

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris
C.Z.U:616.98:578.834.1:612.017.1:579(043)

ULINICI Mariana

**EVOLUȚIA MOLECULARĂ A SARS-CoV-2 ȘI RĂSPUNSUL
IMUN UMAN LA INFECȚIE**

313.02 MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Chișinău, 2023

Teza a fost elaborată la Departamentul Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" și Laboratorul de Virusologie Moleculară, ICGEB, or. Trieste, Italia

Conducător științific:

Rudic Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., academician al AȘM, Om Emerit

Conducător prin co-tutelă:

Marcello Alessandro, PhD

Membrii comisiei de îndrumare:

Vorojbit Valentina, dr. șt. med.

Pogianella Monica, PhD

Petrovec Miroslav, dr. șt. med., prof.univ.

Susținerea va avea loc la *24 august 2023, ora 14:00*, 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 28.06.2023 (*proces verbal nr.12*).

Componenta Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

Holban Tiberiu,

dr. hab. șt. med., prof. univ.

Membrii:

Spătaru Diana,

dr. șt. med., conf. univ.

Rudic Valeriu,

dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad. al AȘM

Marcello Alessandro,

Ph.D., lider de grup,

ICGEB, or. Trieste, Italia

Referenți oficiali:

Petrovec Miroslav,

dr. șt. med., prof. univ.,

Universitatea din Ljubljana, Slovenia

Bălan Greta,

dr. hab. șt. med., conf. univ.

Burduniuc Olga,

dr. șt. med., conf. cercet.

Autor

Ulinici Mariana

semnătura

© Ulinici Mariana, 2023

CUPRINS

1. ÎNȚELEGEREA BIOLOGIEI ȘI A STRATEGIILOR DE DIAGNOSTIC ALE SARS-CoV-2	
2. MATERIALE ȘI METODE	8
3. VARIANTE GENOMICE ȘI ANALIZA FILOGENETICĂ A SECVENȚELOR SARS-COV-2 DIN REPUBLICA MOLDOVA	9
4. CARACTERIZAREA RĂSPUNSULUI IMUN UMORAL AL PERSOANELOR VACCINATE CU SINOPHARM (BBIBP-CORV) ȘI CONVALESCENȚILOR COVID-19 DIN REPUBLICA MOLDOVA	10
4.1. Generarea lentivirusului pseudotipat SARS-CoV-2	10
4.2. Titrarea lentivirusului SARS-CoV-2	10
4.3. Nivelul anticorpilor neutralizanți anti SARS-CoV-2 după infecția naturală sau în urma vaccinării	11
4.4. Compararea nivelurilor de anticorpi IgG specifici SARS-CoV-2 RBD la persoanele vaccinate și la pacienții convalenței testate prin ELISA	12
4.5. Corelația dintre nivelul anticorpilor neutralizanți și IgG anti-RBD SARS-CoV-2	13
CONCLUZII	18
RECOMANDĂRI	18
BIBLIOGRAFIE	19
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE	22

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei cercetate

Coronavirusul sindromului respirator acut sever 2 (SARS-CoV-2) a apărut în Wuhan, China, în decembrie 2019 și s-a răspândit rapid la nivel global, cauzând pandemia de COVID-19 [1]. Pandemia a avut un impact semnificativ asupra sănătății și economiei globale. Până la data de 11 martie 2023, pandemia a provocat peste 760,4 milioane de cazuri confirmate și 6,8 milioane de decese la nivel global [2]. Pe parcursul pandemiei, virusul SARS-CoV-2 a suferit mutații și au apărut mai multe variante de îngrijorare (VOC). Aceste variante pot avea caracteristici diferite, cum ar fi o transmisibilitate crescută, o virulență mai mare sau potențiala rezistență la imunitatea dobândită prin infectare naturală sau prin vaccinare. Dintre variantele de îngrijorare menționate, primele variante Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1) și Delta (B.1.617.2) au fost inițial identificate în diferite țări și au devenit îngrijorătoare din cauza caracteristicilor lor. Ulterior, a fost identificată o nouă variantă numită Omicron (B.1.1.529, BA.2, BA.4, BA.5). Această variantă a apărut pentru prima dată în Africa de Sud și a atras atenția comunității internaționale din cauza numărului mare de mutații pe care le conține [3,4].

Înțelegerea evoluției moleculare a SARS-CoV-2 și a răspunsului imun uman la infecție este esențială pentru dezvoltarea unor strategii eficiente de combatere a virusului și de protejare a sănătății publice [5,6].

Secvențierea genomică permite monitorizarea în timp real a dinamicii transmiterii virale prin identificarea clusterelor de infecții și corelarea acestora cu datele clinice și epidemiologice relevante [7,8]. Aceste date sunt esențiale pentru informarea în timp util a autorităților de Sănătate Publică cu privire la apariția noilor variante de îngrijorare, permițând adoptarea unui răspuns eficient [9].

Pe data de 7 martie 2020, în Republica Moldova, a fost înregistrat primul caz confirmat de infecție cu virusul SARS-CoV-2 [10,11]. Într-o lună, numărul persoanelor infectate a crescut la 965, cu 854 de cazuri transmise local și 111 importate [11,12]. Până în prezent (17 iulie, 2023), au fost confirmate 620.758 de cazuri de COVID-19 și 12.124 de decese [13].

Este tragic că pandemia COVID-19 a provocat atât de multe pierderi de vieți omenești în întreaga lume, inclusiv în Republica Moldova. Dezvoltarea vaccinurilor și a medicamentelor antivirale, precum și utilizarea anticorpilor umani neutralizanți (nAbs), toate sunt strategii esențiale pentru combaterea virusului [14].

În martie 2021, 2000 de doze de vaccin Sinopharm au fost donate Republicii Moldova, care au fost administrate exclusiv studenților și profesorilor de la Universitatea de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu [15].

În timp ce campaniile de vaccinare sunt importante în prevenirea răspândirii COVID-19, este încă nevoie de soluții terapeutice eficiente [16] pentru tratarea persoanelor care au fost deja infectate cu virusul, în special a celor care prezintă un risc mai mare de a dezvolta o boală severă.

