărirea și înțelegerea bolilor infecțioase la nivel mondial. Din 2020, numeroase echipe universitare din Canada au organizat și au derulat cu succes diverse programe de monitorizare a markerilor genetici ai SARS-CoV-2 în apele uzate, furnizând informații suplimentare importante pentru testarea generală pentru COVID-19 [187,188,189].

Procesul de secvențiere a genomului SARS-CoV-2 din probele de ape uzate realizat în cadrul studiului a evidențiat potențialul supravegherii genomice a acestora pentru monitorizarea circulației virusului la nivel populațional. Analiza a permis identificarea liniilor virale și urmărirea variantelor circulante, inclusiv în rândul persoanelor asimptomatice, demonstrând utilitatea supravegherii apelor uzate ca instrument eficient pentru detectarea timpurie a circulației virale și susținerea măsurilor de control al bolilor infecțioase.

## 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**

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

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. Chakraborty C, Chatterjee S, Bhattacharya M, Chopra H, Bhattacharya P, Islam MA, et al. The D614G mutation helps to increase the transmissibility and reduce the virulence of SARS-CoV-2 variants through natural selection. *Int J Surg.* 2023; 109(2):171–174. doi:10.1097/JS9.000000000000171.
12. Ramesh S, Govindarajulu M, Parise RS, Neel L, Shankar T, Patel S, et al. Emerging SARS-CoV-2 variants: a review of its mutations, its implications and vaccine efficacy. *Vaccines.* 2021; 9(10):1195. doi:10.3390/vaccines9101195.
13. Mengist HM, Kombe AJK, Mekonnen D, Abebaw A, Getachew M, Jin T. Mutations of SARS-CoV-2 spike protein: implications on immune evasion and vaccine-induced immunity. *Semin Immunol.* 2021. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/pmc/articles/PMC8604694/>; doi:10.1016/j.smim.2021.101533.
14. Manirambona E. Health policy and systems research in Sub-Saharan Africa during the COVID-19 pandemic. *Ann Public Health.* 2022. doi:10.55085/aph.2022.609.
15. 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>.
16. 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.

17. 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.
18. 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.
19. Holmes EC. COVID-19: lessons for zoonotic disease. *Science.* 2022; 375(6585):1114–1115. doi:10.1126/science.abn2222.
20. 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.
21. 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.
22. 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](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/206061).
23. 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](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/168334).
24. 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.
25. 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
26. 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.
27. 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.
28. Hamouda M, Mustafa F, Maraqa M, Rizvi T, Hassan AA. Wastewater surveillance for SARS-CoV-2: lessons learnt from recent studies to define future applications. *Sci Total Environ.* 2021; 759:143493. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143493.
29. D'Aoust PM, Graber TE, Mercier E, Montpetit D, Alexandrov I, Neault N, et al. Catching a resurgence: increase in SARS-CoV-2 viral RNA identified in wastewater 48 h before COVID-19 clinical tests and 96 h before hospitalizations. *Sci Total Environ.* 2021; 770:145319. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145319.
30. Krogsgaard LW, Benedetti G, Gudde A, Richter SR, Rasmussen LD, Midgley SE, et al. Results from the SARS-CoV-2 wastewater-based surveillance system in Denmark, July 2021 to June 2022. *Water Res.* 2024; 252:121223. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121223>.
31. Yasmin S, Ansari MY. A detailed examination of coronavirus disease 2019 (COVID-19): covering past and future perspectives. *Microb Pathog.* 2025; 203:107398. doi:10.1016/j.micpath.2025.107398.
32. Helmy YA, Fawzy M, Elaswad A, Sobieh A, Kenney SP, Shehata AA. The COVID-19 pandemic: a comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology,

- diagnosis, treatment, and control. *J Clin Med.* 2020 Apr 24; 9(4):1225. doi:10.3390/jcm9041225.
33. Saberiyan M, Karimi E, Khademi Z, Movahhed P, Safi A, Mehri-Ghahfarrokhi A. SARS-CoV-2: phenotype, genotype, and characterization of different variants. *Cell Mol Biol Lett.* 2022; 27(1):50. doi: 10.1186/s11658-022-00352-6.
  34. Ashour HM, Elkhateb WF, Rahman MM, Elshabrawy HA. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks. *Pathogens.* 2020;9(3):186. doi:10.3390/pathogens9030186.
  35. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 2012;367(19):1814-1820. doi:10.1056/NEJMoa1211721.
  36. Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(12):836-848. doi:10.1038/nrmicro3143.
  37. Colac S, Ulinici M, Burduniuc O. Genetic diversity analysis of the SARS-CoV-2 virus: a literature review. *One Health Risk Manag.* 2025; 6(1):16-28. doi:10.38045/ohrm.2025.1.02.
  38. Zhou Z, Zhu Y, Chu M. Role of COVID-19 vaccines in SARS-CoV-2 variants. *Front Immunol.* 2022; 13:898192. doi:10.3389/fimmu.2022.898192.
  39. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): NCBI; Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
  40. 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.
  41. 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.
  42. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020; 42(1):3–11. PMID: 32342926.
  43. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science.* 2020; 369(6501):330–333. doi:10.1126/science.abb9983.
  44. Tang T, Bidon M, Jaimes JA, Whittaker GR, Daniel S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res.* 2020; 178:104792. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104792.
  45. Cao Y, Yang R, Lee I, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. *Protein Sci.* 2021;30(6):1114–1130. doi:10.1002/pro.4075.
  46. Wu C, Qavi AJ, Hachim A, Kavian N, Cole AR, Moyle AB, et al. Characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein reveals multiple functional consequences of the C-terminal domain. *iScience.* 2021; 24(6):102681. doi:10.1016/j.isci.2021.102681.
  47. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020; 395(10224):565–574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
  48. Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9(1):221–236. doi:10.1080/22221751.2020.1719902.
  49. Wang R, Zhang X, Irwin DM, Shen Y. Emergence of SARS-like coronavirus poses new challenge in China. *J Infect.* 2020;80(3):350–371. doi:10.1016/j.jinf.2020.01.017.

50. Existing drugs targeting SARS-CoV-2 and coronaviruses. Tocris Bioscience; 2020. Disponibil la: <https://www.tocris.com/resources/tocris-blog/existing-drugs-targeting-sars-cov-2-and-coronaviruses>
51. Ghanbari R, Teimoori A, Sadeghi A, Mohamadkhani A, Rezasoltani S, Asadi E, et al. Existing antiviral options against SARS-CoV-2 replication in COVID-19 patients. *Future Microbiol.* 2020; 15:1747–1758. doi:10.2217/fmb-2020-0120.
52. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* 2020; 46(4):586–590. doi:10.1007/s00134-020-05985-9.
53. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020; 181(2):271–280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
54. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020; 24:91–98. doi:10.1016/j.jare.2020.03.005.
55. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Evaluating the effects of SARS-CoV-2 spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity. *Cell.* 2021; 184(1):64–75.e11. doi:10.1016/j.cell.2020.11.020
56. Markov PV, Ghafari M, Beer M, Lythgoe KA, Simmonds P, Stilianakis NI, et al. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21(6):361–379. doi:10.1038/s41579-023-00878-2.
57. MacLean OA, Orton RJ, Singer JB, Robertson DL. No evidence for distinct types in the evolution of SARS-CoV-2. *Virus Evol.* 2020; 6(1):veaa034. doi:10.1093/ve/veaa034.
58. Rogozin IB, Charyyeva A, Sidorenko IA, Babenko VN, Yurchenko V. Frequent recombination events in *Leishmania donovani*: mining population data. *Pathogens.* 2020; 9(7):572. doi:10.3390/pathogens9070572.
59. Rogozin IB, Saura A, Poliakov E, Bykova A, Roche-Lima A, Pavlov YI, et al. Properties and mechanisms of deletions, insertions, and substitutions in the evolutionary history of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(7):3696. doi:10.3390/ijms25073696.
60. 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.
61. **Colac S.** Analiza secvențierii genomului SARS-CoV-2: evoluția și impactul noilor linii Omicron în Republica Moldova. 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](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/244582).
62. Panzera Y, Calleros L, Goni N, Marandino A, Techera C, Grecco S, et al. Consecutive deletions in a unique Uruguayan SARS-CoV-2 lineage evidence the genetic variability potential of accessory genes. *PLoS One.* 2022; 17:e0263563. doi:10.1371/journal.pone.0263563.
63. Amicone M, Borges V, Alves MJ, Isidro J, Zé-Zé L, Duarte S, et al. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evol Med Public Health.* 2022; 10(1):142–155. doi:10.1093/emph/eoac010.
64. Meng B, Kemp SA, Papa G, Datir R, Ferreira IATM, Marelli S, et al. Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B.1.1.7. *Cell Rep.* 2021; 35(13):109292. doi:10.1016/j.celrep.2021.109292.

65. Chernyaeva EN, Ayginin AA, Kosenkov AV, Romanova SV, Tsypkina AV, Luparev AR, et al. SARS-CoV-2 recombination and coinfection events identified in clinical samples in Russia. *Viruses*. 2023; 15(8):1660. doi:10.3390/v15081660.
66. Liu X, Guo L, Xu T, Lu X, Ma M, Sheng W, et al. A comprehensive evolutionary and epidemiological characterization of insertion and deletion mutations in SARS-CoV-2 genomes. *Virus Evol*. 2021; 7(2):veab104. doi:10.1093/ve/veab104.
67. Plante JA, Liu Y, Liu J, Xia H, Johnson BA, Lokugamage KG, et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*. 2021; 592(7852):116–121. doi:10.1038/s41586-020-2895-3.
68. Rambaut A, Holmes EC, O’Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol*. 2020; 5(11):1403–1407. doi:10.1038/s41564-020-0770-5.
69. Zhang J, Cai Y, Xiao T, Lu J, Peng H, Sterling SM, et al. Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution. *Science*. 2021; 372(6541):525–530. doi:10.1126/science.abf2303.
70. Mingaleeva RN, et al. Biology of the SARS-CoV-2 coronavirus. *Biochemistry (Mosc)*. 2022; 87(12):1662–1678. doi:10.1134/S000629792212012X.
71. Dolskiy AA, Gudymo AS, Taranov OS, Grishchenko IV, Shitik EM, Prokopov DY, et al. The tissue distribution of SARS-CoV-2 in transgenic mice with inducible ubiquitous expression of hACE2. *Front Mol Biosci*. 2022; 8:1339. doi:10.3389/fmolb.2021.789560.
72. Papanikolaou V, Chrysovergis A, Ragos V, Tsiambas E, Katsinis S, Manoli A, et al. From Delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants. *Gene*. 2022; 814:146134. doi:10.1016/j.gene.2021.146134.
73. Meng B, Kemp SA, Papa G, Datir R, Ferreira IATM, Marelli S, et al. Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B.1.1.7. *Cell Rep*. 2021; 35(13):109292. doi:10.1016/j.celrep.2021.109292.
74. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, Staropoli I, Guivel-Benhassine F, Rajah MM, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. 2021; 596(7871):276–280. doi:10.1038/s41586-021-03777-9.
75. McCallum M, De Marco A, Lempp FA, Tortorici MA, Pinto D, Walls AC, et al. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell*. 2021; 184(9):2332–2347.e16. doi:10.1016/j.cell.2021.03.028.
76. Rahman MS, Islam MR, Alam ASMRU, Islam I, Hoque MN, Akter S, et al. Evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its consequences. *J Med Virol*. 2021; 93(4):2177–2195. doi:10.1002/jmv.26626.
77. Sun YS, Sun H, Zhu HP, Li GL, Xu F, Lu HJ, et al. Comparative transcriptomic analyses of human lung epithelial cells infected with wild-type SARS-CoV-2 and its variant with a 12-bp deletion in the E gene. *Front Microbiol*. 2022;13:1079764. doi:10.3389/fmicb.2022.1079764.
78. Benedetti F, Snyder GA, Giovanetti M, Angeletti S, Gallo RC, Ciccozzi M, Zella D. Emerging of a SARS-CoV-2 viral strain with a deletion in nsp1. *J Transl Med*. 2020; 18(1):329. doi:10.1186/s12967-020-02550-3.
79. Wang R, Chen J, Gao K, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. Decoding SARS-CoV-2 transmission, evolution and ramification on COVID-19 diagnosis, vaccine, and medicine. *J Phys Chem Lett*. 2020; 11(23):10007–10015. doi:10.1021/acs.jpcllett.0c02850.
80. Venkatakrishnan AJ, Anand P, Lenehan PJ, Suratekar R, Raghunathan B, Niesen MJM, Soundararajan V. On the origins of Omicron’s unique spike gene insertion. *Vaccines*. 2022; 10(9):1509. doi:10.3390/vaccines10091509.

81. Padhi AK, Tripathi T. Can SARS-CoV-2 accumulate mutations in the S-protein to increase pathogenicity? *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2020; 3(5):1023–1026. doi:10.1021/acspsci.0c00113.
82. World Health Organization. Weekly epidemiological update on COVID-19. 2025. Disponibil la: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.
83. Flores-Vega VR, Monroy-Molina JV, Jiménez-Hernández LE, Torres AG, Santos-Preciado JI, Rosales-Reyes R. SARS-CoV-2: evolution and emergence of new viral variants. *Viruses.* 2022; 14(4):653. doi:10.3390/v14040653.
84. Giandhari J, Pillay S, Wilkinson E, Tegally H, Sinayskiy I, Schuld M, et al. Early transmission of SARS-CoV-2 in South Africa: an epidemiological and phylogenetic report. *Int J Infect Dis.* 2021;103:234–241. doi:10.1016/j.ijid.2020.11.188.
85. PANGO Lineages. Latest epidemiological lineages of SARS-CoV-2. 2025. Disponibil la: <https://cov-lineages.org>.
86. GISAID. hCoV-19 variants dashboard. 2025. Disponibil la: <https://gisaid.org/hcov-19-variants-dashboard>.
87. Nextstrain. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2. 2025. Disponibil la: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m>.
88. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature.* 2021; 593(7858):266–269. doi:10.1038/s41586-021-03470-x.
89. ViralZone. SARS-CoV-2 circulating variants. 2024. Disponibil la: <https://viralzone.expasy.org/9556>.
90. Spokane Regional Health District. Coronavirus mutations and variants: what does it mean? 2021. Disponibil la: <https://srhd.org/news/2021/coronavirus-mutations-and-variants-what-does-it-mean>.
91. Hirahata T, Quraish RU, Quraish AU, Quraish SU. A review of SARS-CoV-2 virology, vaccines, variants and their impact on the COVID-19 pandemic. *Rev Res Med Microbiol.* 2025; 36(4):189–212. doi:10.1097/MRM.0000000000000393.
92. Alhamlan FS, Al-Qahtani AA. SARS-CoV-2 variants: genetic insights, epidemiological tracking, and implications for vaccine strategies. *Int J Mol Sci.* 2025; 26(3):1263. doi:10.3390/ijms26031263.
93. Manirambona E, Okesanya OJ, Olaleke NO, Oso TA, Lucero-Prisno DE. Evolution and implications of SARS-CoV-2 variants in the post-pandemic era. *Discov Public Health.* 2024; 21:1–12. doi:10.1186/s12982-024-00140-x.
94. Duong BV, Larpruenrudee P, Fang T, Hossain SI, Saha SC, Gu Y, et al. Is the SARS-CoV-2 Omicron variant more deadly and transmissible than Delta? *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(8):4586. doi:10.3390/ijerph19084586
95. Xue S, Han Y, Wu F, Wang Q. Mutations in the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain and their balance between ACE2 affinity and antibody evasion. *Protein Cell.* 2024; 15(6):403–418. doi:10.1093/procel/pwae007.
96. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, Madzivhandila M, Kgagudi P, Oosthuysen B, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med.* 2021; 27(4):622–625. doi:10.1038/s41591-021-01285-x.
97. Planas D, Bruel T, Grzelak L, Guivel-Benhassine F, Staropoli I, Porrot F, et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat Med.* 2021; 27(5):917–924. doi:10.1038/s41591-021-01318-5.
98. Banho CA, Sacchetto L, Campos GRF, Bittar C, Possebon FS, Ullmann LS, et al. Impact of SARS-CoV-2 Gamma lineage introduction and COVID-19 vaccination on the epidemiological landscape of a Brazilian city. *Commun Med.* 2022; 2:108. doi:10.1038/s43856-022-00108-5.

99. Khetran SR, Mustafa R. Mutations of SARS-CoV-2 structural proteins in the Alpha, Beta, Gamma, and Delta variants: bioinformatics analysis. *JMIR Bioinform Biotechnol.* 2023;4:e43906. doi:10.2196/43906.
100. Sabino EC, Buss LF, Carvalho MPS, Prete CA Jr, Crispim MAE, Fraiji NA, et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet.* 2021; 397(10273):452–455. doi:10.1016/S0140-6736(21)00183-5.
101. Andeweg SP, Vennema H, Veldhuijzen I, Smorenburg N, Schmitz D, Zwagemaker F, et al. Elevated risk of infection with SARS-CoV-2 Beta, Gamma, and Delta variants compared with Alpha variant in vaccinated individuals. *Sci Transl Med.* 2022; 14(647):eabn4338. doi:10.1126/scitranslmed.abn4338.
102. Dholariya S, Parchwani DN, Singh R, Sonagra A, Motiani A, Patel D. Notable and emerging variants of SARS-CoV-2 virus: a quick glance. *Indian J Clin Biochem.* 2021; 36(4):451–458. doi:10.1007/s12291-021-00985-6.
103. Maggi F, Novazzi F, Genoni A, Baj A, Spezia PG, Focosi D, et al. Imported SARS-CoV-2 variant P.1 in traveler returning from Brazil to Italy. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27(4):1249–1251. doi:10.3201/eid2704.210183.
104. Bian L, Gao Q, Gao F, Wang Q, He Q, Wu X, et al. Impact of the Delta variant on vaccine efficacy and response strategies. *Expert Rev Vaccines.* 2021; 20(10):1201–1209. doi:10.1080/14760584.2021.1976153.
105. Shiehzadegan S, Alaghemand N, Fox M, Venketaraman V. Analysis of the Delta variant B.1.617.2 COVID-19. *Clin Pract.* 2021; 11(4):778–784. doi:10.3390/clinpract11040093.
106. Mohammadi M, Shayestehpour M, Mirzaei H. The impact of spike mutated variants of SARS-CoV-2 (Alpha, Beta, Gamma, Delta, and Lambda) on the efficacy of subunit recombinant vaccines. *Braz J Infect Dis.* 2021; 25(4):101606. doi:10.1016/j.bjid.2021.101606.
107. **Colac S.** Genetic significance and monitoring of circulating variants of the SARS-CoV-2 virus in the Republic of Moldova. *One Health and Risk Management.* 2023; vol. 2, supl. nr. 1, p. 85. ISSN 2587-3458.
108. Tian D, Sun Y, Zhou J, Ye Q. The global epidemic of the SARS-CoV-2 Delta variant, key spike mutations and immune escape. *Front Immunol.* 2021; 12:751778. doi:10.3389/fimmu.2021.751778.
109. Karimizadeh Z, Dowran R, Mokhtari-Azad T, Shafiei-Jandaghi NZ. The reproduction rate of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 different variants recently circulated in human: a narrative review. *Eur J Med Res.* 2023; 28(1):1–10. doi:10.1186/s40001-023-01047-0.
110. Abudunaibi B, Liu W, Guo Z, Zhao Z, Rui J, Song W, et al. A comparative study on the three calculation methods for reproduction numbers of COVID-19. *Front Med.* 2023; 9:1079842. doi:10.3389/fmed.2022.1079842.
111. Ito K, Piantham C, Nishiura H. Estimating relative generation times and reproduction numbers of Omicron BA.1 and BA.2 with respect to Delta in Denmark. *medRxiv [Preprint].* 2022. doi:10.1101/2022.03.02.22271767
112. Lino A, Cardoso MA, Martins-Lopes P, Gonçalves HMR. Omicron—the new SARS-CoV-2 challenge? *Rev Med Virol.* 2022; 32(6):e2358. doi:10.1002/rmv.2358.
113. **Colac S.** Variabilitatea genetică a virusului SARS-CoV-2, varianta Omicron circulantă pe teritoriul Republicii Moldova. *Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță.* Chișinău; 2023. p. 152. [https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/193538](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/193538).
114. Scarpa F, Ciccozzi M. On the SARS-CoV-2 BA.2.86 lineage: a mutation point of view. *J Med Virol.* 2023; 95(9):e29079. doi:10.1002/jmv.29079.
115. World Health Organization. TAG-VE risk evaluation for SARS-CoV-2 variant under monitoring: XFG. 2025. Disponibil la: <https://www.who.int>.

116. **Colac S**, Burlac V, Burduniuc O. Genetic profile of the JN.1 mutation of the SARS-CoV-2 virus detected in the Republic of Moldova. *Mold J Health Sci.* 2025;12(3 Suppl 2):647. Disponibil la: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/32377>.
117. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the COVID-19 outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020; 323(13):1239–1242. doi:10.1001/jama.2020.2648.
118. Ministerul Sănătății al Republicii Moldova. Protocol clinic național (ediția X): infecția cu coronavirus de tip nou (COVID-19). Chișinău; 2025. Disponibil la: <https://share.google/GZrbNGM9Uz0LPvpms>.
119. World Health Organization. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions: scientific brief. 2020. Disponibil la: <https://www.who.int>.
120. Ge H, Wang X, Yuan X, Xiao G, Wang C, Deng T, et al. The epidemiology and clinical information about COVID-19. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39(6):1011–1019. doi:10.1007/s10096-020-03874-z.
121. Zolin VV, et al. Assessment of the viability of SARS-CoV-2 coronavirus on various types of surfaces, as well as in drinking and sea water. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii.* 2021; (2):108–113. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-108-113>.
122. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med.* 2020; 382(13):1199–1207. doi:10.1056/NEJMoa2001316.
123. Backer JA, Klinkenberg D, Wallinga J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China. *Euro Surveill.* 2020;25(5):2000062. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.2000062
124. Bai Y, Yao L, Wei T, Tian F, Jin DY, Chen L, et al. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. *JAMA.* 2020; 323(14):1406–1407. doi:10.1001/jama.2020.2565.
125. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395(10229):1054–1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
126. Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20(6):656–657. doi:10.1016/S1473-3099(20)30232-2.
127. Du Z, Xu X, Wu Y, Wang L, Cowling BJ, Meyers LA. Serial interval of COVID-19 among publicly reported confirmed cases. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(6):1341–1343. doi:10.3201/eid2606.200357.
128. Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide population-based seroepidemiological study. *Lancet.* 2020; 396(10250):535–544. doi:10.1016/S0140-6736(20)31483-5.
129. Lavezzo E, Franchin E, Ciavarella C, et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. *Nature.* 2020; 584(7821):425–429. doi:10.1038/s41586-020-2488-1.
130. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA.* 2020; 323(11):1061–1069. doi:10.1001/jama.2020.1585.
131. Salje H, Tran Kiem C, Lefrancq N, et al. Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France. *Science.* 2020; 369(6500):208–211. doi:10.1126/science.abc3517.
132. Grasselli G, Greco M, Zanella A, et al. Risk factors associated with mortality among patients with COVID-19 in intensive care units in Lombardy, Italy. *JAMA Intern Med.* 2020; 180(10):1345–1355. doi:10.1001/jamainternmed.2020.3539.

133. Maison DP, Tasissa H, Deitchman A, et al. COVID-19 clinical presentation, management, and epidemiology: a concise compendium. *Front Public Health*. 2025; 13:1498445. doi:10.3389/fpubh.2025.1498445.
134. Zsichla L, Müller V. Risk factors of severe COVID-19: a review of host, viral and environmental factors. *Viruses*. 2023; 15(1):175. doi:10.3390/v15010175.
135. Tscherne A, Krammer F. A review of currently licensed mucosal COVID-19 vaccines. *Vaccine*. 2025; 61:127356. doi:10.1016/j.vaccine.2025.127356.
136. Azoicai AN, Miron I, Lupu A, et al. COVID-19 vaccination: challenges in the pediatric population. *Front Public Health*. 2025; 12:1390951. doi:10.3389/fpubh.2024.1390951.
137. Baldeh M, Bawa FK, Bawah FU, et al. Lessons from the pandemic: best practices in selecting molecular diagnostics for infectious diseases in Sub-Saharan Africa. *Expert Rev Mol Diagn*. 2024; 24(3):153–159. doi:10.1080/14737159.2024.2321230.
138. Li Y, Lu SM, Wang JL, Yao HP, Liang LG. Progress in SARS-CoV-2 diagnosis and clinical treatment. *Heliyon*. 2024; 10(12):e31345. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e31345.
139. Ishige T. Molecular biology of SARS-CoV-2 and techniques of diagnosis and surveillance. *Adv Clin Chem*. 2024; 118:35–85. doi:10.1016/bs.acc.2023.10.002.
140. El-Daly MM. Advances and challenges in SARS-CoV-2 detection: molecular and serological technologies. *Diagnostics*. 2024; 14(5):519. doi:10.3390/diagnostics14050519.
141. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, et al. Next-generation sequencing in COVID-19: a tool for SARS-CoV-2 diagnosis and molecular epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*. 2021; 43(2):845–867. doi:10.3390/cimb43020061.
142. Burlac V, Burduniuc O, Colac S, et al. Metagenomics sequencing in infection diagnosis: clinical applications. *One Health J*. 2025; 3:5–12. DOI:10.31073/onehealthjournal2025-V-01.
143. Gong YN, Kuo NY, Yeh TS, Shih SR, Chen GW. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 in Taiwan: A perspective on evolutionary data interpretation and sequencing issues. *Biomed J*. 2025; 48(4):100820. doi: 10.1016/j.bj.2024.100820. Epub 2024 Nov 26. PMID: 39608568; PMCID: PMC12332203.
144. Mandlik JS, Patil AS, Singh S. Next-generation sequencing: platforms and applications. *J Pharm Bioallied Sci*. 2024; 16(Suppl 1):S41–S45. doi:10.4103/jpbs.jpbs\_457\_23.
145. Konono KCC, et al. Technological barriers to genomic surveillance for vaccine development against SARS-CoV-2 in Africa: a systematic review. *Influenza Other Respir Viruses*. 2024; 18(11):e70047. doi:10.1111/irv.70047.
146. Schmeing S, et al. ReSeq simulates realistic Illumina sequencing data. *Genome Biol*. 2021; 22(1):132. doi:10.1186/s13059-021-02343-6.
147. Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(10):1932–1941. doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.015.
148. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016; 107(1):1–8. doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
149. Thermo Fisher Scientific. Semiconductor sequencing technology. 2025. Disponibil la: <https://www.thermofisher.com>.
150. Golan D, Medvedev P. Using state machines to model the Ion Torrent sequencing process and improve read error rates. 2013; 29(13):i344–i351. doi:10.1093/bioinformatics/btt215.
151. Ambardar S, Gupta R, et al. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. *Indian J Microbiol*. 2016; 56(4):394–404. doi:10.1007/s12088-016-0606-4.

152. Wang C, Yang S, Liu Q, et al. Application of second-generation sequencing technology in lower respiratory tract infection. *J Clin Lab Anal.* 2024; 38:e25090. doi:10.1002/jcla.25090.
153. Long-read sequencing in clinical settings. *Hum Genomics.* 2023; 17:45. doi:10.1186/s40246-023-00475-4.
154. Wadas I, Domingues I. Systematic review of phylogenetic analysis techniques for RNA viruses using bioinformatics. *Int J Mol Sci.* 2025; 26(5):2180. doi:10.3390/ijms26052180.
155. Hu T, Li J, Zhou H, et al. Bioinformatics resources for SARS-CoV-2 discovery and surveillance. *Brief Bioinform.* 2021; 22(2):631–641. doi:10.1093/bib/bbaa030.
156. Naughton CC, Roman FA, et al. Show us the data: global wastewater monitoring efforts. *Sci Total Environ.* 2021; 779:146466. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146466.
157. Sutcliffe SG, et al. Tracking SARS-CoV-2 variants of concern in wastewater: an assessment of nine computational tools using simulated genomic data. *Microb Genom.* 2024; 10(5):001249. doi:10.1099/mgen.0.001249.
158. Foladori P, Cutrupi F, et al. SARS-CoV-2 in wastewater: state of knowledge. *Sci Total Environ.* 2020; 743:140444. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140444.
159. Zhang Y, Cen M, Hu M, et al. Fecal shedding of SARS-CoV-2 RNA. *Clin Transl Gastroenterol.* 2021; 12(4):e00343. doi:10.14309/ctg.0000000000000343.
160. Corchis-Scott R, et al. Wastewater surveillance in university residence. *Microbiol Spectr.* 2021; 9(2):e0079321. doi:10.1128/Spectrum.00793-21.
161. Ferraro GB, et al. A state-of-the-art scoping review on SARS-CoV-2 in sewage focusing on the potential of wastewater surveillance for monitoring the COVID-19 pandemic. *Food Environ Virol.* 2022; 14(3):315–354. doi:10.1007/s12560-022-09505-8.
162. Bar-Or I, et al. Detection of SARS-CoV-2 variants in wastewater. *Sci Total Environ.* 2021; 789:148002. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148002.
163. **Colac S.** Monitoring the spread of sars-cov-2 via wastewater genome sequencing. *Abordarea O singură sănătate pentru securitatea sănătății globale*, Ed. Ediția a III-a, 2025, Chișinău: Tipogr. "Print Caro", 2025, p. 18. ISBN (pdf) 978-5-85748-246-9.
164. Ciannella S, González-Fernández C, et al. Wastewater-based epidemiology for SARS-CoV-2. *Sci Total Environ.* 2023; 878:162953. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162953.
165. **Colac S,** Burlac V, Sitnic V. Determinanți genetici și ai virulenței în genomul microorganismelor cu impact major asupra sănătății publice. *Abordarea O singură sănătate pentru securitatea sănătății globale*, Ed. Ediția a III-a, 20-21 noiembrie 2025, Chișinău. Chișinău: Tipogr. "Print Caro", 2025, p. 15. ISBN (pdf) 978-5-85748-246-9.
166. McMinn BR, Korajkic A, et al. Wastewater concentration approaches for viral detection. *J Virol Methods.* 2023; 311:114645. doi:10.1016/j.jviromet.2022.114645.
167. Parra-Arroyo L, et al. Viral RNA degradation in wastewater. *Trends Anal Chem.* 2023; 158:116890. doi:10.1016/j.trac.2022.116890.
168. Bertels X, et al. Factors influencing SARS-CoV-2 RNA concentrations in wastewater up to sampling stage: a systematic review. *Sci Total Environ.* 2022; 820:153290. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153290.
169. Wu F, Lee WL, et al. Wastewater surveillance in the endemic future. *Water Res.* 2022; 219:118535. doi:10.1016/j.watres.2022.118535.
170. Gordev V, Hölzer M, Desirò D, et al. Leveraging wastewater sequencing to strengthen global public health surveillance. *BMC Glob Public Health.* 2025; 3:23. doi:10.1186/s44263-025-00138-w.
171. Outbreak.info. B.1.1 lineage report. 2025. Disponibil la: <https://outbreak.info>.
172. Outbreak.info. JN.1.1.1 lineage report. 2025. Disponibil la: <https://outbreak.info>.

173. Hussein HA, et al. SARS-CoV-2 genomic diversity. *Virol J.* 2024; 21:75. doi:10.1186/s12985-024-02275-3.
174. Carabelli AM, et al. SARS-CoV-2 variant biology. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21(3):162–177. doi:10.1038/s41579-022-00846-2.
175. Zhan Y, Yin H, Yin JY. Delta variant characteristics. *Int J Biol Sci.* 2022;18(5):1844–1851. doi:10.7150/ijbs.69463.
176. Focosi D, et al. Convergent evolution in SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(3):2264. doi:10.3390/ijms24032264.
177. Yajima H, et al. Evolution from BA.2 to XBB. *mBio.* 2024;15(10):e03220-23. doi:10.1128/mbio.03220-23.
178. Yamasoba D, et al. Omicron BA.2 spike characteristics. *Cell.* 2022; 185(12):2103–2115.e19. doi:10.1016/j.cell.2022.04.035
179. Yi B. Genomic recombination in SARS-CoV-2. *medRxiv [Preprint].* 2025. doi:10.1101/2025.01.01.000000.
180. Banu LA, et al. Mutational preferences of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci.* 2025; 26(13):6118. doi:10.3390/ijms26136118.
181. Mustafa MS, et al. Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2. *Med Sci.* 2024; 28:e117ms3427. doi: <https://doi.org/10.54905/disssi.v28i150.e117ms3427>.
182. Aguilar-Martinez SL, et al. Genomic characterization of SARS-CoV-2 in Peru. *Trop Med Infect Dis.* 2024; 9(2):46. doi:10.3390/tropicalmed9020046.
183. Kumar M, Patel AK, Shah AV, et al. Wastewater surveillance in India. *Sci Total Environ.* 2020; 746:141326. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141326.
184. Annan J, Henderson R, et al. Wastewater epidemiology in remote settings. *Int J Environ Res Public Health.* 2024; 21(11):1429. doi:10.3390/ijerph21111429.
185. Polo D, Quintela-Baluja M, Corbishley A, Jones DL, Singer AC, Graham DW, et al. Making waves: wastewater-based epidemiology for COVID-19: approaches and challenges. *Sci Total Environ.* 2020; 736:139076. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139076.
186. Amarasinghe SL, et al. The application of long-read sequencing in clinical settings. *Hum Genomics.* 2023; 17:47. doi:10.1186/s40246-023-00522-3.
187. Lan Y, et al. ReSeq simulates realistic Illumina high-throughput sequencing data. *Genome Biol.* 2021; 22:67. doi:10.1186/s13059-021-02265-7.
188. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19(7):409-424. doi:10.1038/s41579-021-00573-0.
189. Callaway E. Fast-spreading COVID variant can elude immune responses. *Nature.* 2021; 589:500-501. doi:10.1038/d41586-021-00121-z.