Rezultatele preliminare ale unor studii clinice au arătat că utilizarea anticorpilor neutralizanți umani care țintesc domeniul de legare a receptorului (RBD) ACE2 al virusului SARS-CoV-2 poate reduce severitatea bolii și poate accelera recuperarea pacienților cu COVID-19 [17,18]. Terapia cu plasmă convalescentă s-a dovedit a fi promițătoare în tratamentul pacienților cu COVID-19 în stare critică [19]. De asemenea, FDA a recomandat plasma convalescentă cu un titru de anticorpi neutralizanți mai mare de 1:160 să fie folosită pentru transfuzii terapeutice [20]. Cu toate acestea, utilizarea plasmei convalescente este limitată de disponibilitatea donatorilor cu niveluri ridicate de anticorpi neutralizanți.

Testele serologice care detectează anticorpii neutralizanți anti SARS-CoV-2 sunt esențiale pentru monitorizarea eficacității vaccinurilor și pentru identificarea persoanelor care pot fi încă sensibile la virus. Astfel de teste pot fi, de asemenea, utilizate pentru a identifica persoanele care ar fi putut dezvolta anticorpi neutralizanți după ce au fost infectate cu SARS-CoV-2.

Testele de neutralizare sunt considerate standardul de aur [21] pentru măsurarea activității antivirale a anticorpilor, inclusiv a celor neutralizanți, împotriva SARS-CoV-2. Cu toate acestea, efectuarea testelor de neutralizare cu virusul viu SARS-CoV-2 necesită utilizarea unor instalații de izolare de nivel 3 de biosecuritate (BSL-3) [22], care pot fi costisitoare și dificil de accesat. În plus, manipularea virusurilor vii necesită personal foarte bine pregătit [15] și protocoale stricte de siguranță pentru a preveni expunerea accidentală. Pentru a depăși această limitare, au fost dezvoltate virusuri pseudotipizate ca alternative la virusurile infecțioase [21,23,24]. Aceste virusuri permit testarea sigură și eficientă a plasmei sau a serului donatorilor pentru a determina capacitatea lor de a inhiba infecția cu virusuri și pot fi manipulate în condiții de siguranță în laboratoarele de nivel 2 de biosecuritate (BSL-2), ceea ce le face mai accesibile și mai ușor de utilizat în mediul de cercetare [24,25].

Scopul acestei cercetări a fost de a investiga evoluția moleculară a SARS-CoV-2 și de a studia răspunsul imun umoral al beneficiarilor vaccinului Sinopharm (BBIBP-CorV) și al donatorilor de plasmă convalescentă COVID-19 din Republica Moldova.

Obiective de cercetare:

1. Izolarea ARN-ului SARS-CoV-2 din tampoane nazofaringiene, secvențierea completă a genomului izolatelor cu încărcătură virală ridicată, identificarea variantelor genomice și analiza filogenetică a secvențelor SARS-CoV-2.
2. Evaluarea titrurilor de neutralizare a virusului în probe de la donatorii de plasmă convalescentă COVID-19 și din serul persoanelor vaccinate.
3. Evaluarea titrului IgG anti-Spike RBD la donatorii de plasmă convalescentă și în serul persoanelor vaccinate.
4. Studiarea corelației dintre activitatea de neutralizare și titrurile de anticorpi IgG anti-Spike RBD în rândul persoanelor convalescente și vaccinate.

Metodologia de cercetare:

Metodologia de cercetare pentru acest studiu a implicat secvențierea completă a genomului a 25 de izolate SARS-CoV-2 de la pacienți cu diferite forme clinice și din diferite regiuni geografice ale Republicii Moldova. Izolatele au fost selectate din Biobanka laboratorului ALFA Diagnostica pe baza unui Angajament de confidențialitate, folosind rapoarte RT PCR cu o valoare Ct mai mică de 30. ARN-ul viral a fost izolat prin metoda RT PCR în laboratorul Alfa Diagnostica. Probele cu posibile mutații noi au fost prioritizate pentru a fi secvențiate. După izolarea ARN-ului, probele au fost conservate la -80°C și trimise la Laboratorul de Virusologie Moleculară, ICGEB, or. Trieste, Italia, unde s-a efectuat secvențierea completă a genomului. Ulterior, au fost create metadate, iar rezultatele au fost încărcate în depozitul internațional GISAID. Au fost analizate mutații ale fiecărui izolat individual și a fost efectuată o analiză filogenetică pentru a înțelege istoria evolutivă a virusului în această regiune. De asemenea, a fost realizată analiza filogenetică a 542 secvențe genomice SARS-CoV-2 din Republica Moldova, încărcate în repozitoriul internațional GISAID până la data de 26.05.2022.

În plus față de secvențierea genomului, a fost dezvoltat și produs un lentivirus pseudotipizat SARS-CoV-2 și două teste de neutralizare, unul folosind citometrie de flux și altul folosind microscopia cu conținut ridicat, pentru a investiga eficacitatea activității de neutralizare. Un test ELISA RBD a fost, de asemenea, dezvoltat pentru a studia nivelul anticorpilor IgG anti-

Spike RBD la persoanele vaccinate cu Sinopharm și la pacienții convalescenți. Plasma convalescentă a fost prelevată de la biobanka Centrului Național de Transfuzie a Sângelui, iar probele de ser au fost prelevate de la persoanele vaccinate. Toate probele au fost conservate la -80°C, anonimizate și trimise la laboratorul de virusologie moleculară, ICGEB, or. Trieste, Italia, unde fiecare probă a fost testată pentru a evalua titrul de anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 RBD și titrul de anticorpi neutralizanți.

Rezultatul acestei cercetări.

Având în vedere pandemia de COVID-19 în curs de desfășurare, problema cercetării acestui studiu este de cea mai mare importanță. Noutatea științifică a acestui proiect constă în secvențierea și analiza filogenetică a virusului SARS-COV-2 din Republica Moldova, care poate oferi perspective valoroase asupra evoluției și răspândirii virusului în regiune. În plus, dezvoltarea unui lentivirus SARS-CoV-2 pseudotipizat, două teste de neutralizare și testul ELISA RBD pot ajuta la studierea răspunsului imun umoral și a eficacității vaccinurilor împotriva virusului SARS-CoV-2, cât și al altor virusuri emergente.

În general, această cercetare poate contribui la dezvoltarea unor instrumente mai bune pentru analiza serurilor și la o mai bună înțelegere a răspunsului imun la infecția cu SARS-COV-2 și la vaccinare, care pot ajuta în cele din urmă la controlul și gestionarea pandemiei de COVID-19 precum și de a fi pregătiți să răspundem la o eventuală pandemie viitoare.