ANEXE

Anexa 1

**Tabelul A.1. 1. Evaluarea comparativă a caracteristicilor izolatelor secvențiate și a genomului variantelor OMS ale virusului SARS-CoV-2**

<b>Varianta OMS</b>	<b>Total</b> N = 733 <sup>1</sup>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta</b> N = 49 <sup>1</sup>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron</b> N = 680 <sup>1</sup>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant</b> N = 4 <sup>1</sup>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p-value<sup>3</sup></b>
<b>Substituții</b>	72.6 (21.1) 70.0 (16.0) 14.0 131.0	71, 74	42.9 (4.5) 42.0 (4.0) 33.0 58.0	42, 44	74.6 (20.1) 71.0 (20.0) 14.0 131.0	73, 76	99.8 (24.2) 105.5 (22.3) 66.0 122.0	61, 138	124	<b>&lt;0.001</b>
<b>Deleții</b>	48.6 (20.1) 55.0 (20.0) 0.0 218.0	47, 50	17.0 (11.5) 14.0 (3.0) 13.0 92.0	14, 20	50.9 (18.6) 56.0 (18.3) 0.0 218.0	49, 52	44.8 (22.7) 43.0 (31.8) 22.0 71.0	8.6, 81	93	<b>&lt;0.001</b>
<b>Insertii</b>	4.5 (8.3) 0.0 (9.0) 0.0 49.0	3.9, 5.1	0.0 (0.0) 0.0 (0.0) 0.0 0.0	NA, NA	4.8 (8.5) 0.0 (9.0) 0.0 49.0	4.2, 5.5	4.5 (5.7) 3.0 (7.5) 0.0 12.0	-4.6, 14	24	<b>&lt;0.001</b>
<b>DCC</b>	1.7 (2.2) 1.0 (1.0) 0.0 14.0	1.5, 1.8	0.9 (1.0) 1.0 (1.0) 0.0 4.0	0.62, 1.2	1.7 (2.3) 1.0 (1.0) 0.0 14.0	1.6, 1.9	1.3 (2.5) 0.0 (1.3) 0.0 5.0	-2.7, 5.2	11	<b>0.004</b>
<b>Substituții aminoacidice</b>	41.5 (19.9) 43.0 (27.0) 6.0 95.0	40, 43	32.0 (4.2) 32.0 (6.0) 21.0 40.0	31, 33	42.1 (20.3) 44.0 (27.3) 6.0 95.0	41, 44	67.8 (27.4) 75.0 (23.3) 29.0 92.0	24, 111	13	<b>0.002</b>
<b>Deleții aminoacidice</b>	11.9 (5.1) 12.0 (5.0) 0.0 67.0	12, 12	5.3 (1.8) 5.0 (2.0) 3.0 11.0	4.8, 5.9	12.4 (4.9) 12.0 (4.0) 0.0 67.0	12, 13	13.8 (3.0) 13.0 (1.8) 11.0 18.0	9.0, 19	102	<b>&lt;0.001</b>

<b>Varianta OMS</b>	<b>Total</b> N = 733 <sup>1</sup>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta</b> N = 49 <sup>1</sup>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron</b> N = 680 <sup>1</sup>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant</b> N = 4 <sup>1</sup>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p-value<sup>3</sup></b>
<b>Insertii aminoacidice</b>	0.5 (1.4) 0.0 (0.0) 0.0 8.0	0.43, 0.63	0.0 (0.0) 0.0 (0.0) 0.0 0.0	NA, NA	0.6 (1.4) 0.0 (1.0) 0.0 8.0	0.46, 0.67	0.5 (0.6) 0.5 (1.0) 0.0 1.0	-0.42, 1.4	17	<b>&lt;0.001</b>
<b>Vârsta</b>	57.5 (21.3) 63.0 (27.0) 1.0 95.0	56, 59	61.1 (19.2) 67.0 (25.0) 3.0 94.0	56, 67	57.2 (21.4) 63.0 (27.0) 1.0 95.0	56, 59	56.3 (37.9) 70.0 (31.3) 1.0 84.0	-4.0, 116	1.5	0.5
<b>Gen</b>									0.20	>0.9
F	408 (55.7%)	52%, 59%	26 (53.1%)	39%, 67%	380 (55.9%)	52%, 60%	2 (50.0%)	1.0%, 99%		
M	325 (44.3%)	41%, 48%	23 (46.9%)	33%, 61%	300 (44.1%)	40%, 48%	2 (50.0%)	1.0%, 99%		
<b>Reședință</b>									0.05	>0.9
Rural	153 (20.9%)	18%, 24%	10 (20.4%)	9.1%, 32%	142 (20.9%)	18%, 24%	1 (25.0%)	0.00%, 67%		
Urban	580 (79.1%)	76%, 82%	39 (79.6%)	68%, 91%	538 (79.1%)	76%, 82%	3 (75.0%)	33%, 100%		
<b>Proveniența</b>									0.47	>0.9
Import	6 (0.8%)	0.17%, 1.5%	0 (0.0%)	0.00% , 0.00%	6 (0.9%)	0.18%, 1.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%		
Local	727 (99.2%)	99%, 100%	49 (100.0%)	100%, 100%	674 (99.1%)	98%, 100%	4 (100.0%)	100%, 100%		

<b>Varianta OMS</b>	<b>Total N = 733<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta N = 49<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron N = 680<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant N = 4<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p- value<sup>3</sup></b>
<b>Anul</b>									692	<b>&lt;0.001</b>
2021	46 (6.3%)	4.5%, 8.0%	46 (93.9%)	87%, 100%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%		
2022	410 (55.9%)	52%, 60%	3 (6.1%)	0.00% , 13%	407 (59.9%)	56%, 64%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%		
2023	215 (29.3%)	26%, 33%	0 (0.0%)	0.00% , 0.00%	212 (31.2%)	28%, 35%	3 (75.0%)	33%, 100%		
2024	62 (8.5%)	6.4%, 10%	0 (0.0%)	0.00% , 0.00%	61 (9.0%)	6.8%, 11%	1 (25.0%)	0.00%, 67%		
<sup>1</sup> Mean (SD) Median (IQR) Min Max ; n (%)										
<sup>2</sup> CI = Confidence Interval										
<sup>3</sup> Kruskal-Wallis rank sum test; Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 1e+05 replicates)										

**Tabelul A.1. 2. Evaluarea comparativă a mutațiilor private detectate în variantele OMS ale virusului SARS-CoV-2**

<b>Mutații private</b>	<b>Total N = 733<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta N = 49<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron N = 680<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant N = 4<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p-value<sup>3</sup></b>
<b>A10447G</b>	9 (1.2%)	0.43%, 2.0%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	8 (1.2%)	0.37%, 2.0%	1 (25.0%)	0.00%, 67%	19	<b>0.034</b>
<b>A10449C</b>	14 (1.9%)	0.92%, 2.9%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	13 (1.9%)	0.88%, 2.9%	1 (25.0%)	0.00%, 67%	12	<b>0.048</b>
<b>A15451G</b>	12 (1.6%)	0.72%, 2.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	12 (1.8%)	0.78%, 2.8%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.95	0.6
<b>A16935G</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>A1931C</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>A21987G</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	1 (2.0%)	0.00%, 6.0%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3.4	0.2
<b>A22000C</b>	28 (3.8%)	2.4%, 5.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	28 (4.1%)	2.6%, 5.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2.3	0.4
<b>A22200T</b>	4 (0.5%)	0.01%, 1.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	4 (0.6%)	0.01%, 1.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.31	>0.9
<b>A22578G</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>A22664C</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9

Mutații private	Total N = 733 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Delta N = 49 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Omicron N = 680 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Recombinant N = 4 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Statistic Test <sup>3</sup>	p-value <sup>3</sup>
<b>A22898G</b>	21 (2.9%)	1.7%, 4.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	21 (3.1%)	1.8%, 4.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.7	0.5
<b>A22942T</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>A22992G</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>A22995C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>A23048G</b>	80 (10.9%)	8.7%, 13%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	80 (11.8%)	9.3%, 14%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	7.0	<b>0.045</b>
<b>A23222G</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>A23604C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>A23854C</b>	6 (0.8%)	0.17%, 1.5%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	6 (0.9%)	0.18%, 1.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.47	>0.9
<b>A24130C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>A24469T</b>	22 (3.0%)	1.8%, 4.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	22 (3.2%)	1.9%, 4.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.8	0.5
<b>A26709G</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9

Mutații private	Total N = 733 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Delta N = 49 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Omicron N = 680 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Recombinant N = 4 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Statistic Test <sup>3</sup>	p-value <sup>3</sup>
<b>A28882G</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>A4184G</b>	6 (0.8%)	0.17%, 1.5%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	6 (0.9%)	0.18%, 1.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.47	>0.9
<b>A8393G</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>C15939T</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>C17859T</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>C22016T</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	1 (25.0%)	0.00%, 67%	90	<b>0.011</b>
<b>C22629A</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>C22673T</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>C22786A</b>	6 (0.8%)	0.17%, 1.5%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	4 (0.6%)	0.01%, 1.2%	2 (50.0%)	1.0%, 99%	120	<b>&lt;0.001</b>
<b>C22895G</b>	17 (2.3%)	1.2%, 3.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	17 (2.5%)	1.3%, 3.7%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.4	0.5
<b>C22896T</b>	29 (4.0%)	2.5%, 5.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	29 (4.3%)	2.7%, 5.8%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2.4	0.4

<b>Mutații private</b>	<b>Total N = 733<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta N = 49<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron N = 680<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant N = 4<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p-value<sup>3</sup></b>
<b>C23013A</b>	11 (1.5%)	0.62%, 2.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	11 (1.6%)	0.67%, 2.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.87	0.6
<b>C23018T</b>	5 (0.7%)	0.09%, 1.3%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	5 (0.7%)	0.09%, 1.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.39	>0.9
<b>C23019T</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>C23031T</b>	20 (2.7%)	1.5%, 3.9%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	20 (2.9%)	1.7%, 4.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.6	0.5
<b>C23075T</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>C27259A</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>C27382G</b>	9 (1.2%)	0.43%, 2.0%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	9 (1.3%)	0.46%, 2.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.71	0.7
<b>C27384T</b>	9 (1.2%)	0.43%, 2.0%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	9 (1.3%)	0.46%, 2.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.71	0.7
<b>C27438T</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>C29510A</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>C3565T</b>	5 (0.7%)	0.09%, 1.3%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	5 (0.7%)	0.09%, 1.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.39	>0.9

<b>Mutații private</b>	<b>Total N = 733<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta N = 49<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron N = 680<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant N = 4<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p-value<sup>3</sup></b>
<b>G18163A</b>	20 (2.7%)	1.5%, 3.9%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	19 (2.8%)	1.6%, 4.0%	1 (25.0%)	0.00%, 67%	8.9	0.051
<b>G19326A</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>G20055A</b>	20 (2.7%)	1.5%, 3.9%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	20 (2.9%)	1.7%, 4.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.6	0.5
<b>G22278A</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>G22688A</b>	5 (0.7%)	0.09%, 1.3%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	5 (0.7%)	0.09%, 1.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.39	>0.9
<b>G22882T</b>	14 (1.9%)	0.92%, 2.9%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	14 (2.1%)	0.99%, 3.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.1	0.6
<b>G22917T</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>G22942T</b>	11 (1.5%)	0.62%, 2.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	11 (1.6%)	0.67%, 2.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.87	0.7
<b>G22995C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>G23018T</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>G23040A</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9

<b>Mutații private</b>	<b>Total N = 733<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta N = 49<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron N = 680<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant N = 4<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p-value<sup>3</sup></b>
<b>G23055A</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>G23403A</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>G23599T</b>	26 (3.5%)	2.2%, 4.9%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	26 (3.8%)	2.4%, 5.3%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2.1	0.3
<b>G26275A</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>G26577C</b>	6 (0.8%)	0.17%, 1.5%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	6 (0.9%)	0.18%, 1.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.47	>0.9
<b>G405A</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>G670T</b>	42 (5.7%)	4.0%, 7.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	41 (6.0%)	4.2%, 7.8%	1 (25.0%)	0.00%, 67%	5.8	0.051
<b>G9424A</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T10029C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T10189C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T10198C</b>	4 (0.5%)	0.01%, 1.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	4 (0.6%)	0.01%, 1.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.31	>0.9

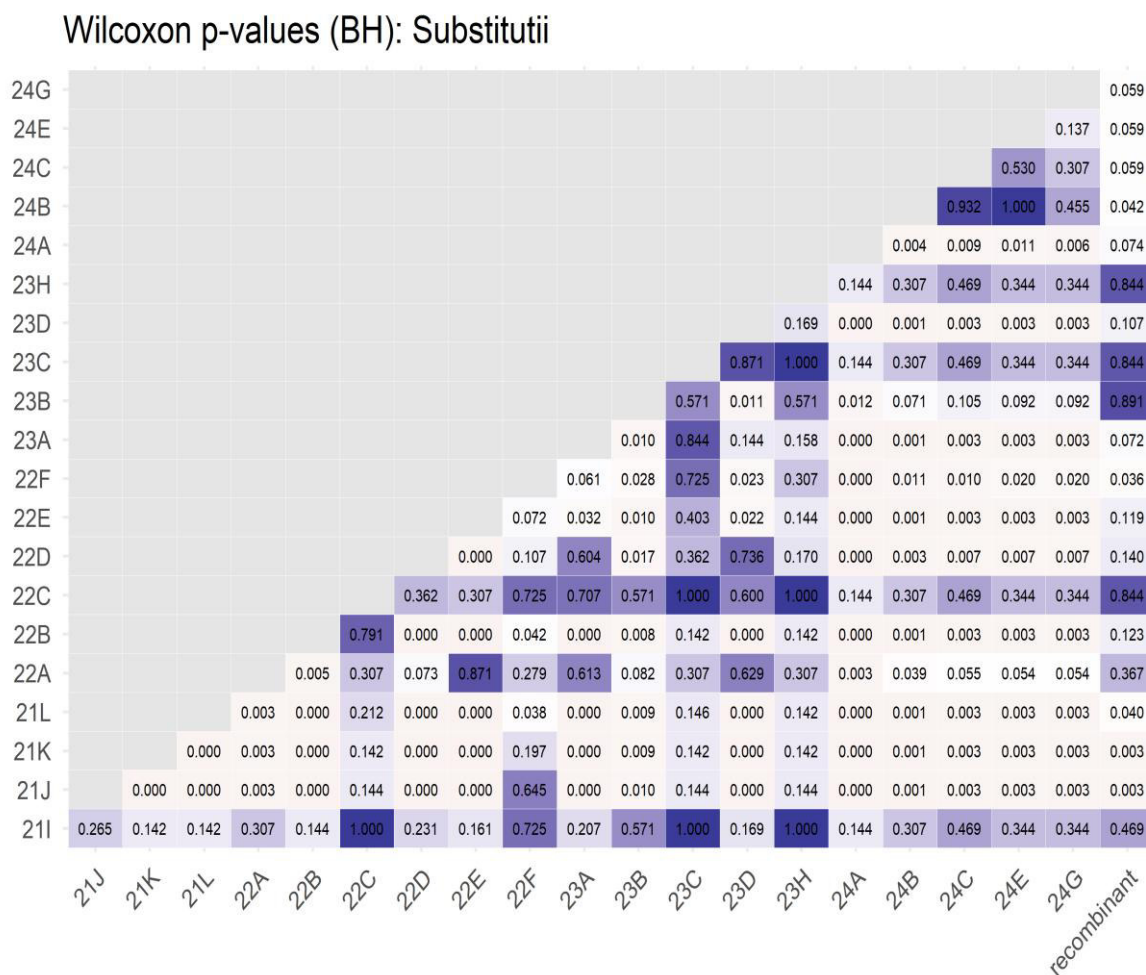
<b>Mutații private</b>	<b>Total N = 733<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta N = 49<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron N = 680<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant N = 4<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p-value<sup>3</sup></b>
<b>T11674C</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>T11956C</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>T12789C</b>	14 (1.9%)	0.92%, 2.9%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	14 (2.1%)	0.99%, 3.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.1	0.6
<b>T14408C</b>	5 (0.7%)	0.09%, 1.3%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	5 (0.7%)	0.09%, 1.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.39	>0.9
<b>T15714C</b>	15 (2.0%)	1.0%, 3.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	14 (2.1%)	0.99%, 3.1%	1 (25.0%)	0.00%, 67%	12	0.052
<b>T1627C</b>	9 (1.2%)	0.43%, 2.0%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	9 (1.3%)	0.46%, 2.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.71	0.7
<b>T17334G</b>	15 (2.0%)	1.0%, 3.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	14 (2.1%)	0.99%, 3.1%	1 (25.0%)	0.00%, 67%	12	0.051
<b>T18703G</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T19524C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T19955C</b>	4 (0.5%)	0.01%, 1.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	4 (0.6%)	0.01%, 1.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.31	>0.9
<b>T21077C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9

Mutații private	Total N = 733 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Delta N = 49 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Omicron N = 680 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Recombinant N = 4 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Statistic Test <sup>3</sup>	p-value <sup>3</sup>
<b>T21110C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T21618C</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>T22317G</b>	6 (0.8%)	0.17%, 1.5%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	6 (0.9%)	0.18%, 1.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.47	>0.9
<b>T22329C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T22480C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T22674C</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>T22686C</b>	97 (13.2%)	11%, 16%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	97 (14.3%)	12%, 17%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	8.7	<b>0.015</b>
<b>T241C</b>	13 (1.8%)	0.82%, 2.7%	5 (10.2%)	1.7%, 19%	8 (1.2%)	0.37%, 2.0%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	21	<b>0.003</b>
<b>T24424A</b>	4 (0.5%)	0.01%, 1.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	4 (0.6%)	0.01%, 1.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.31	>0.9
<b>T2470C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T25416C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9

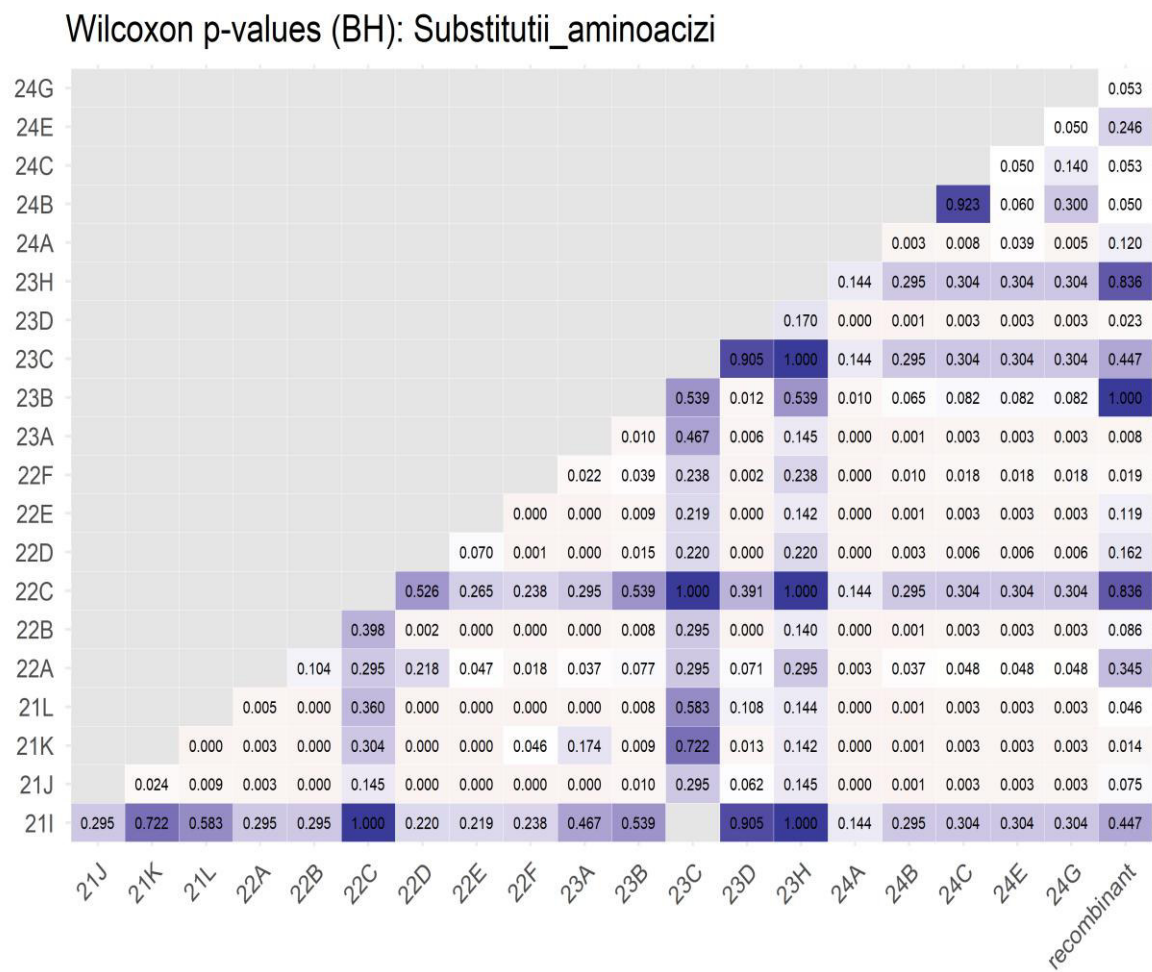
<b>Mutații private</b>	<b>Total N = 733<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Delta N = 49<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Omicron N = 680<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Recombinant N = 4<sup>1</sup></b>	<b>95% CI<sup>2</sup></b>	<b>Statistic Test<sup>3</sup></b>	<b>p-value<sup>3</sup></b>
<b>T25584C</b>	9 (1.2%)	0.43%, 2.0%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	9 (1.3%)	0.46%, 2.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.71	0.7
<b>T26060C</b>	5 (0.7%)	0.09%, 1.3%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	5 (0.7%)	0.09%, 1.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.39	>0.9
<b>T26270C</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>T27383A</b>	9 (1.2%)	0.43%, 2.0%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	9 (1.3%)	0.46%, 2.2%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.71	0.7
<b>T27807C</b>	3 (0.4%)	0.00%, 0.87%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	3 (0.4%)	0.00%, 0.94%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.23	>0.9
<b>T27889C</b>	5 (0.7%)	0.09%, 1.3%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	5 (0.7%)	0.09%, 1.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.39	>0.9
<b>T2790C</b>	17 (2.3%)	1.2%, 3.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	17 (2.5%)	1.3%, 3.7%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.4	0.5
<b>T28271A</b>	23 (3.1%)	1.9%, 4.4%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	23 (3.4%)	2.0%, 4.7%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.9	0.3
<b>T28311C</b>	14 (1.9%)	0.92%, 2.9%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	14 (2.1%)	0.99%, 3.1%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1.1	0.6
<b>T28312C</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9
<b>T28681G</b>	2 (0.3%)	0.00%, 0.65%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	2 (0.3%)	0.00%, 0.70%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.16	>0.9

Mutații private	Total N = 733 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Delta N = 49 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Omicron N = 680 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Recombinant N = 4 <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	Statistic Test <sup>3</sup>	p-value <sup>3</sup>
<b>T28846C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T44C</b>	56 (7.6%)	5.7%, 9.6%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	55 (8.1%)	6.0%, 10%	1 (25.0%)	0.00%, 67%	6.0	<b>0.048</b>
<b>T6310C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	1 (2.0%)	0.00%, 6.0%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	14	0.072
<b>T6786C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T7113C</b>	1 (0.1%)	0.00%, 0.40%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	1 (0.1%)	0.00%, 0.44%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0.08	>0.9
<b>T8986C</b>	4 (0.5%)	0.01%, 1.1%	4 (8.2%)	0.50%, 16%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	56	<b>&lt;0.001</b>
<b>T9344C</b>	280 (38.2%)	35%, 42%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	280 (41.2%)	37%, 45%	0 (0.0%)	0.00%, 0.00%	35	<b>&lt;0.001</b>
<sup>1</sup> n (%)										
<sup>2</sup> CI = Confidence Interval										
<sup>3</sup> Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (based on 1e+05 replicates)										

**Rezultatele testului Wilcoxon privind distribuția mutațiilor genomice ale virusului SARS-CoV-2 între clade detectate (inserții, deleții și substituții la nivel nucleotidic și aminoacidic)**

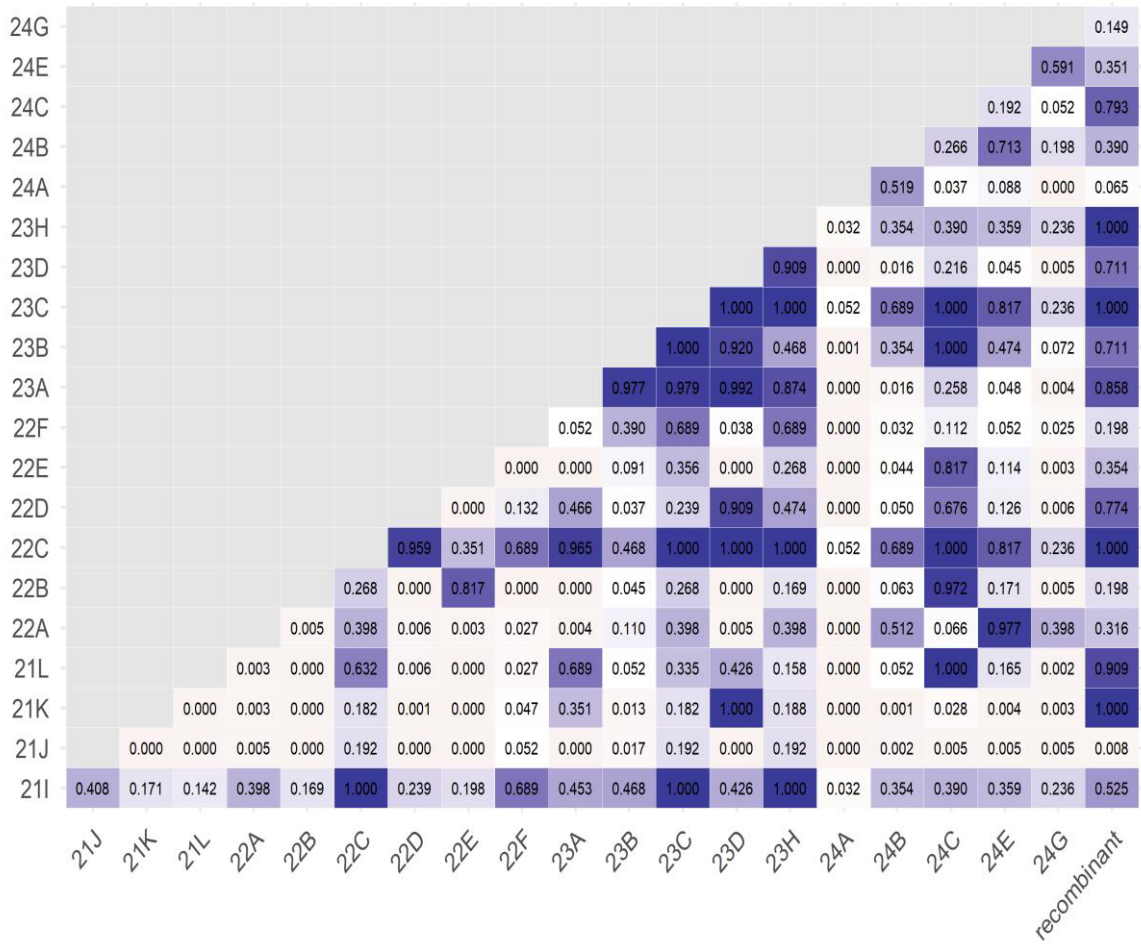


**Figura A.2. 1. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de substituții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2**



**Figura A.2. 2. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de substituții aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2**

### Wilcoxon p-values (BH): Deletii



**Figura A.2. 3. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de deleții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2**

Wilcoxon p-values (BH): Deletii\_ aminoacizi

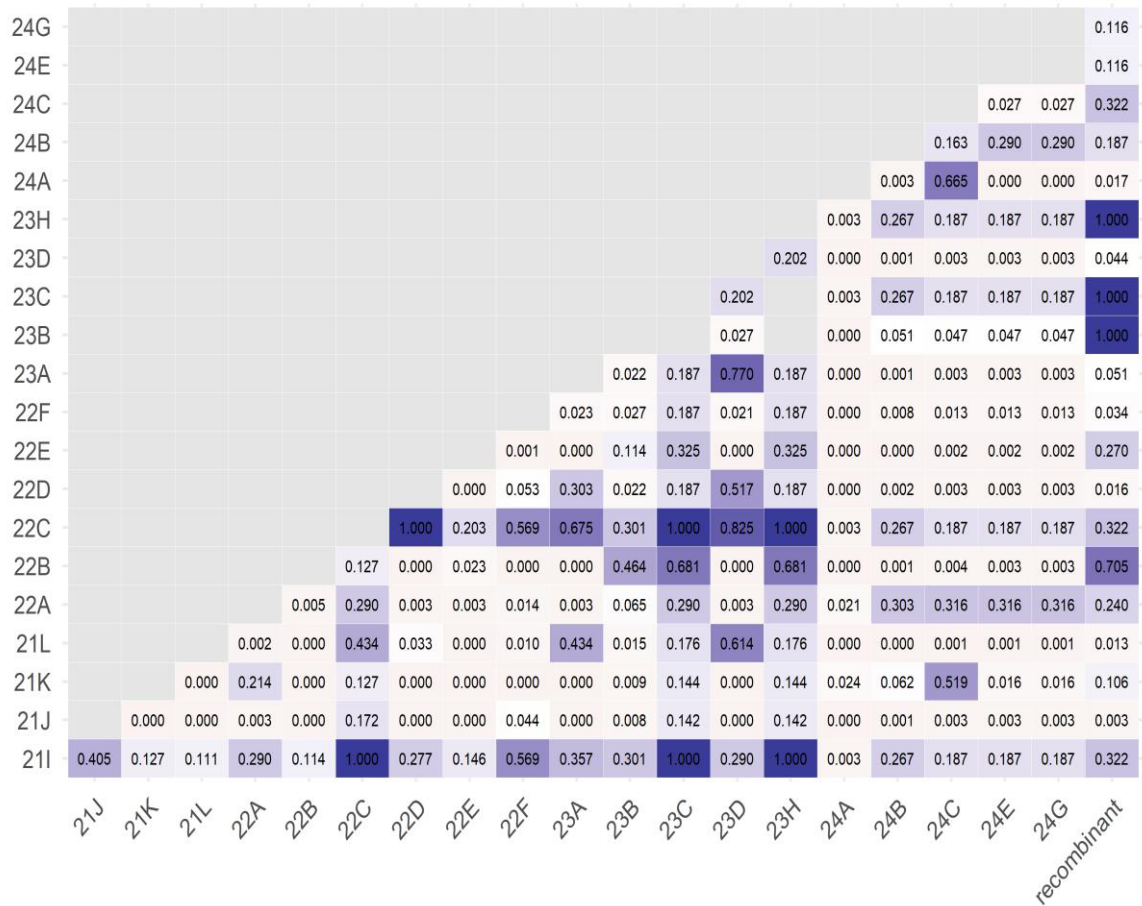
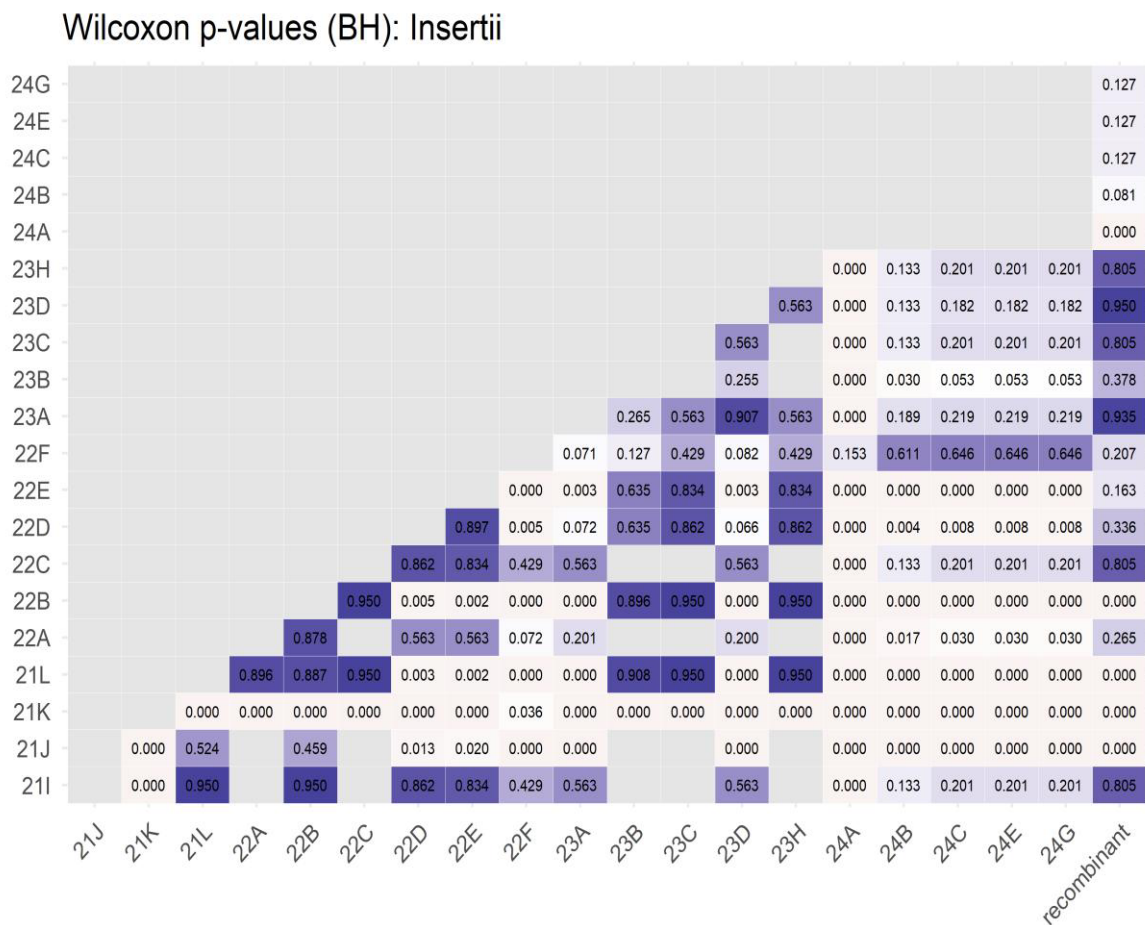
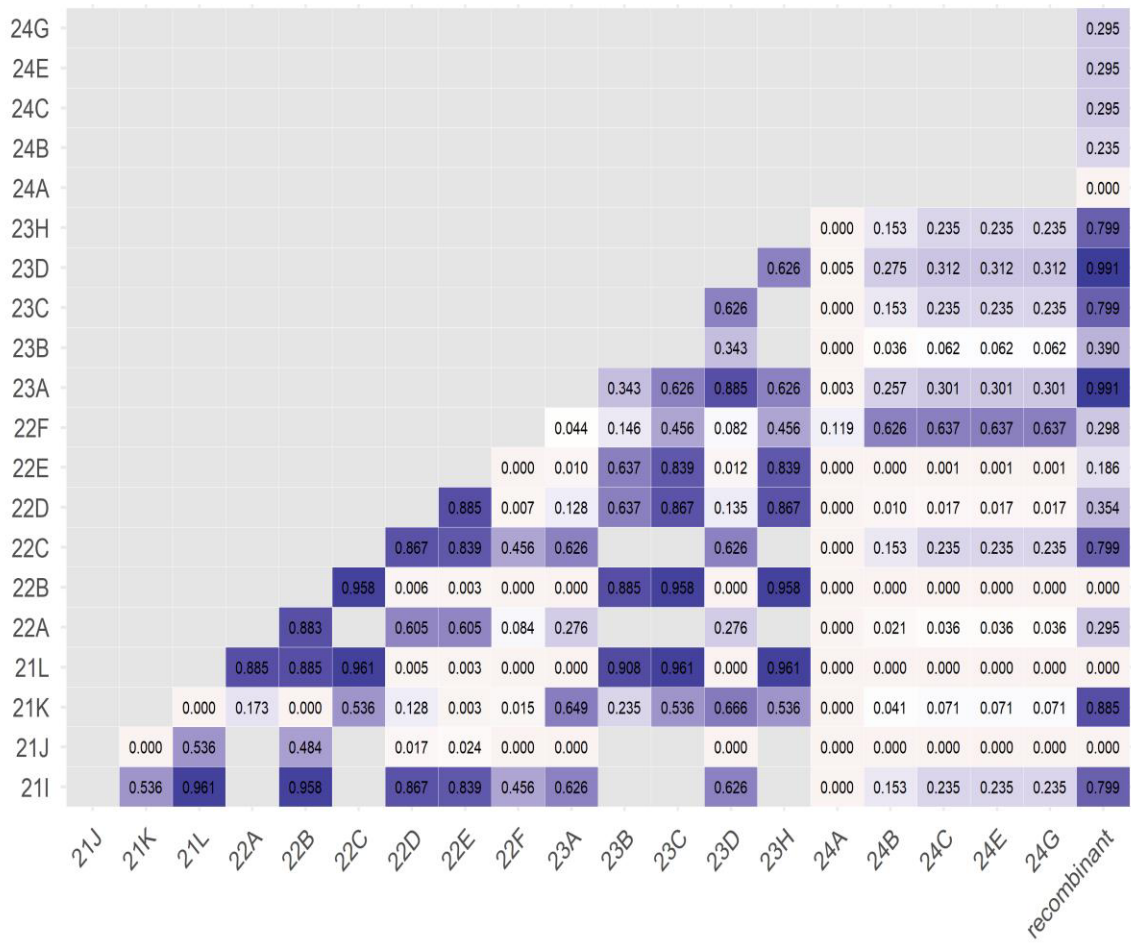