În plus, rezultatele obținute în urma acestui studiu pot ajuta, la identificarea potențialelor persoane care pot necesita doze de rapel ale vaccinului sau care pot avea un răspuns imun mai slab la virus. Acest lucru poate contribui la adaptarea strategiilor de vaccinare și la asigurarea unei mai bune protecții împotriva COVID-19.

Studiul a fost **recenzat și aprobat** de Comisia de Etică a Cercetării a Universității de Stat de Medicină și Farmacie *Nicolae Testemițanu* (Protocolul nr. 3/24.01.22).

Cercetarea a fost realizată la Departamentul de Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu, Chișinău, Republica Moldova; Laboratorul ALFA de Diagnostica din Republica Moldova; Laboratorul de Virusologie Moleculară, ICGEB, Trieste, Italia.

Aprobarea rezultatelor științifice

Rezultatele cercetării au fost prezentate, discutate și aprobate în cadrul mai multor foruri științifice naționale și internaționale: Research results have been presented, discussed and approved at several national and international scientific forums: *Workshop "Strengthening epidemiological surveillance capacity to address COVID-19 and other epidemics"*, A Republic of Moldova-Italy cooperation, Online event, 21-23 September 2021; *1st edition of the National Conference with International participation the One Health approach in a Changing World*, Online, 4-5 November, 2021; *Simpozionul Național: "110 ani de la nașterea savantului George Emil Palade, tradiție și continuitate în cercetarea medicală românească"*. Târgu Mureș, România, 7-8 December, 2022; *XV International Summer School "Biology, Biotechnology and Biomedicine"*, Odesa, Ukraine, 29 June -10 July, 2020; *Noaptea Cercetătorilor Europeni 2020*. 15 November, 2020; *Virus Detection and Biosecurity - A Capacity-Building Course in the Framework of Article X of the BWC*. Trieste Italy, 14-16 June, 2023; *Tendințe actuale și provocări în medicina preventivă*. Chișinău, Republica Moldova, 8-9 June, 2023; *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”* din Republica Moldova, Chișinău, 21-23 October, 2020; *Masa rotundă organizată între AȘM și USMF*. <https://usmf.md/ro/noutati/cercetatorii-usmf-nicolae-testemitanu-vin-cu-noi-date-privind->

evolutia-covid-19-tara, Online, 04 September, 2020; *Medtraining-ul organizat de ASRM Asociația Studenților și Rezidenților în Medicină din Moldova USMF*. Facebook, 26 November, 2020; Atelier de lucru: Strategii de diagnostic și prevenire a infecției COVID-19. online. 09 February, 2021; *Interviu ICGEB*: https://www.youtube.com/watch?v=Ve_6DXFZ8sM; *Emisiune radio Spatiul Public* 23.09.2020. ora 10.15; *Emisiune radio, Radio Vocea Speranței*. Facebook 24.11.2020, Mariana Ulinici - Covid 19 – provocarea anului 2020 - YouTube, 24 November, 2020; *Dialoguri interactive între cercetători în cadrul evenimentului Noaptea Cercetătorilor Europeni 2020*. https://usmf.md/ro/noutati/noaptea-cercetatorilor-europeni-la-chisinau?fbclid=IwAR2OzEgIZsa_bqTAPlnEOFyfZmh2exjixQEZSMir-juS4j6ifOxY81vjEPA; *Noaptea Cercetătorilor Europeni 2020* (privesc.eu) minutul -5:04:50, 27 November, 2020; *Emisiunea „Concret” despre vaccinurile anti-COVID și maratonul vaccinării*”, TV Moldova1, 24 mai la 17:15 . 24 May, 2021; *Emisiunea „Miezul Zilei”*, TV Moldova1, 26 septembrie, 2021. <https://www.facebook.com/teleradiomoldova/videos/395699578798680>, 26 September, 2021; *Emisiunea „Fii sănătos cu Maria Marian”*, Jurnal TV, 22.11.21, ora 18:00 <https://www.facebook.com/watch/?v=183617873984484&ref=sharing>, 22 November, 2021; *Interviu Sănătate Info: Sănătate Info - Mariana Ulinici, doctorand: „Sunt pasionată de acest domeniu. Lucrul cu virusurile, cu bacteriile, cu microorganismele care se analizează la microscop mă face să meditez”* (sanatateinfo.md); Mesager TV Moldova 1, minutul 5:40. https://fb.watch/aSBGXOXW_6/ <https://trm.md/ro/social/noi-metode-de-diagnostic-pentru-virusul-sars-cov-2>; Emisiunea: Pro sănătate: <https://youtube.com/playlist?list=PLX...> Radio Vocea Speranței Republica Moldova | Facebook, ora 18:00, 23 June, 2022.

Publicații la tema tezei

Au fost publicate un număr total de 15 publicații științifice, printre care 4 articole publicate în reviste de prestigiu ISI și SCOPUS, 2 articole în reviste științifice naționale categoria B și 9 teze prezentate la conferințe științifice naționale și internaționale.

Cuvinte cheie: Evoluția moleculară a SARS-CoV-2, răspuns imun, mutații, variante, filogenie, anticorpi neutralizanți.

CONȚINUTUL TEZEI

1. ÎNȚELEGEREA BIOLOGIEI ȘI A STRATEGIILOR DE DIAGNOSTIC ALE SARS-CoV-2

Capitolul analizează biologia virusului SARS-CoV-2 și strategiile de diagnostic asociate. În primul rând, se discută despre taxonomia și epidemiologia virusului SARS-CoV-2, urmată de organizarea genomică a acestuia. Un aspect important este analizat în detaliu, glicoproteina S (Spike) a virusului, inclusiv structura acesteia și domeniul de legare la receptor. De asemenea, se menționează varianta D614G și varianta Omicron a virusului.

În continuare, se examinează răspunsul imun umoral în infecția cu SARS-CoV-2. Se prezintă strategiile utilizate pentru diagnosticul infecției cu SARS-CoV-2, cu accent pe rolul și provocările testelor serologice. Un aspect important al strategiilor de diagnostic este detectarea anticorpilor neutralizanți. Aceste teste permit evaluarea capacității anticorpilor de a neutraliza virusul, fiind utilizate pentru evaluarea eficacității vaccinurilor sau a terapiei cu plasmă convalescentă. Se evidențiază importanța și problemele nerezolvate ce țin de testarea în lupta împotriva COVID-19.