Figura A.2. 4. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de deleții aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2



**Figura A.2. 5. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de inserții nucleotidice din genomul virusului SARS-CoV-2**

### Wilcoxon p-values (BH): Insertii\_aminoacizi



**Figura A.2. 6. Testul Wilcoxon privind repartizarea pe clade a numărului de inserții aminoacidice din genomul virusului SARS-CoV-2**

**Distribuția variantelor și caracterizarea mutațiilor semnificative în dinamica genomică a virusului SARS-CoV-2 pe perioada colectării probelor**

**Tabelul A.3. 1. Mutații semnificative în dinamica genomului virusului SARS-CoV-2**

<b>Localizare</b>	<b>Mutație</b>	<b>Număr de apariții</b>	<b>Impact</b>
S	D614G	711	Una dintre cele mai timpurii și semnificative mutații în proteina Spike. D614G a devenit rapid dominantă la nivel global ca urmare a creșterii transmisibilității și a infecțiozității. Aceasta stabilizează proteina Spike facilitând legarea la receptorul ACE2 și fuziunea membranei.
N	P13L	664	O mutație comună în nucleocapsidă (N). Proteina N este multifuncțională, esențială pentru replicarea ARN-ului viral și evaziunea răspunsului imun al gazdei. Deși impactul direct al P13L nu este pe deplin elucidat, poziția sa sugerează o influență asupra stabilității ARN-ului viral sau a interacțiunilor proteinei N cu alte componente virale sau celulare.
S	N764K	657	Generează situsuri de clivaj pentru proteaza SKI-1/S1P. Contribuie la creșterea infecțiozității.
S	K417N	652	Situată în regiunea RBD a proteinei Spike contribuie la evaziunea imună prin modificarea afinității de legare a anticorpilor la RBD. A fost o mutație-cheie în varianta Beta.
S	T478K	649	La fel este situată în regiunea RBD a proteinei Spike și a fost frecventă în varianta Delta și în unele linii Omicron. Contribuie la evaziunea imună și poate, de asemenea, influența afinitatea de legare la receptorul ACE2 sporind transmisibilitatea.
S	N440K	641	De asemenea modifică proteina S, reducând detectarea și neutralizarea acesteia de către unii anticorpi. A fost observată în diverse linii filogenetice.

N	R203K	636	Corelează cu o creștere semnificativă a replicării virale. Aminoacizii de la pozițiile 203 și 204 se află într-o regiune intrinsec dezordonată a proteinei N, crucială pentru interacțiunile proteice și reglarea ciclului de viață viral. Mutația poate optimiza aceste interacțiuni, facilitând replicarea.
ORF1ab	P314L	633	Este una dintre cele mai răspândite mutații în genomul virusului SARS-CoV-2 și servește adesea ca marker filogenetic. P314L ar putea influența rata de elongație a lanțului de ARN și stabilitatea complexului de replicare contribuind la fitness-ul general al virusului.
N	G204R	629	A fost detectată frecvent în coprezență cu R203K și contribuie la creșterea replicării virale prin optimizarea organizării ribonucleoproteinei virale. Această combinație de mutații în N a fost asociată cu o virulență sporită în anumite variante.
S	P681H	619	Mutație specifică pentru varianta Alpha. Facilitează fuziunea virală cu membranele celulare contribuind astfel la o transmisibilitate sporită.
S	G142D	614	Este localizată în domeniul N-terminal (NTD) al proteinei Spike și este implicată în evaziunea imună modificând epitopii recunoscuți de anumite clase de anticorpi neutralizanți.
S	S373P	588	Specifică variantei Omicron și cu impact în anumite schimbări conformaționale RBD. Facilitează legarea la ACE2 și reduce recunoașterea de către anticorpi.
S	E484A	552	Similar cu E484K, această substituție contribuie la evaziunea imună. Modifică epitopii recunoscuți de anticorpii generați prin infecție naturală sau vaccinare.
S	S371F	496	Mutație caracteristică variantei Omicron. Contribuie la modificările de conformație RBD și la evaziunea imună.
S	N501Y	453	N501Y este considerată o mutație emblematică în proteina Spike care crește semnificativ afinitatea de

			legare a virusului la receptorul uman ACE2. Mutație-cheie în variantele Alpha, Beta, Gamma și ulterior în Omicron, a fost un factor important al răspândirii pandemiei de COVID-19.
S	L452R	257	A fost o mutație definitorie pentru varianta Delta, fiind asociată cu o transmisibilitate crescută și o rezistență parțială la anticorpi.
S	Q493R	216	Similar cu Q493K, această mutație a fost identificată în varianta Omicron și modulează recunoașterea de către anticorpi.
S	Y144del	125	Deleție implicată în evaziunea imună prin eliminarea unor epitopi recunoscuți de anumite clase de anticorpi neutralizanți.
S	P681R	110	Mutație prezentă în variantele Delta și Omicron. Induce infecțiozitate și transmisibilitate crescută.
S	S371L	92	Similară cu S371F și prezentă în varianta Omicron. Contribuie la modificări structurale ale domeniului de legare la receptor.
S	E484K	60	Este o mutație care reduce semnificativ neutralizarea de către anticorpi, atât de cei induși de vaccin, cât și de cei postinfecție. Este prezentă în variantele Beta și Gamma, și contribuie la fenomenul de <i>immune escape</i> permițând reinfecții și o eficacitate redusă a unor tratamente cu anticorpi monoclonali.
N	R203M	49	Similară cu R203K. Este implicată în creșterea replicării virale.
S	R346K	48	Se întâlnește în special în varianta Omicron și este asociată cu o evaziune imună semnificativă atât față de anticorpii generați de infecții, cât și de vaccinuri.

**Tabelul A.3. 2. Frecvența variantelor virusului SARS-CoV-2 detectate pe perioada colectării probelor**

<b>Locul colectării</b>	<b>Denumirea probei</b>	<b>Linie genetică</b>	<b>Perioada colectării</b>	<b>Abundența</b>
Control pozitiv / Proba umană	S24_S24_L001	JN.1.1.1	2024-08-08	0.998
Stația de epurare din mun. Chișinău	S1_S1_L001	B.1.177.66	2024-09-04	0.75
		B.1.1.363		0.125
	S2_S2_L001	B.1.104	2024-09-06	0.092
		B.1.431		0.092
		B.6		0.092
		B.6.1		0.092
		B.6.3		0.092
		B.6.4		0.092
		B.6.5		0.092
		B.6.6		0.092
		B.6.8		0.092
		B.1.420		0.056
	S3_S3_L001	B.1.177.66	2024-09-09	0.5
	S4_S4_L001	A.12	2024-09-13	0.556
		B.1.1.374		0.2
	S5_S5_L001	B.6.1	2024-09-15	0.229
		B.6.3		0.229
		B.6.5		0.229
		B.6.6		0.229
		B.1.1.243		0.059
	S6_S6_L001	B.1.177.66	2024-09-20	0.5
		B.6.1		0.078
		B.6.3		0.078
		B.6.4		0.078
		B.6.5		0.078
		B.6.6		0.078
		B.1.1.243		0.07
S7_S7_L001	B.1.411	2024-09-23	0.444	
	B.1.1.374		0.167	
	B.1.177.66		0.167	
	B.10		0.056	
S8_S8_L001	B.11	2024-09-27	0.23	
	B.1.1.363		0.2	
	AZ.4		0.163	
	AZ.5		0.163	
	B.1.292		0.163	
S9_S9_L001	B.1.177.66	2024-09-30	0.75	
S10_S10_L001	B.1.177.66	2024-10-04	0.8	
S11_S11_L001	B.1.1.305	2024-10-07	0.884	
	XT		0.059	
S12_S12_L001	B.1.177.66	2024-10-11	0.763	
S13_S13_L001	B.1.177.25	2024-10-14	0.167	
S14_S14_L001	B.6.1	2024-10-18	0.161	

		B.6.3		0.161
		B.6.4		0.161
		B.6.5		0.161
		B.6.6		0.161
		B.6.8		0.161
	S15_S15_L001	B.1.177.66	2024-10-21	0.128
		AE.4		0.083
		B.1.1.243		0.055
	S16_S16_L001	B.1.177.66	2024-10-25	0.625
		B.1.579		0.111
		B.1.1.357		0.065
		B.1.539		0.065
		B.1.1.243		0.054
	S17_S17_L001	B.1.160.32	2024-10-28	0.968
	S18_S18_L001	B.1.1.243	2024-11-01	0.667
		B.1.177.66		0.331
	S19_S19_L001	B.1.1.243	2024-11-04	0.869
	S20_S20_L001	B.1.177.66	2024-11-08	0.663
		B.1.1.243		0.308
	S21_S21_L001	B.1.177.66	2024-11-15	0.756
		B.1.579		0.111
		B.1.289		0.08
	S22_S22_L001	B.1.1.243	2024-11-18	0.75
		B.1.177.66		0.224
	S23_S23_L001	B.1.1.45	2024-11-22	0.394
		B.11		0.394
		AE.4		0.2

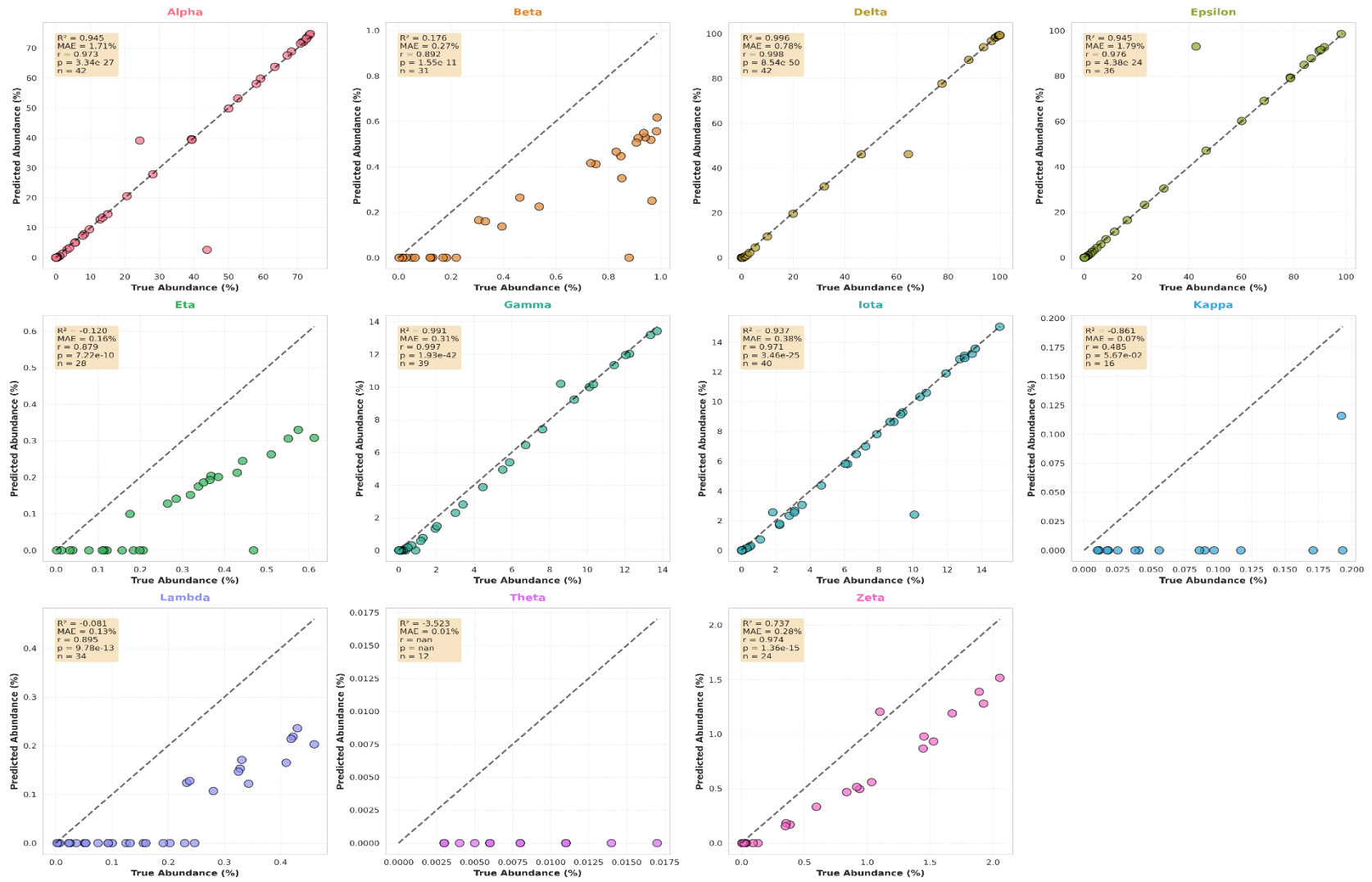
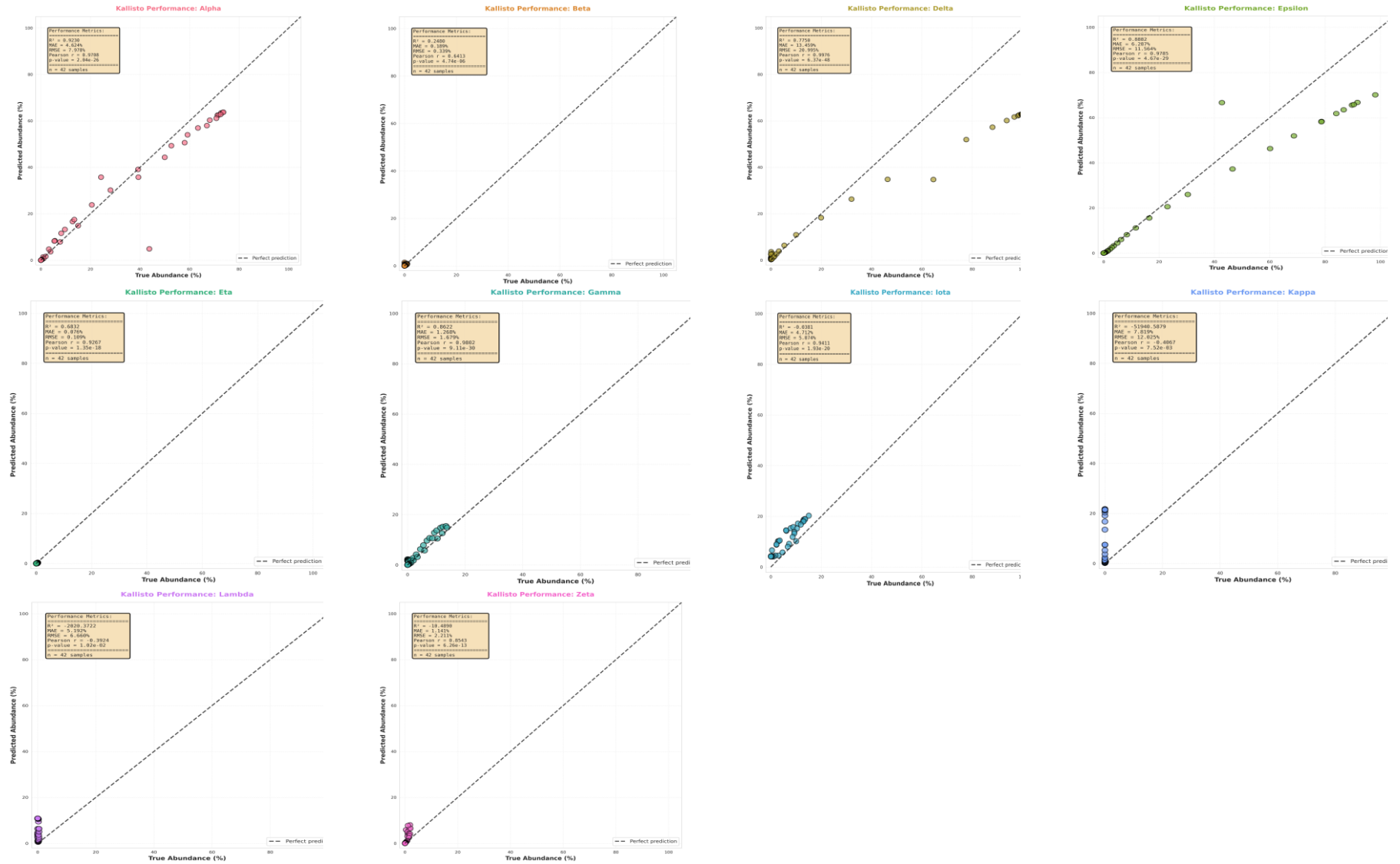


Figura A.4. 1. Performanța instrumentului Freyja pentru fiecare variantă a virusului SARS-CoV-2



**Figura A.4. 2. Performanța instrumentului Kallisto pentru fiecare variantă a virusului SARS-CoV-2**

## Protocol clinic național (ediția X), PCN-371, INFECȚIA CU CORONAVIRUS DE TIP NOU (COVID-19)



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL REPUBLICII MOLDOVA

### INFECȚIA CU CORONAVIRUS DE TIP NOU (COVID-19)

Protocol clinic național  
(ediția X)

PCN-371

Chișinău, 2025

#### A.4. Obiectivele protocolului

1. A spori depistarea precoce (în primele 12-24 ore de la debutul bolii) a persoanelor cu COVID-19 (caz suspect, probabil, confirmat).
2. A îmbunătăți calitatea asistenței medicale de urgență acordată pacienților cu COVID-19 (caz suspect, probabil, confirmat).
3. A spori calitatea examinării, tratamentului și supravegherii pacienților cu COVID-19 (caz suspect, probabil, confirmat).
4. A reducă rata de complicații și letalitatea la pacienții cu COVID-19 (caz suspect, probabil, confirmat).