2. MATERIALE ȘI METODE

Au fost utilizate următoarele probe biologice: 96 plasmă de la Donatori Negativi prelevate înainte de anunțarea pandemiei COVID-19 în Republica Moldova; Plasmă Convalescentă colectată de la pacienți cu rezultat negativ pentru COVID-19 într-un test PCR și care se află la 14 zile după recuperarea clinică (n=100); Ser de la persoane vaccinate cu Sinopharm care se află la 14 zile după a doua doză de vaccin anti COVID-19 (n=100) și 25 probe de ARN SARS-CoV-2 pentru secvențiere colectate în Republica Moldova între iunie 2020 și septembrie 2021.

Pentru a obține secvențele genomului, s-au realizat mai multe etape. Extracția acidului nucleic a fost efectuată utilizând un kit manual de extracție ADN/ARN (Vector-Best). Illumina MiSeq a fost utilizat pentru secvențiere, conform protocolului standard pentru citiri paired-end de 150 de baze. Controlul calității datelor brute a fost realizat utilizând software-ul FastQC. Pentru eliminarea adaptorilor și tăierea citirilor, s-a utilizat instrumentul de tăiere Primerclip și secvențele de adaptor pentru panourile Swift Biosciences Accel-Amplicon. Asamblarea genomului a fost realizată utilizând ghidurile dedicate de analiză a datelor Swift dockerizate.

Analiza filogenetică a fost realizată utilizând platforma Nextstrain. S-a utilizat o strategie de sub-sampling la nivelul Moldovei în setul de date Nextregions/Europe. Istoria evoluționară a fost dedusă folosind metoda Maximum Likelihood și modelul General Time Reversible. S-au analizat 542 de secvențe de nucleotide și s-au inclus 3309 poziții în setul de date final. Arborele filogenetic a fost construit cu ajutorul software-ului MEGA7 și a fost editat utilizând FigTree.

Pentru studiul răspunsului imun umoral, au fost utilizate culturi celulare (HEK293T, care exprimă antigenul T SV40) și pseudovirusul SARS-CoV-2. De asemenea, au fost folosite linii celulare Huh7 și HEK293 exprimând receptorul ACE2, care au fost obținute prin transducția unui lentivector care exprimă ACE2 uman. Nivelul de expresie al ACE2 pe linia celulară HEK293-ACE2 a fost verificat prin citometrie de flux.

Pentru prepararea pseudovirusului SARS-CoV-2, s-a utilizat un sistem lentivector de generația a doua care exprimă proteina verde fluorescentă (GFP). Celulele HEK-293T au fost transfectate cu trei plasmide. Am folosit plasmida de transfer lentiviral *pLVTHM*, care codifică pentru gena reporter (eGFP), plasmida de ambalare HIV *psPAX2* (care codifică pentru gag-pol) și o plasmidă care transportă codificarea secvenței pentru structura glicoproteinei Spike, *pcDNA3-SARS-CoV-2-Spike* D614GΔ19. *E. coli* *DH5α* a fost utilizată pentru propagarea plasmidelor.

Am efectuat experimente de titrare pentru a asigura acuratețea transducției SARS-CoV-2 a lentivirusului. Lentivirusul VSV a fost folosit ca martor pozitiv, deoarece poate infecta atât liniile celulare HEK 293-ACE2, cât și HEK 293, în timp ce lentivirusul SARS-CoV-2 poate infecta numai HEK 293 care exprimă receptorul ACE2 pe membrană [15].

Pentru evaluarea neutralizării pseudovirusului SARS-CoV-2, au fost dezvoltate două metode: una bazată pe citometrie de flux (FC) și alta bazată pe microscopie de screening cu conținut ridicat (HCI). Pentru metoda FC, celulele HEK293-ACE2 au fost infectate cu pseudovirusul și incubate timp de 72 de ore. Apoi, celulele au fost recoltate și analizate prin citometrie de flux pentru a calcula procentul de reducere a infecției și titrul de neutralizare. Pentru metoda HCI, celulele Huh7-hACE2 au fost infectate cu pseudovirus și, după 48 de ore, celulele au fost fixate și au fost obținute imagini digitale pentru a determina procentul de transducție și neutralizare.

De asemenea, a fost dezvoltat un test ELISA folosind RBD Spike SARS-CoV-2 pentru a detecta anticorpii specifici.

Analiza statistică a fost realizată utilizând software-ul R și s-au evaluat corelațiile și diferențele între titrurile obținute prin diferite metode și între grupurile de participanți.

3. VARIANTE GENOMICE ȘI ANALIZA FILOGENETICĂ A SECVENȚELOR SARS-COV-2 DIN REPUBLICA MOLDOVA

Pentru a ne face o idee generală despre variantele SARS-CoV-2 care au circulat în Republica Moldova în perioada martie 2020 – mai 2022, am studiat relațiile filogenetice dintre cazurile virale din Republica Moldova și principalele linii SARS-CoV-2 din Europa.

Pentru aceasta am efectuat analiza filogenetică folosind platforma bioinformatică Nextstrain, prin care au fost identificate 5 clustere și anume 19A, 20A, 20B, 20I/501Y.V1 și 21D din martie 2020 până în septembrie 2021. Figura 1 prezintă relația genetică dintre secvențele complete ale genomului SARS-CoV-2 din Moldova în contextul setului de date Nextregions/Europe. A fost elaborată o strategie de sub-eșantionare la nivel de Republica Moldova, utilizând tulpina de referință hCoV-19/Wuhan/WH01/2019 (numărul de aderare GISAID EPI_ISL_402125) ca rădăcină inițială [11].