A.5. Elaborat: martie 2020. Actualizat: ianuarie 2025

A.6. Revizuire: la necesitate

A.7. Lista autorilor care au participat la elaborarea PCN

Prenume, nume	Funcția deținută, instituția
<i>Tiberiu Holban</i>	- dr.hab.șt.med, profesor universitar, șef Catedră de boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală, USMF „Nicolae Testemițanu”, președintele Comisiei de specialitate a MS în boli infecțioase
<i>Gheorghe Placintă</i>	- dr.hab.șt.med, șef Catedră de boli infecțioase, USMF „Nicolae Testemițanu”, membru al Comisiei de specialitate a MS în boli infecțioase
<i>Ludmila Birca</i>	- dr.șt.med, conferențiar universitar, Catedra de boli infecțioase, clinica Boli infecțioase copii „Valentina Halitov”, USMF „Nicolae Testemițanu”, director, IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase pentru Copii, membru al Comisiei de specialitate a MS în boli infecțioase
<i>Stela Cojocar</i>	- dr.șt.med, conferențiar universitar, Catedra de boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală, USMF „Nicolae Testemițanu”, membru al Comisiei de specialitate a MS în boli infecțioase
<i>Angela Paraschiv</i>	- dr.șt.med, conferențiar universitar, șef Disciplina de epidemiologie Departamentul Medicină Preventivă, USMF „Nicolae Testemițanu”, președintele Comisiei de specialitate a MS în epidemiologie
<i>Ghenadie Curocichin</i>	- dr.hab.șt.med, profesor universitar, șef Catedră de medicină de familie, președintele Comisiei de specialitate a MS în medicină de familie
<i>Galina Rusu</i>	- dr.șt.med, conferențiar universitar, Catedra de boli infecțioase, clinica Boli infecțioase copii „Valentina Halitov”, USMF „Nicolae Testemițanu”
<i>Stela Cornilova</i>	- medic infecționist, asistent universitar, Catedra de boli infecțioase, clinica Boli infecțioase copii „Valentina Halitov”, USMF „Nicolae Testemițanu”, vicedirector, IMSP Spitalul Clinic Municipal de Boli Contagioase pentru Copii
<i>Tatiana Știrbu</i>	- asistent universitar, Catedra de boli infecțioase, clinica Boli infecțioase copii „Valentina Halitov”, USMF „Nicolae Testemițanu”
<i>Virginia Șalaru</i>	- dr.șt.med, conferențiar universitar, Catedra de medicină de familie, USMF „Nicolae Testemițanu”, membru al Comisiei de specialitate a MS în medicină de familie
<i>Lora Gițu</i>	- dr.șt.med., asistent universitar, Catedra de medicină de familie, USMF „Nicolae Testemițanu”
<i>Valentin Friptu</i>	- dr.hab.șt.med, profesor universitar, șef Disciplina de obstetrică, ginecologie și reproducere umană, USMF „Nicolae Testemițanu”, membru al Comisiei de specialitate a MS în obstetrică și ginecologie
<i>Stelian Hodoroșea</i>	- dr.șt.med, conferențiar universitar, Disciplina de obstetrică, ginecologie și reproducere umană, USMF „Nicolae Testemițanu”, membru al Comisiei de specialitate a MS în obstetrică și ginecologie

<b>Angela Marian-Pavlenco</b>	- dr.șt.med, conferențiar universitar, Disciplina de obstetrică, ginecologie și reproducere umană, USMF „Nicolae Testemițanu”
<b>Liviu Iarovoi</b>	- dr.șt.med, conferențiar universitar, Catedra de boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală, USMF „Nicolae Testemițanu”
<b>Jana Chihai</b>	- dr.hab.șt.med, conferențiar universitar, Catedra de psihiatrie, narcologie, psihologie medicală, USMF „Nicolae Testemițanu”
<b>Larisa Crivceanscaia</b>	- dr.hab.șt.med, conferențiar universitar, Departamentul Pediatrie, USMF „Nicolae Testemițanu”, președintele Comisiei de specialitate a MS în neonatologie,
<b>Dorina Rotaru</b>	- manager al Serviciului neonatal-pediatic, IMSP Spitalul Clinic Municipal nr.1, membru al Comisiei de specialitate a MS în neonatologie
<b>Liuba Rusu</b>	- asistent universitar, Departamentul Pediatrie, USMF „Nicolae Testemițanu”
<b>Ina Palii</b>	- dr.hab.șt.med, profesor universitar, Departamentul Pediatrie, USMF „Nicolae Testemițanu”, președintele Comisiei de specialitate a MS în pediatrie
<b>Olga Burduniuc</b>	- dr.șt.med, conferențiar cercetător master în sănătate publică, șef Direcție diagnostic de laborator în sănătate publică, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
<b>Svetlana Colac</b>	medic specialist, Laboratorul virusologic, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
<b>Alina Druc</b>	- șef Secție supravegherea epidemiologică a gripei și a infecțiilor respiratorii virale acute, Agenția Națională pentru Sănătate Publică
<b>Nadejda Diaconu</b>	- dr.șt.med., medic cardiolog, conferențiar cercetător Laboratorul „Tulburări de ritm și urgențe cardiace”, IMSP Institutul de Cardiologie

#### A.8. Lista responsabililor /structurilor care au examinat și avizat PCN

Prenume, nume	Funcția deținută, instituția
<b>Doina Rusu</b>	- membru al Comisiei de specialitate a MS în fiziopneumologie, dr.șt.med, conferențiar universitar
<b>Victor Cojocaru</b>	- președintele Comisiei de specialitate a MS în anestezie și terapie intensivă, dr.hab.șt.med, profesor universitar
<b>Ninel Revenco</b>	- președintele Comisiei științifico-metodice de profil în pediatrie și Societății de Pediatrie din Republica Moldova, dr.hab.șt.med, profesor universitar
<b>Olga Cernetchi</b>	- președintele Comisiei științifico-metodice de profil în obstetrică și ginecologie, prorector, USMF „Nicolae Testemițanu”, șef Departament Obstetrică și Ginecologie, dr.hab.șt.med, profesor universitar
<b>Anatolie Vișnevschi</b>	- președintele Comisiei de specialitate a MS în medicină de laborator, USMF „Nicolae Testemițanu”, dr.hab.șt.med, profesor universitar
<b>Nicolae Bacinschi</b>	- președintele Comisiei de specialitate a MS în farmacologie clinică, dr.hab.șt.med, profesor universitar
<b>Maria Robu</b>	- membru al Comisiei de specialitate a MS în hematologie și transfuziologie, șef Disciplina de hematologie, USMF „Nicolae Testemițanu”, dr.șt.med, conferențiar universitar
<b>Dragoș Guțu</b>	- director general, Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale
<b>Doina-Maria Rotaru</b>	- director general adjunct, Compania Națională de Asigurări în Medicină
<b>Aurel Grosu</b>	- președintele Consiliului de experți al MS, dr.hab.șt.med, profesor universitar

**Dispoziția Ministerului Sănătății cu privire la organizarea și desfășurarea atelierului de instruire PulseNet****MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA****DISPOZIȚIE**  
mun. Chișinău17 iunie 2025Nr. 304-d**Cu privire la organizarea și  
desfășurarea atelierului de instruire**

În scopul consolidării capacităților naționale de laborator în domeniul supravegherii epidemiologice și controlului bolilor transmisibile, precum și al alinierii la standardele internaționale privind secvențierea genomică și analiza bioinformatică, în conformitate cu Hotărârea Guvernului nr. 222/2023 privind aprobarea Planului de acțiuni pentru implementarea Regulamentului Sanitar Internațional (2005) în Republica Moldova pentru perioada 2023–2027, precum și în temeiul Hotărârii Guvernului nr. 148/2021 cu privire la organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății,

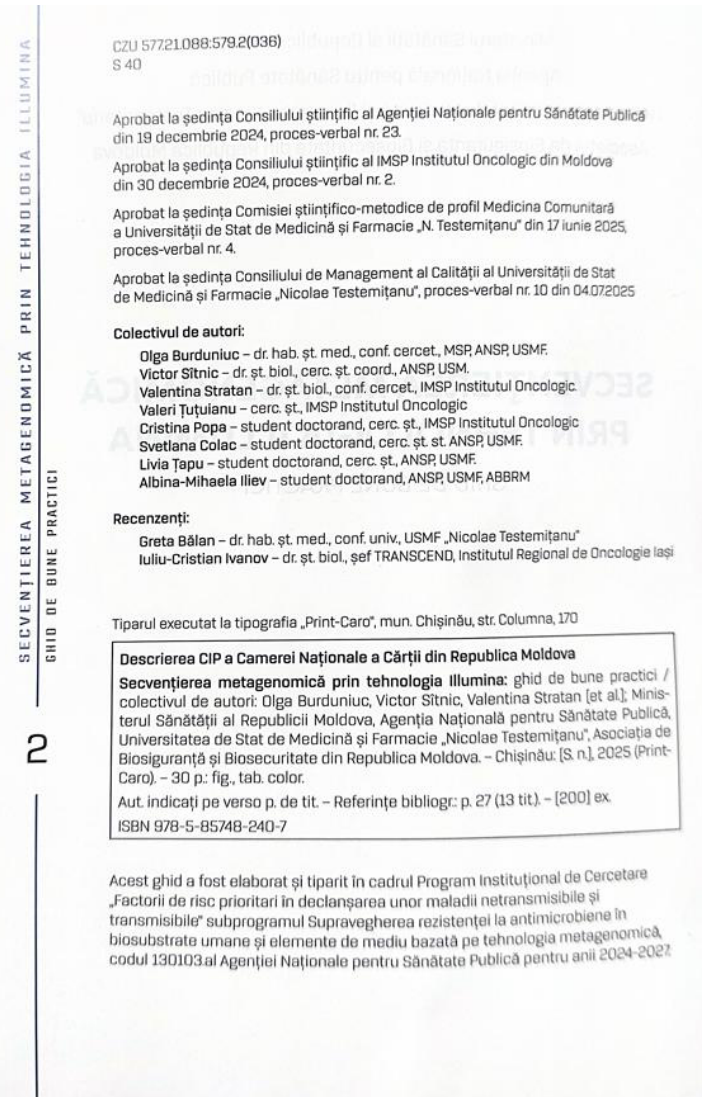
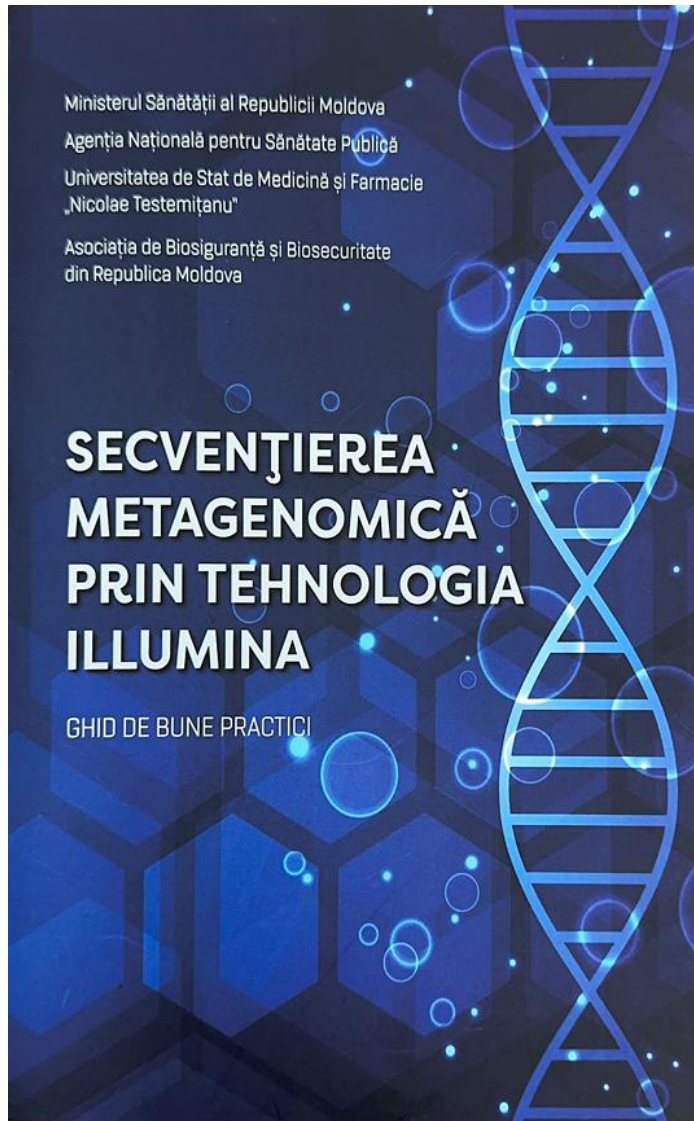
**DISPUN:**

1. A organiza și desfășura în perioada 23–27 iunie 2025, a atelierului regional de instruire PulseNet privind secvențierea genomului bacterian utilizând platforma Illumina MiSeq și analiza bioinformatică, destinat țărilor din Europa de Est și Asia Centrală (EECA), conform anexei nr. 1.
2. A aproba:
  - 1) agenda atelierului de instruire, conform anexei nr. 1;
  - 2) lista participanților la atelier, conform anexei nr. 2.
3. Conducătorii instituțiilor nominalizate vor asigura delegarea pentru participare a colaboratorilor la atelier, conform anexei nr. 2.
4. Directorul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică va asigura buna desfășurare a evenimentului.
5. Cheltuielile aferente organizării și desfășurării atelierului de lucru, vor fi suportate de către organizatori.
6. Controlul executării prezentei dispoziției se atribuie Direcției politice în domeniul sănătății publice și urgențe în sănătatea publică.

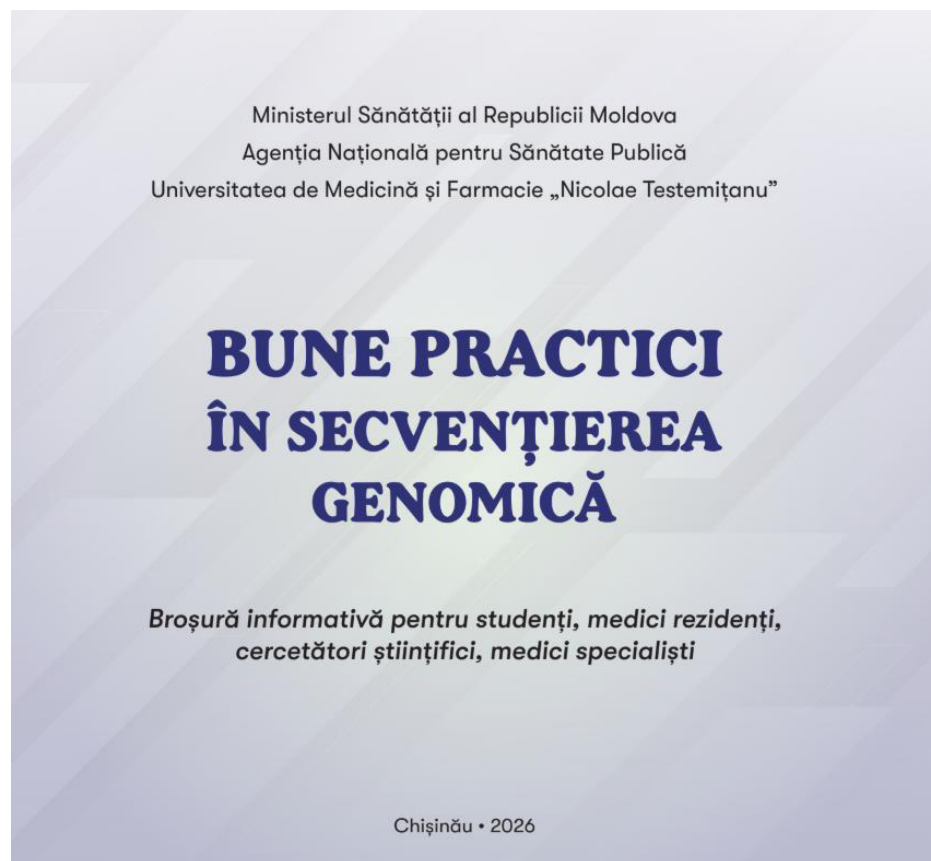
Secretar de stat

Angela PARASCHIV

## Ghid de bune practici “Secvențierea metagenomică prin tehnologia Illumina”, Chișinău, 2025



## Broșură informativă pentru studenți, medici rezidenți, cercetători științifici, medici specialiști: „Bune practici în secvențierea genomică”



**Adeverințe privind înscrierea obiectelor dreptului de autor și ale drepturilor conexe**



Seria: OȘ (operă științifică)  
 Numărul de înscriere: 8230  
 Data înscrierii: 18.06.2025  
 Numărul cererii: 3036  
 Denumirea obiectului: „BIOSIGURANȚĂ, BIOSECURITATE  
 ȘI MANAGEMENTUL RISCULUI BIOLOGIC  
 ÎN LABORATOARE  
 Broșură informativă pentru studenți, medici rezidenți,  
 cercetători științifici, medici specialiști”