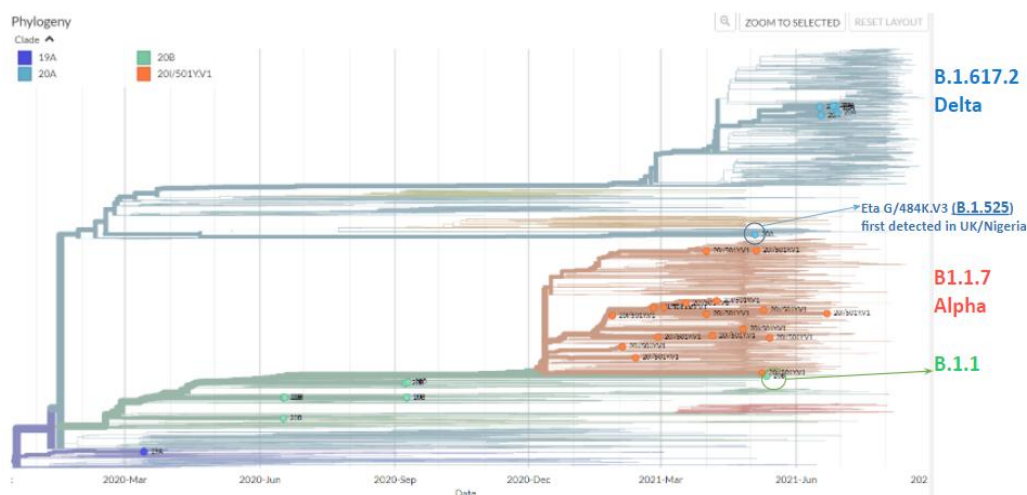


Figura 1. Evoluția genomică a SARS-CoV-2 în Republica Moldova [11]

Apoi am decis să concentrăm analiza filogenetică pe studiul regiunii genomice corespunzătoare genei proteinei spike, dat fiind faptul că această proteină este una dintre principalele determinante antigenice a acestui virus. În acest context, inițial au fost descărcate mai mult de 2.900.000 de genomuri complete ale virusului SARS-CoV-2 din baza de date GISAID, filtrate după locația geografică europeană. Folosind scripturi proprii, au fost eliminate toate genomurile care conțineau nucleotide nedefinite (NNN). Deoarece setul de date era încă mare, s-a efectuat o selecție aleatorie pentru a reduce numărul de secvențe fără a pierde variabilitatea populației. Setul de date final conține un total de 542 secvențe nucleotidice din mai multe țări europene. Din aceste 505 secvențe, 25 corespund probelor analizate în acest studiu.

Principalele linii SARS-CoV-2 sunt evidențiate în arborele filogenetic (figura 2). După cum se poate observa în figură, tulpinile din Republica Moldova (colorate în roșu) se grupează în principal cu tulpini din linia Alfa, denotând o relație genetică strânsă între aceste secvențe. Cu toate acestea, filogenia arată, de asemenea, relații genetice oarecum strânse între variantele

circulante din Republica Moldova și secvențele din liniile Eta, Lambda și Delta. Pe de altă parte, nu s-a observat nicio relație filogenetică între tulpinile din Republica Moldova și Omicron până la data de 26.05.2022.

Aceasta denotă marea diversitate a variantelor virale care au circulat în Moldova. Acest rezultat a fost așteptat, deoarece evenimentele pandemice de acest stil se caracterizează printr-o evoluție rapidă în care sunt generate multe variante virale.

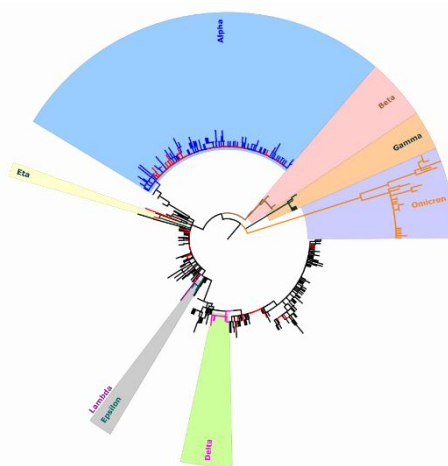


Figura 2. Analiza arborelui filogenetic cu probabilitate maximă a genei Spike a SARS-CoV2 care circulă în Moldova în timpul pandemiei de COVID19 (martie 2020-mai 2022).

Privind în direcția opusă acelor de ceasornic, Delta este evidențiată în verde, Epsilon (gri), Lambda (magenta), Eta (galben), Alfa (albastru-cer), Beta (roz), Gamma (portocaliu) și Omicron (lilac). Ramurile arborelui care corespund secvențelor din diferite țări europene sunt colorate în negru. Secvențele circulante din Republica Moldova sunt evidențiate cu roșu.

4. CARACTERIZAREA RĂSPUNSULUI IMUN UMORAL AL PERSOANELOR VACCINATE CU SINOPHARM (BBIBP-CORV) ȘI CONVALESCENȚILOR COVID-19 DIN REPUBLICA MOLDOVA

4.1. Generarea lentivirusului pseudotipat SARS-CoV-2

Am produs un lentivirus SARS-CoV-2 care poartă mutația D614G, însoțit de ștergerea ($\Delta 19$) a ultimilor 19 aminoacizi din domeniul C-terminal, corespunzător motivului de retenție ER.

4.2. Titrarea lentivirusului SARS-CoV-2

După 72 de ore de la transducție a fost evaluată calitatea virusului produs. Raporturile de infectare au fost calculate prin observarea prezenței proteinei GFP în celulele infectate. Procentul celulelor infectate (GFP) a fost utilizat pentru a estima cantitatea virusului produs, în timp ce valorile care prezentau cea mai bună liniaritate pe parcursul curbei de diluție cu factorul 2 au fost alese pentru a calcula titrul (tabelul 1). Lentivirusul VSV a fost utilizat ca și control pozitiv al transducției, deoarece poate infecta atât HEK 293-ACE2 și HEK 293. În schimb, lentivirusul SARS-CoV-2 poate infecta doar HEK 293 deoarece acesta exprimă receptorul ACE2 pe membrană.

Pe baza acestei analize, preparatul de lentivirus SARS-CoV-2 a avut un titru de aproximativ 3×10^5 TU/ml, măsurat în cinci experimente independente.

Tabelul 1. Eficiența transducției și titrul preparatelor lentivirale la diferite volume

Lenti SARS-CoV-2		Lenti VSV	
Volumul virusului	% de transducție	Volumul virusului	% de transducție
200 μL	54%	200 μL	52,46%
100 μL	32%	100 μL	63,93%
50 μL	16%	50 μL	55,1%
25 μL	13,5%	25 μL	35,11%
12.5 μL	12%	12.5 μL	30,2%
6 μL	10%	6 μL	18,35%
3 μL	9%	3 μL	11,58%
NT	0,2%	NT	0,5%
Titru: 3×10^5 TU/ml		Titru: $6,69 \times 10^6$ TU/ml	

4.3. Nivelul anticorpilor neutralizanți anti SARS-CoV-2 după infecția naturală sau în urma vaccinării

Următorul nostru obiectiv a fost să examinăm capacitatea anticorpilor produși fie de vaccinul Sinopharm, fie de infecția naturală, de a neutraliza virusul. Pentru a atinge acest obiectiv, am dezvoltat două teste separate care utilizează lentivirusuri pseudotipate SARS-CoV-2. Unul dintre aceste teste a implicat utilizarea HCI, în timp ce celălalt - FC.

Prin utilizarea ambelor metode, a fost posibil să se clasifice toate eșantioanele examinate în trei grupuri distincte: ser slab neutralizant, ser cu neutralizare moderată și ser puternic neutralizant. Testele de neutralizare au arătat că doar 20% din probele testate au neutralizat eficient pseudovirusul SARS-CoV-2 la titruri de peste 1:250. Pentru 50% din seruri, răspunsul a fost slab sau absent.

Tablul 2. Compararea titrurilor cantitative de anticorpi între grupurile și subgrupurile studiate utilizând mediana și intervalul între metode[15]

	Titru general	Titru la convalescenți	Titru la vaccinați	Titru la vaccinați (+infecție anterioară)	Titru la vaccinați (naiv)
ELISA IgG RBD; mediană (interval)	1678 (1-13565)	1239 (1-13565)	1742 (152-7184)	1936 (524-6978)	1731 (152-7184)
FC; mediană (interval)	35,8 (1-2182)	27,6 (1-1819)	40,1 (1-2182)	43,9 (1-896)	39,6 (1-2182)
HCI; mediană (interval)	41,3 (1-11051)	24,6 (1-11051)	60,9 (1-10451)	67 (1-3940)	57 (1-10451)

Analiza regresiei neliniare a fost utilizată pentru a determina titrurile de neutralizare la jumătate maximă (NT_{50}). Atunci am comparat titrurile de anticorpi neutralizanți determinate prin cele două metode utilizate (tabelul 2), FC a arătat o medie a titrului de anticorpi de 27,6 (95% CI: 13,6 - 31,8) (intervalul: 1-1819) la pacienții convalescenți, în timp ce HCI a arătat un

titru median de 24,6 (95% CI: 11,4 - 29,4) (intervalul: 1-11051). Titrul convalescent mediu a fost de 357 (95% CI: 0 - 623) atunci când a fost testat prin HCI și 123 (95% CI: 61,5 - 175) atunci când a fost determinat prin FC. Acest lucru indică faptul că ambele metode sunt comparabile în ceea ce privește detectarea anticorpilor neutralizanți la persoanele convalescente sau vaccinate.

NT₅₀ s-au dovedit a fi 40,1 (95% CI: 27,8 - 47,4) cu valori de interval de la 1 la 2182 pentru persoanele vaccinate folosind metoda FC. În mod similar, pentru grupul de metode HCI, studiul a constatat că NT₅₀ a fost 60,9 (95% CI: 40,2 - 78,6) și valoarea intervalului de la 1 la 10451 (intervalul: 1-10451) (tabelul 2). Acest lucru, indică faptul că imagistica cu conținut ridicat poate fi mai puțin sensibilă decât citometria fluxului în detectarea anticorpilor neutralizanți la persoanele vaccinate.

În general, aceste rezultate sugerează că atât pacienții convalescenți, cât și persoanele vaccinate pot avea un răspuns imun umoral suboptimal față de SARS-CoV-2. Acest lucru poate avea implicații asupra durabilității protecției împotriva virusului SARS-CoV-2 și asupra nevoii potențiale de vaccinare de rapel.

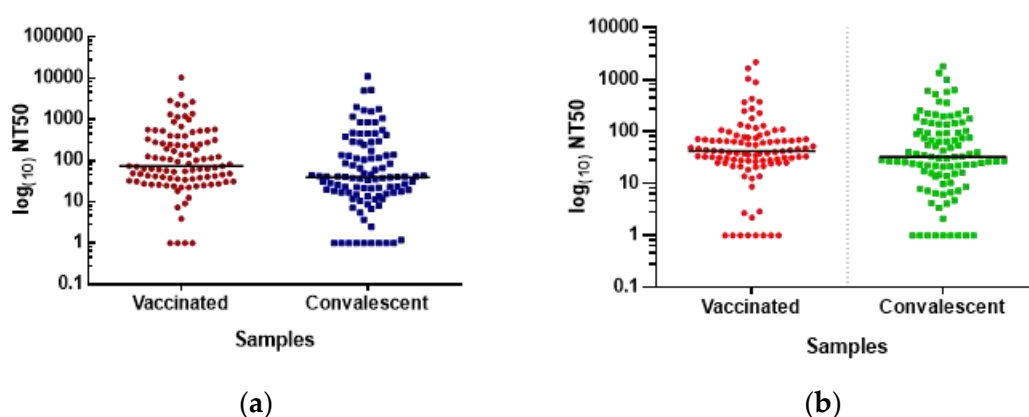


Figura 3. Titrurile de anticorpi neutralizanți în cohorta vaccinată cu Sinopharm și convalescenții COVID-19, măsurate prin (a) HCI și (b) FC [15]

Figura 3 prezintă titrurile de anticorpi neutralizanți în cohorta vaccinată cu Sinopharm și pacienții recuperați de COVID-19, măsurate prin HCI și FC. Linia neagră indică titrurile mediane. Parcela scatter afișează rezultatele obținute prin ambele metode. Pentru claritate vizuală, cele 25 de valori extreme nu sunt afișate în parcelă, ci au fost incluse în calcule. Serurile de la donatori sănătoși au fost testate la o singură diluție de 1:12.5 și toate au arătat un NT₅₀ < 0,94.

4.4. Compararea nivelurilor de anticorpi IgG specifici SARS-CoV-2 RBD la persoanele vaccinate și la pacienții convalescenți testate prin ELISA

Testul ELISA a fost efectuat pentru a măsura nivelul anticorpilor IgG anti-Spike RBD la persoanele vaccinate și la pacienții convalescenți. Nivelul OD threshold pentru calcularea titrurilor de anticorpi a fost de 0,0819, iar titrurile IgG au fost definite ca fiind reciproce ultimei diluții la care OD₄₅₀ a fost peste cut-off.