**Autori:**  
 Burduniciu Olga IDNP: 0970811427009  
 Colac Svetlana IDNP: 2010025011387  
 Caradja Arina IDNP: 2004015034401  
 Cazacu Agafia IDNP: 2007021023289  
 Ivanova Svetlana IDNP: 2008089006726  
 Iliev Albina-Mihaela CNP: 2800817375205 (România)  
**Titularii drepturilor patrimoniale:**  
 AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ  
 IDNO: 1018601000021  
 Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
 "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova  
 IDNO: 1007600000794

L.S.  Sefă Directie Drept de Autor  
 AGENȚIA DE STAT  
 PENTRU PROPRIETATEA INTELLECTUALĂ  
 A REPUBLICII MOLDOVA  
 ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
 РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА



Seria: OȘ (operă științifică)

Numărul de înscriere: 8362

Data înscrierii: 11.11.2025

Numărul cererii: 3176

Denumirea obiectului: „BUNE PRACTICI ÎN SECVENȚIEREA GENOMICĂ

Broșură informativă pentru studenți, medici rezidenți,  
cercetători științifici, medici specialiști”

Autori:

Burdunuc Olga IDNP: 0970811427009

Chesov Elena IDNP: 2004033031660

Colac Svetlana IDNP: 2010025011387

Racoviță Stela IDNP: 2006035020475

Burlac Veronica IDNP: 2007032027160

Ceban Valeria IDNP: 2010048000751

Ivanova Svetlana IDNP: 2008089006726

Titularii drepturilor patrimoniale:

AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ

IDNO: 1018601000021

Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie

”Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

IDNO: 1007600000794

L.S.  Șefă Direcție Drept de Autor

AGENȚIA DE STAT  
PENTRU PROPRIETATEA INTELLECTUALĂ  
A REPUBLICII MOLDOVA  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА

## Certificate de inovator





Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 6315

Pentru inovația cu titlul  
**METODĂ DE GENERARE A RAPOARTELOR DE ANALIZĂ  
BIOINFORMATICĂ ȘI VIZUALIZARE A DATELOR  
OBTINUTE ÎN URMA DECONVOLUȚIEI VIRALE CU  
ALGORITMUL FREYJA**

Inovația a fost înregistrată pe data de  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**COLAC Svetlana, SÎTNIC Victor, ILIEV Albina -  
Mihaela, APOSTOL Mariana, BURDUNIUC Olga**



Data eliberării 30 Decembrie 2024

  
(Semnătura autorizată)

## Acte de implementare



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII REPUBLICII MOLDOVA  
 INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ  
 INSTITUTUL ONCOLOGIC

str. N. Testemițanu nr. 30 MD-2025, mun. Chișinău  
 Tel. +373 22 852 303  
[www.onco.md](http://www.onco.md); e-mail: anticamera@onco.md

09.01.2026 Nr. 02-04/12

## ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Ghidul de bune practici „Secvențierea metagenomică prin tehnologia Illumina”, Chișinău, 2025.

2. **Autorii:** BURDUNIUC Olga – dr. hab. șt. med., conf. cercet., MSP, ANSP, USMF „Nicolae Testemițanu”; SÎTNIC Victor – dr. șt. biol., cerc. șt. coord., ANSP, USM; STRATAN Valentina – dr. șt. biol., conf. cercet., IMSP Institutul Oncologic; ȚUȚUIANU Valeri – cerc. șt., IMSP Institutul Oncologic; POPA Cristina – doctorand, cerc. șt., IMSP Institutul Oncologic; COLAC Svetlana – doctorand, cerc. șt., ANSP, USMF „Nicolae Testemițanu”; ȚAPU Livia – doctorand, cerc. șt., ANSP, USMF „Nicolae Testemițanu”; ILIEV Albina-Mihaela – doctorand, ANSP, USMF „Nicolae Testemițanu”, ABBRM.

3. **Unde și când a fost implementată** Laboratorul Imunologie și Genetică Moleculară al IMSP Institutul Oncologic, anul 2026.

4. **Rezultatul implementării:** Implementarea ghidului are drept scop consolidarea bazei metodologice și științifice necesare aplicării tehnicilor de secvențiere metagenomică în cadrul laboratorului. Documentul este utilizat ca material de referință pentru înțelegerea principiilor teoretice, a fluxurilor tehnologice și a cerințelor de calitate aferente secvențierii metagenomice prin tehnologia Illumina. Ghidul facilitează standardizarea etapelor preanalitice și analitice care preced secvențierea propriu-zisă, precum și armonizarea procedurilor de pregătire a probelor biologice și de interpretare bioinformatică a datelor obținute în cadrul colaborărilor interinstituționale.

5. **Eficacitatea implementării:** Aplicarea ghidului contribuie la creșterea nivelului de pregătire profesională a personalului de laborator în domeniul genomics și metagenomics, în special în ceea ce privește managementul probelor, controlul calității și înțelegerea etapelor tehnologice ale secvențierii de ultimă generație. Implementarea documentului permite dezvoltarea competențelor necesare pentru participarea laboratorului în proiecte de cercetare și diagnostic desfășurate în parteneriat cu instituții dotate cu platforme de secvențiere, asigurând interpretarea corectă a rezultatelor și integrarea acestora în context clinic și științific în domeniul oncologic. Totodată, ghidul contribuie la crearea cadrului conceptual și metodologic necesar pentru planificarea dezvoltării ulterioare a activităților de secvențiere metagenomică, în condiții de conformitate cu cerințele tehnice și de calitate, prin valorificarea colaborărilor interinstituționale existente.



Director IMSP Institutul Oncologic,  
 dr. șt. med. conf. univ

BALTAGA Ruslan



**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII REPUBLICII MOLDOVA**  
**INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ**  
**INSTITUTUL ONCOLOGIC**

str. N. Testemițanu nr. 30 MD-2025, mun. Chișinău  
Tel. +373 22 852 303  
www.onco.md; e-mail: anticameru@onco.md

09.01.2026 Nr. 02-04/12

**ACTUL DE IMPLEMENTARE**

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Broșura informativă „*Biosiguranță, biosecuritate și managementul riscului biologic în laboratoare*”, 2025.
- 2. Autorii:** BURDUNIUC Olga, dr. hab. șt. med., conferențiar cercetător, USMF „Nicolae Testemițanu”, ANSP; COLAC Svetlana, șef direcție, Agenția Națională pentru Sănătate Publică, doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”; CARADJA Arina, medic specialist, responsabil pe Biosiguranță și Biosecuritate, Agenția Națională pentru Sănătate Publică; CAZACU Agafia, medic rezident, USMF „Nicolae Testemițanu”; IVANOVA Svetlana, medic rezident, USMF „Nicolae Testemițanu”; ILIEV Albina-Mihaela, doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”.
- 3. Unde și când a fost implementată** Laboratorul Analize Medicale (LAM) și Laboratorul Imunologie și Genetică moleculară din cadrul IMSP Institutul Oncologic, anul 2026.
- 4. Rezultatul implementării:** Broșura a fost utilizată ca instrument metodologic și suport științifico-practic în activitatea zilnică a laboratoarelor din cadrul IMSP Institutul Oncologic, contribuind la optimizarea proceselor de lucru care implică manipularea probelor biologice cu potențial oncogen, infecțios și genetic. Implementarea documentului a facilitat armonizarea procedurilor interne cu cerințele actuale privind biosiguranța și biosecuritatea, precum și consolidarea abordării sistemice a managementului riscurilor biologice în activitățile de diagnostic, monitorizare și cercetare de laborator.
- 5. Eficacitatea implementării:** Aplicarea prevederilor broșurii a determinat creșterea nivelului de conformitate a activităților de laborator cu standardele naționale și internaționale în domeniul biosiguranței și biosecurității. Personalul a demonstrat o capacitate sporită de identificare, analiză și control al riscurilor biologice, prin implementarea măsurilor preventive și corective adecvate. Totodată, utilizarea documentului a contribuit la reducerea riscurilor de expunere profesională, la îmbunătățirea condițiilor de muncă și la consolidarea culturii instituționale de siguranță biologică în cadrul IMSP Institutul Oncologic, susținând desfășurarea activităților de diagnostic de laborator și în condiții de maximă securitate și responsabilitate profesională.

Director IMSP Institutul Oncologic,  
dr. șt. med., conf. univ.  
BALTAGA Ruslan





13.01.2025 nr. 01-2/H4

## ACTUL DE IMPLEMENTARE

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Broșură informativă pentru studenți, medici rezidenți, cercetători științifici, medici specialiști „*Bune practici în secvențierea genomică*”, Chișinău, 2025.

2. **Autorii:** BURDUNIUC Olga, dr. hab. șt. med., conf. cercet., USMF „Nicolae Testemițanu”, ANSP; CHESOV Elena, dr. șt. med., asist. univ., cercetător științific, USMF „Nicolae Testemițanu”, ANSP; COLAC Svetlana, șef direcție, Agenția Națională pentru Sănătate Publică, doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”; RACOVITĂ Stela, dr. șt. med., asist. univ., cercetător științific, USMF „Nicolae Testemițanu”; BURLAC Veronica, cercetător științific stagiar, ANSP; CEBAN Valeria, medic specialist, ANSP; IVANOVA Svetlana, medic rezident, USMF „Nicolae Testemițanu”.

3. **Numarul Adeverintei de Drept de autor:** Seria OȘ nr. 8362 din 09.12.2025

4. **Unde și când a fost implementată:** Laboratorul Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei din cadrul IMSP Institutul de Pneumologie „Chiril Draganiuc”, anul 2026.

**Rezultatul implementării:** Broșura este utilizată de medici microbiologi, cercetători, biologi și personal de laborator în activitățile de diagnostic și cercetare, facilitând interpretarea corectă a rezultatelor de secvențiere genomică și integrarea acestora în managementul clinic al pacienților cu tuberculoză și alte infecții respiratorii. Implementarea materialului a permis valorificarea datelor genomice pentru optimizarea strategiilor terapeutice, monitorizarea eficienței tratamentului și consolidarea capacităților instituționale de supraveghere genomică, contribuind la o abordare modernă și fundamentată științific a tuberculozei.

**Eficacitatea implementării:** Aplicarea broșurii în activitatea Laboratorului Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei a consolidat competențele profesionale ale personalului medical și ale specialiștilor de laborator în domeniul diagnosticului molecular și supravegherii epidemiologice a tuberculozei și altor infecții respiratorii. Broșura oferă un cadru metodologic actualizat privind utilizarea secvențierii genomice pentru identificarea agenților patogeni, depistarea mutațiilor asociate rezistenței antimicrobiene și monitorizarea circulației tulpinilor, fiind aliniată standardelor internaționale moderne. Astfel, implementarea sa contribuie la îmbunătățirea calității procesului diagnostic și la întărirea capacității instituționale de răspuns la provocările epidemiologice actuale și emergente.



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ

INSTITUTUL DE PNEUMOLOGIE  
"CHIRIL DRAGANIUC"



MINISTRY OF HEALTH  
PUBLIC MEDICAL SANITARY INSTITUTION

INSTITUTE OF PNEUMOLOGY  
"CHIRIL DRAGANIUC"

MD-2025, Republica Moldova,  
municipiul Chișinău str. Constantin Virnav 13  
tel +373 22 572 200, e-mail [ifp@ms.md](mailto:ifp@ms.md)

MD-2025, Republic of Moldova  
13, Constantin Virnav, street, Chisinau  
tel +373 22 572 200, e-mail [ifp@ms.md](mailto:ifp@ms.md)

13.01.26 nr. 01-2/14

## ACTUL DE IMPLEMENTARE

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Broșura informativă „Biosiguranță, biosecuritate și managementul riscului biologic în laboratoare”, 2025.
- 2. Autorii:** BURDUNIUC Olga, dr. hab. șt. med., conferențiar cercetător, USMF „Nicolae Testemițanu”, ANSP; COLAC Svetlana, șef direcție, Agenția Națională pentru Sănătate Publică, doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”; CARADJA Arina, medic specialist, responsabil pe Biosiguranță și Biosecuritate, Agenția Națională pentru Sănătate Publică; CAZACU Agafia, medic rezident, USMF „Nicolae Testemițanu”; IVANOVA Svetlana, medic rezident, USMF „Nicolae Testemițanu”; ILIEV Albina-Mihaela, doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”.
- 3. Unde și când a fost implementată** Laboratorul Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei din cadrul IMSP Institutul de Pneumologie „Chiril Draganiuc”, anul 2026.
- 4. Rezultatul implementării:** Broșura a fost integrată în activitatea curentă a laboratorului, fiind utilizată ca material de referință de către medici microbiologi, cercetători, biologi, medici rezidenți și personal tehnic de laborator. Documentul a facilitat înțelegerea și aplicarea coerentă a standardelor de biosiguranță și biosecuritate, contribuind la uniformizarea practicilor de lucru, la reducerea riscurilor biologice și la consolidarea capacității instituționale de prevenire a incidentelor și neconformităților în laboratoarele cu risc înalt, inclusiv cele care manipulează *Mycobacterium tuberculosis*.
- 5. Eficacitatea implementării:** Aplicarea broșurii a contribuit la consolidarea competențelor profesionale ale personalului de laborator în domeniul biosiguranței și biosecurității, inclusiv în laboratoarele specializate în microbiologia tuberculozei. Utilizarea acesteia a îmbunătățit capacitatea specialiștilor de a identifica, evalua și gestiona riscurile biologice, prin adoptarea unor proceduri standardizate și a unor metode moderne de management al riscului. Totodată, broșura a favorizat aplicarea consecventă a măsurilor de prevenire a expunerilor accidentale, a incidentelor de laborator și a eliberărilor neintenționate de agenți biologici. Prin promovarea unor practici conforme cu cerințele naționale și internaționale, documentul a contribuit la optimizarea mediului de lucru și la creșterea nivelului de protecție pentru personal. În același timp, a sprijinit dezvoltarea unei culturi instituționale de biosiguranță și biosecuritate, bazată pe responsabilitate profesională, disciplină operațională și respectarea riguroasă a principiilor de lucru în condiții de risc biologic înalt.



Director IMSP Institutul de Pneumologie  
„Chiril Draganiuc”,  
dr. șt. med., conf. univ.  
*[Signature]* Doina RUSU



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ



MD 2028, mun. Chișinău, str. Gh. Asachi 67A, Tel. +373 22 574 501, <https://ansp.md> e-mail: [office@ansp.gov.md](mailto:office@ansp.gov.md) IDNO:1018601000021

Nr. 04-212 din 19.01.2026

### ACTUL DE IMPLEMENTARE

Prin prezenta se confirmă că rezultatele obținute în cadrul elaborării broșurii informative „Biosiguranță, biosecuritate și managementul riscului biologic în laboratoare” (2025), elaborată de Burduniuc Olga, dr. hab. șt. med., conferențiar cercetător, USMF „Nicolae Testemițanu”, ANSP; Colac Svetlana, șef direcție, Agenția Națională pentru Sănătate Publică, doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”; Caradja Arina, medic specialist, responsabil pe Biosiguranță și Biosecuritate, Agenția Națională pentru Sănătate Publică; Cazacu Agafia, medic rezident, USMF „Nicolae Testemițanu”; Ivanova Svetlana, medic rezident, USMF „Nicolae Testemițanu”; Iliev Albina-Mihaela, doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”, sunt implementate în activitatea laboratoarelor Agenției Naționale pentru Sănătate Publică care desfășoară activități de diagnostic, cercetare și supraveghere implicând manipularea microorganismelor cu risc biologic.

Broșura a fost aplicată în cadrul Laboratorului național de referință în infecții imunodirijabile și hepatite virale, Laboratorului național de referință în infecții respiratorii și enterice virale, Laboratorului național de referință în infecții asociate asistenței medicale și rezistența la antimicrobiene, infecții bacteriene și parazitoze, precum și în Laboratorul național de referință în secvențiere genomică din cadrul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică, în anul 2026. Rezultatele obținute cuprind o îmbunătățire continuă a cadrului operațional de biosiguranță și biosecuritate în laboratoarele ANSP, prin creșterea nivelului de conformitate cu cerințele privind evaluarea, prevenirea și controlul riscurilor biologice, standardizarea practicilor de lucru și armonizarea procedurilor interne de management al riscului biologic. Aplicarea broșurii contribuie la reducerea riscului de expuneri accidentale ale personalului, la consolidarea culturii instituționale de siguranță biologică și la îmbunătățirea capacității instituționale de prevenire și gestionare a incidentelor biologice.

Director  Nicolae JELAMSCHI



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ



MD 2028, mun. Chișinău, str. Gh. Asachi 67A, Tel. +373 22 574 501, <https://ansp.md> e-mail: [office@ansp.gov.md](mailto:office@ansp.gov.md) IDNO:101860100021

Nr. 01-213 din 19.01.2026

### ACTUL DE IMPLEMENTARE

Prin prezentul act se confirmă că rezultatele activităților de cercetare și dezvoltare metodologică privind implementarea metodelor de secvențiere genomică a virusului SARS-CoV-2 pentru monitorizarea evoluției genetice și a variantelor circulante au fost aplicate în cadrul Laboratorului virusologic și al Laboratorului Național de Referință în Secvențiere Genomică ale Agenției Naționale pentru Sănătate Publică, la finele anului 2023 și pe parcursul anilor 2024–2025.

Au fost implementate următoarele metode: secvențierea întregului genom al virusului SARS-CoV-2 cu ajutorul secvențiatorului Ion Torrent Genexus (2023); secvențierea genomului virusurilor respiratorii din probe clinice utilizând tehnologia nanopore (2024); monitorizarea genetică a virusului SARS-CoV-2 din probe de ape reziduale prin secvențierea întregului genom (2024–2025).