Rezultatele au arătat că ambele grupuri au avut o activitate serologică puternică și specifică față de RBD în comparație cu controalele sănătoase (figura 4). Persoanele vaccinate au avut niveluri semnificativ mai mari de anticorpi anti-RBD IgG în comparație cu pacienții

convalescenți, cu titre mediane de 1742 față de 1239 (tabelul 2). Aceste constatări sunt în concordanță cu studiile anterioare care au raportat titre de anticorpi mai mari la persoanele vaccinate în comparație cu cele care s-au vindecat de COVID-19 [15].

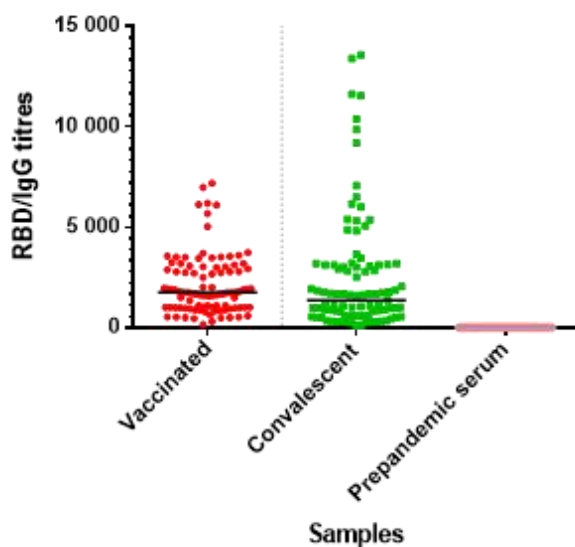


Figura 4. Compararea nivelurilor de anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2 RBD la persoanele vaccinate cu Sinopharm, COVID-19 convalescente și seronegative

Titrul global (măsurat în 200 de probe) a avut un titru mediu de 2322 (CI: 1991-2653) și un titru median de 1678 (CI: 1598-1863). Acesta a prezentat o deviație standard mai mare (2342) și o gamă intercuartilă mai largă (2151) în comparație cu titrurile convalescente și vaccinate. Intervalul de valori observate pentru titrul global a fost de la 1 la 13565.

În grupul convalescent (măsurat în 100 de probe), titrul mediu a fost 2519 (CI: 1906-3069), iar titrul median a fost 1239 (CI: 745-1486). A avut cea mai mare deviație standard (2959) și IQR (2521), cu un interval de valori de la 1 la 13565.

Pentru grupul vaccinat (măsurat în 100 de probe), titrul mediu a fost 2126 (CI: 1830-2409), iar titrul median a fost 1742 (CI: 1565-1882). A avut cea mai mică deviație standard (1481) și IQR (1930), cu un interval de valori de la 152 la 7184.

În plus, anticorpii IgG specifici SARS-CoV-2 RBD au fost prezenți în serurile tuturor subiecților vaccinați, în timp ce un individ convalescent (60CP) avea valori de titru nedetectabile. Acest individ pare a fi un non-răspuns sănătos care nu a produs anticorpi după ce s-a vindecat de COVID-19 [15].

4.5. Corelația dintre nivelul anticorpilor neutralizanți și IgG anti-RBD SARS-CoV-2

RBD al virusului SARS-CoV-2 este o componentă critică în declanșarea producției de anticorpi neutralizanți care pot ajuta la protejarea împotriva virusului. De asemenea, RBD are un impact semnificativ asupra activării răspunsurilor imune ale celulelor T, subliniind în continuare importanța sa în apărarea organismului împotriva COVID-19 [27].

Rezultatele analizei de corelație dintre anticorpii neutralizanți obținuți prin testul FC sau HCI și anticorpii IgG anti-RBD SARS-CoV-2 măsurați prin ELISA sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3. Corelația dintre anticorpii specifici SARS-CoV-2 și titrurile de neutralizare folosind diferite metode

Grup	metoda_1	metoda_2	Coefficientul de corelație (spearman)	p_val
Toți participanții	ELISA RBD	FC	0,64	< 0.001
Convalescență	ELISA RBD	FC	0,68	< 0.001
Vaccinat	ELISA RBD	FC	0,58	< 0.001
Toți participanții	HCI	ELISA RBD	0,52	< 0.001
Convalescență	HCI	ELISA RBD	0,45	< 0.001
Vaccinat	HCI	ELISA RBD	0,53	< 0.001
Toți participanții	FC	HCI	0,55	< 0.001
Convalescență	FC	HCI	0,51	< 0.001
Vaccinat	FC	HCI	0,58	< 0.001

S-a constatat o corelație pozitivă moderată până la puternică între anticorpii IgG SARS-CoV-2 neutralizanți și anti-RBD, cu coeficienți de corelație variind de la 0,45 la 0,68 și valori p mai mici de 0,001 pentru toate comparațiile. Acest lucru sugerează că nivelurile mai ridicate de anticorpi IgG anti-RBD SARS-CoV-2 sunt asociate cu un răspuns mai puternic de neutralizare a virusului.

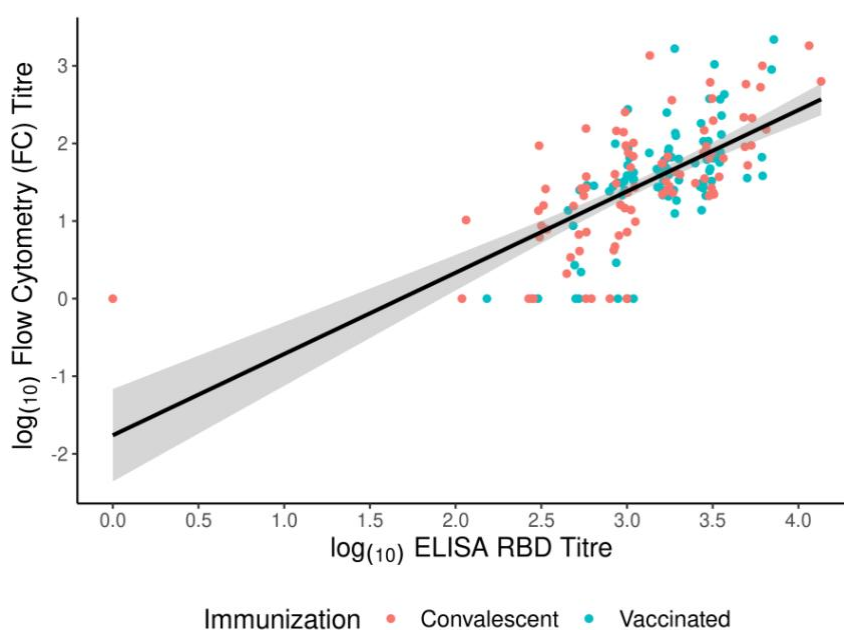


Figura 5. Compararea titrurilor ELISA RBD și FC transformate în log10 [15]

Mai exact, coeficienții de corelație dintre testele ELISA RBD și FC au fost de 0,64 pentru toți participanții, așa cum se arată în figura 5, în timp ce între testele ELISA RBD și HCI, coeficienții de corelație au fost cei mai mici ($\rho=0,52$) pentru toți participanții, rezultatele fiind prezentate în figura 6.