Rezultatele obținute au contribuit la îmbunătățirea continuă a sistemului de supraveghere moleculară a infecțiilor respiratorii virale, prin obținerea de secvențe genomice complete, cu acuratețe și calitate înaltă, care permit caracterizarea profilului mutațional, analiza filogenetică și monitorizarea dinamicii variantelor virale circulante pe teritoriul Republicii Moldova. Datele genomice generate au constituit un suport esențial pentru fundamentarea deciziilor de sănătate publică, bazate pe dovezi științifice, și pentru adaptarea măsurilor de control și răspuns la evoluția situației epidemiologice..

Director  Nicolae JELAMSCHI



Nr. 00-10/197 din de.09.2026

## ACTUL DE IMPLEMENTARE

(în procesul didactic)

- 1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Broșura informativă „Bune practici în secvențierea genomică”, Chișinău, 2025.
- 2. Autorii:** BURDUNIUC Olga, dr. hab. șt. med., conf. cercet., USMF „Nicolae Testemițanu”, ANSP; CHESOV Elena, dr. șt. med., asist. univ., cercetător științific, USMF „Nicolae Testemițanu”, ANSP; COLAC Svetlana, șef direcție, ANSP, doctorand, USMF „Nicolae Testemițanu”; RACVIȚĂ Stela, dr. șt. med., asist. univ., cercetător științific, USMF „Nicolae Testemițanu”; BURLAC Veronica, cercetător științific stagiar, ANSP; CEBAN Valeria, medic specialist, ANSP; IVANOVA Svetlana, medic rezident, USMF „Nicolae Testemițanu”.
- 3. Unde și când a fost implementată:** Catedra Discipline paraclinice, igiene și epidemiologie, Centrul de excelență în medicină și farmacie „Raisa Pacalo”, 2025.
- 4. Rezultatul implementării:** Implementarea broșurii a contribuit la consolidarea competențelor teoretice și practice ale studenților, familiarizându-i cu principiile secvențierii genomice și cu bunele practici de laborator. Materialul a facilitat înțelegerea rolului tehnologiilor genomice în diagnosticul molecular, supravegherea epidemiologică și gestionarea situațiilor de urgență în sănătatea publică. De asemenea, utilizarea broșurii a sprijinit aprofundarea cunoștințelor privind evoluția virală, importanța monitorizării agenților patogeni și contribuția secvențierii genomice la prevenirea bolilor infecțioase.
- 5. Eficacitatea implementării:** Materialul informativ prezentat în broșură reprezintă un suport educațional valoros, utilizat eficient atât în activitățile teoretice, cât și în cele practice. Acesta a sprijinit dezvoltarea competențelor în biologie moleculară, diagnostic molecular și aplicarea tehnologiilor moderne de secvențiere genomică. Totodată, broșura a stimulat interesul și motivația profesională a studenților în domeniile microbiologiei moleculare,

epidemiologiei genomice și sănătății publice, contribuind la formarea viitorilor specialiști capabili să se implice în diagnosticul maladiilor cauzate de agenți patogeni emergenți, rezistenți la antimicrobiene și implicați în situații epidemiologice complexe.

**Directoare adjunctă pentru instruirea practică,  
administrator CEMF „Raisa Pacalo”**



**Tatiana CRITCHI**

Diplome



The Innovation is our Future



17<sup>EDITION</sup>

# EUROINVENT

EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INNOVATION



with the support of



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII  
AUTORITATEA NAȚIONALĂ PENTRU CERCETARE

# DIPLOMA

www.euroinvent.org

Method for generating bioinformatics analysis reports and visualizing data  
obtained following viral deconvolution with the Freyja algorithm

Colac Svetlana, Sitnic Victor, Iliev Albina-Mihaela,  
Apostol Mariana, Burduniuc Olga



# BRONZE MEDAL

Iași, Romania: May 8-10, 2025

President of International Jury  
Prof.Dr.Eng.  
Mohd Mustafa Al-Bakri ABDULLAH

President of Scientific Committee  
Prof.Dr. Ion SANDU



SARDELE S. POPA UNIVERSITY OF  
MEDICINE AND PHARMACY



RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER

**Healthy Vibe**

HOLISTIC TREATMENT



# Certificate of Excellence

AWARDED TO

*Colac Svetlana, Sitnic Victor, Mico Albina -  
Mihaela, Apostol Mariana, Burdunescu Olga*

For

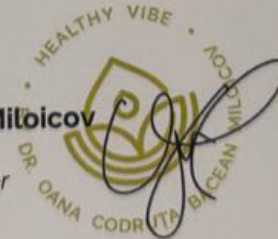
*Metoda de generare a rapoastelor de analiza  
bioinformatica si vizualizare a datelor obtinute  
in urma dezvoltarii vizuale cu algoritmul Freyja*

On the occasion of the EUROINVENT International Exhibition, 17<sup>th</sup> edition, May 8-10, Iasi - Romania

President,

**Oana Codruța Băcean Mîlbicov**

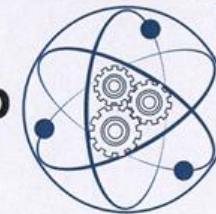
Senior Lecturer MD, PhD  
Medical Management Director



healthyvibe.ro



**International Salon of Invention  
and Innovative Entrepreneurship**



**GOLD MEDAL**

*is awarded to Mrs/Mr*

**COLAC Svetlana, SÎTNIC Victor, ILIEV Albina-Mihaela, APOSTOL  
Mariana, BURDUNIUC Olga**

**Institution: National Agency for Public Health**

for participation in the **International Salon of Invention and Innovative Entrepreneurship**  
at the category **Entrepreneurship innovation** with the paper:

**Method for generating bioinformatics analysis reports and visualizing data  
obtained from viral deconvolution with the FREYJA algorithm.**

**June 6-7, 2025, Chişinău**



Rector

**BARBĂNEAGRĂ Alexandra**

President of ISIIE

**COROPCEANU Eduard**

Expoziția Internațională Specializată

# „INFOINVENT”

Ediția a XIX-a

## DIPLOMĂ

### MEDALIA DE AUR

se acordă

BURDUNIUC Olga, CHESOV Elena, COLAC Svetlana, RACoviȚĂ Stela,  
BURLAC Veronica, CEBAN Valeria, IVANOVA Svetlana

pentru

BROȘURA INFORMATIVĂ „BUNE PRACTICI ÎN  
SECVENȚIEREA GENOMICĂ”

Eugeniu RUSU,  
Președintele  
Comitetului organizatoric

Ion TIGHINEANU,  
Președintele Juriului

3-5 decembrie 2025,  
Chișinău, Republica Moldova

## LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE ȘI ȘTIINȚIFICO-METODICE

- **Articole în reviste științifice peste hotare:**

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

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](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](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. *Akadosmos*. 2024;(2):84-90. doi:10.52673/18570461.24.2-73.08. <https://akadosmos.asm.md/index.php/akadosmos/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](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](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](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](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](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](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](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 algoritmul 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.

• **Protocole clinice publicate:**

33. Tiberiu H., PLĂCINTĂ G., BÎRCA L., Cojocaru S., Paraschiv A., Curocichin G., Rusu G., Cornilova S., Știrbu T., Șalaru V., Gîțu L., Friptu V., Hodorogea S., Marian-Pavlenko A., Iarovoii L., Chihai J., Crivceanscaia L., Rotaru D., Rusu L., Palii I., Burduniuc O., **Colac S.**, Druc A., Diaconu N., Spătaru D. Infecția cu coronavirus de tip nou (COVID-19), Protocol Clinic Național (ediția IX), PCN-371, 2024.

## Declarația privind asumarea răspunderii

Prin prezenta, subsemnata, Colac Svetlana declar pe propria răspundere, că teza de doctor în științe medicale cu tema “*Diversitatea genotipică a SARS-CoV-2 în perioada pandemică și postpandemică timpurie*” este elaborată de către mine personal, materialele prezentate sunt rezultatele propriilor cercetări, nu sunt plagiate din alte lucrări științifice și nu a mai fost prezentată la o instituție de învățământ superior din țară sau străinătate.

De asemenea, declar că toate sursele utilizate, inclusive din Internet, sunt indicate în teza de licență, cu respectarea regulilor de evitare a plagiatului:

- ✓ toate fragmentele de text reproduse exact, chiar și în traducere proprie din alta limbă, sunt scrise cu referința asupra sursei originale;
- ✓ reformularea în cuvinte proprii a textelor altor autori deține referința asupra sursei originale;
- ✓ rezumarea ideilor altor autori deține referința exactă la textul original;
- ✓ metodele și tehnicile de lucru preluate din alte surse dețin referințe exacte la sursele originale.

Data 02.07.2020

Doctoranda Svetlana Colac  
(Prenume Nume)

  
(Semnătura)

Conducător de doctorat Burdumie Olga  
(Prenume Nume)

  
(Semnătura)

## 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 (189) titluri, 12 anexe, 94 pagini de text de bază, 8 tabele și 42 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.

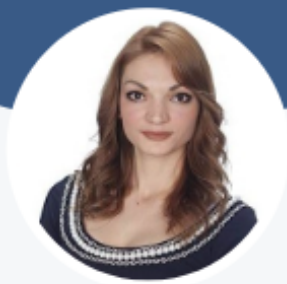
**Implementation of scientific results.** The research findings were implemented through the development of a guide on metagenomic sequencing, preparation of a monograph on nucleic acid sequencing, update of the National Clinical Protocol on COVID-19, and use of the results in healthcare institutions,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

## Curriculum Vitae

Svetlana Colac



### Date personale

- Svetlana Colac
- svetlana.colac@ansp.gov.md
- +37368106350
- Chișinău, str. Cetatea Albă  
143/2  
MD-2002 Chișinău
- 23 Iunie 1992
- Feminin
- moldoveană

### Competențe

- Microsoft Office
- Microsoft Excel
- Microsoft office word
- Utilizare buna a programelor de comunicare(mail messenger skype)
- Microsoft PowerPoint
- Buna Utilizare a PC
- Competențe de comunicare și interpersonale
- Abilitați de conlucrare profesională adecvate
- activitate în echipă
- planificare

### Educație

- Diplomă de Bacalaureat** 1999 - 2011  
Liceul Teoretic Rus "A. S. Pușkin"
- Licențiat în medicină** 2011 - 2017  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "N. Testemițanu"
- Diploma de medic specialist** 2017 - 2019  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "N. Testemițanu"
- Școala doctorală în domeniul Științe medicale** Nov. 2022 - Prezent  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "N. Testemițanu"

### Experiență profesională

- Medic specialist** Oct. 2019 - Dec. 2024  
Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Chișinău, Moldova
- Șefă direcție** Ian. 2025 - Prezent  
Agenția Națională pentru Sănătate Publică, Chișinău, Moldova

### Cursuri

- Diagnosticul de laborator a poliomielitei privind utilizarea metodei PCR în detecția și identificarea poliovirusului** Ian. 2020
- Utilizarea metodei PCR în detectarea polimorfismului uninucleotidic specific (SNP) pentru identificarea variantelor SARS-CoV-2** Mart. 2021
- Instruirea QIASymphony SP Sample & Assay Technologies** Sept. 2020
- Biosafety and Biosecurity Course for national influenza centres and respiratory virus laboratories** Sept. 2021
- COVID-19 diagnostic QMS workshop** Oct. 2021
- Utilizarea secvențiatorului de ultima generația Ion Torrent Genexus Integrated Sequencer** Nov. 2021
- Instruirea privind implementarea tehnicilor de biologie moleculară (RT-PCR) pentru testarea COVID-19** Mart. 2022
- Mobile Laboratory Training Session** Iul. 2022
- Strengthening epidemiological surveillance capacity to address COVID-19 and other epidemics** Sept. 2022
- Molecular variant typing of SARS-CoV-2** Sept. 2022

organizare	SARS-CoV-2 wastewater surveillance	Oct. 2022
coordonare	Instruire in domeniul managementului calității în laborator (conform ISO 15189)	Nov. 2022
instruire		
control	Workshop on Biosafety and Biosecurity for National Influenza Centres and respiratory virus laboratories, 14-18 noiembrie 2022, Tbilisi, Georgia	Nov. 2022
cunoașterea calculatorului		
comunicare eficientă		
Respect față de oameni	Terra.bio Bioinformatics and Genomic Epidemiology Training	Mart. 2023
receptivitate față de idei noi	WHO Regional Office for Europe and European Centre for Disease Prevention and Control Joint Annual Hybrid European Influenza and COVID-19 Surveillance Meeting, 31 May – 2 June 2023, Copenhagen, Denmark	Iun. 2023
tendință spre perfecționare profesională continuă		
punctuabilitate		
colegialitate		
obiectivitate	International Influenza and SARS-CoV-2 Genomic Sequencing Course, 21-25 August 2023, Institut Pasteur, Paris, France	Aug. 2023
respectarea disciplinei și eticii profesionale	Participation in the training on updated quality standards for method validation in microbiology of the food chain and for clinical microbiology, organized by the WHO Regional Office for Europe, 23 noiembrie 2023, Chișinău, Republica Moldova	Nov. 2023
<b>Limbi străine</b>		
rusă		
română	WHO, WOAHA and UNEP joint sub-regional workshop on public health surveillance and control of zoonotic influenza and SARS-CoV-2 at the human-animal interface for the Western Balkans, Moldova and Türkiye, 28-30 noiembrie 2023, Istanbul, Turcia	Nov. 2023
engleză	Atelierul de instruire cu referire la implemmentarea tehnicii de secvențiere de nouă generație SBS (Illumina MiSeq) cu suportul Biroului de țară al OMS, 21 decembrie 2023, Chișinău, Republica Moldova	Dec. 2023
	Atelierul de instruire "Tehnici de lucru pe metoda PCR în timp real", 21-22 decembrie 2023, Chișinău, Republica Moldova	Dec. 2023
	Training course: "Whole genome sequencing analysis training", 15-19 aprilie 2024, Danemarca, Copenhaga	Apr. 2024
	SARS-CoV-2 ONT Sequencing and Analysis Training as Part of the Genomic Surveillance Community of Practice within Eastern Europe and Central Asia (EECA) Region, 29 iulie – 02 august 2024, Tbilisi, Georgia	Aug. 2024

## Realizări

---

- BURDUNIUC O., BĂLAN G., SOFRONIE O., PLĂCINTĂ G., BÎRCA L., SERBENCO L., JURAVLIOV T., ȚURCAN L., APOSTOL M., CATARAGA A., COLAC S., Diagnosticul difteriei și altor infecții asociate: Ghid. Chișinău, 2023, 64 p. ISBN 978-9975-82-349-4
- Tiberiu H., PLĂCINTĂ G., BÎRCA L., Cojocaru S., Paraschiv A., Curocichin G., Rusu G., Cornilova S., Știrbu T., Șalaru V., Gîțu L., Friptu V., Hodorogea S., Marian- Pavlenco A., Iarovoi L., Chihai J., Crivceascaia L., Rotaru D., Rusu L., Palii I., Burduniuc O., Colac S., Druc A., Diaconu N., Spătaru D. Infecția cu coronavirus de tip nou (COVID-19), Protocol Clinic Național (ediția IX), PCN-371, 2024
- 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.
- 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.
- 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
- Burduniuc O., Chesov E., Colac S., Racoviță S., Burlac V., Ceban V., Ivanov S. Broșură informativă: Bune practici în secvențierea genomică. Drept de autor (în proces de aprobare).

## Avizul comitetului de etica

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL REPUBLICII MOLDOVA



MINISTRY OF HEALTH  
OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA

UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ  
ȘI FARMACIE „NICOLAE TESTEMIȚANU”  
DIN REPUBLICA MOLDOVA

NICOLAE TESTEMIȚANU STATE UNIVERSITY  
OF MEDICINE AND PHARMACY  
OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA

MD-2004, Chișinău, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, tel.: (+373) 22 205 701, fax: (+373) 22 242 344, contact@usmf.md, https://usmf.md

20.09.2023 nr. 1

la nr. 22 din 30.03.2023

### Aviz favorabil al Comitetului de Etică a Cercetării

La proiectul științific de doctorat cu titlul: „Monitorizarea infecției COVID-19 prin secvențierea întregului genom și analiza filogenetică a izolatelor SARS-CoV-2”, solicitantă: **Colac Svetlana**; conducător științific: BURDUNIUC Olga, dr. șt. med., conf. cercet., șef direcție, Direcția Diagnostic de Laborator, Agenția Națională de Sănătate Publică

Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu”, examinând la ședința din 12 septembrie 2023 următoarele documente:

1. Formularul de solicitare pentru evaluare etică a cercetării;
2. Extrasul din procesul verbal al subdiviziunii;
3. Protocolul cercetării;
4. Adnotarea temei;
5. Formularul de informare a participantului la studiu;
6. Formularul de acceptare (acordul informat al participantului la studiu);
7. Angajamentul de confidențialitate;
8. CV-ul solicitantei;
9. CV-ul conducătorului științific,

a decis că proiectul de cercetare „Monitorizarea infecției COVID-19 prin secvențierea întregului genom și analiza filogenetică a izolatelor SARS-CoV-2” corespunde exigențelor etice.

Lista nominală a membrilor Comitetului de Etică a Cercetării prezenți în ședință: Gavriluc Mihail, Paladi Adriana, Caproș Nicolae, Teaciuc Eugen, Dumbrăveanu Ion, Casian Dumitru, Raba Tatiana, Calalb Tatiana, Ojovan Vitalie, Foca Ecaterina, Guțu Luminița, Gramma Rodica, Mostovei Andrei.

Președintele  
Comitetului de Etică a Cercetării  
dr. hab. șt. med., prof. univ.

Gavriluc Mihail

IMPORTANT! Vă atenționăm că, în caz de inițiere a unor modificări în design-ul cercetării, în special în metodologie și în procedura recrutării, selectării, informării și siguranței participanților la cercetare, prezentul Aviz nu este valabil, iar cercetătorul urmează să aplice proiectul de cercetare modificat pentru evaluare repetată din partea Comitetului de Etică a Cercetării, înainte de a aplica în practică modificările respective.