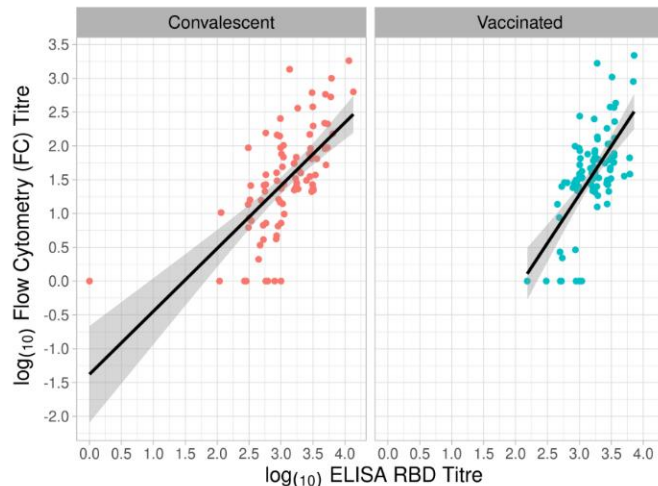


Figura 6. Corelația dintre titrurile ELISA RBD și FC transformate log₁₀, la convalescenți și persoanele vaccinate[15]

În plus, atunci când am comparat coeficienții de corelație dintre testele din grupurile convalescente și cele vaccinate separat, am observat rezultate similare, sugerând că corelația nu a fost influențată de tipul de răspuns imun (de exemplu, infecția naturală vs. vaccinare). Coeficienții de corelație dintre testele ELISA RBD și FC au fost de 0,68 pentru pacienții convalescenți și 0,58 pentru persoanele vaccinate (figura 6).

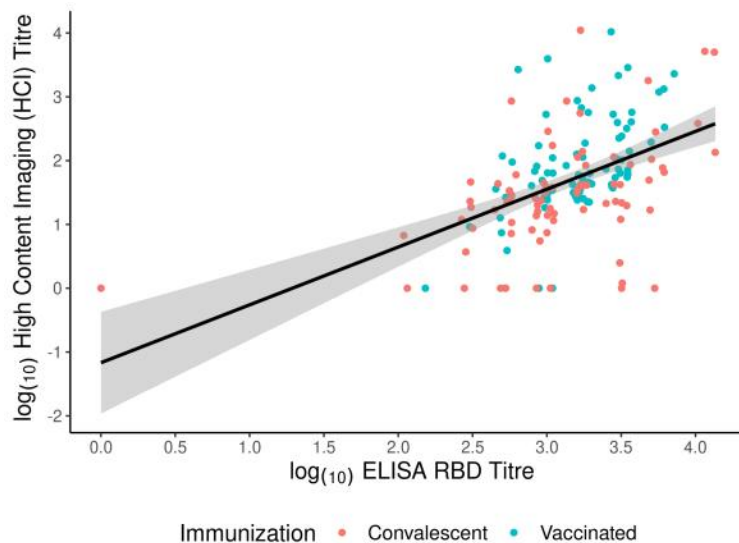


Figura 7. Corelația dintre anticorpul IgG anti-RBD și titrurile de neutralizare HCI în serurile umane[15]

Coeficientul de corelație dintre anticorpul neutralizant detectat de HCI și titrurile anticorpilor anti-SARS-CoV-2 Spike RBD determinați prin testul ELISA a fost ușor mai mare la persoanele vaccinate ($\rho=0,53$) decât la pacienții convalescenți ($\rho=0,45$). A fost constatată o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între grupuri numai în testul HCI ($p < 0,001$), titrul median al persoanelor vaccinate fiind semnificativ mai mare decât cel al pacienților convalescenți.

În cele din urmă, coeficientul de corelație dintre testele FC și HCI au fost de 0,55 pentru toți participanții, 0,51 pentru pacienții convalescenți și 0,58 pentru persoanele vaccinate.

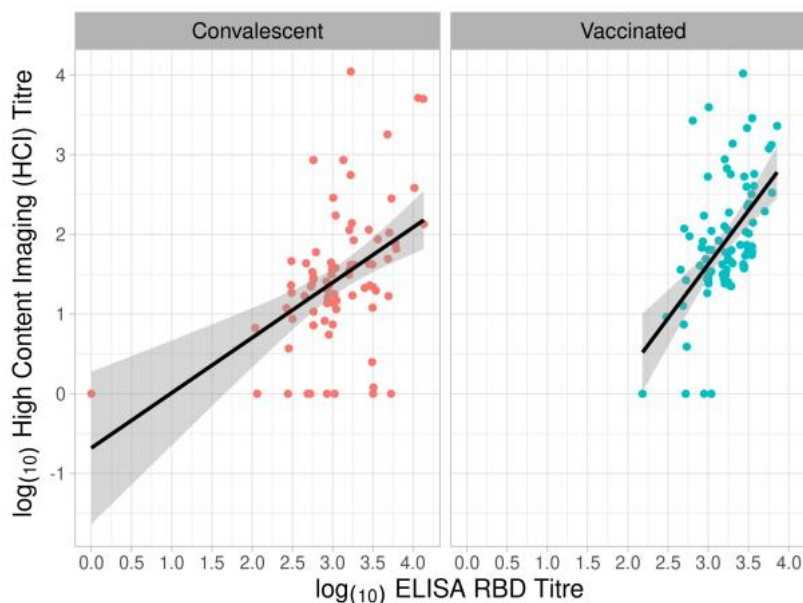


Figura 8. **Anticorpul IgG anti-RBD din serurile umane și corelația acestuia cu NT₅₀ determinați de HCI**

Figura 8 ilustrează corelația dintre IgG anti-RBD și nivelurile de anticorpi neutralizanți la subiecții convalescenți și vaccinați. Graficul include diferite puncte de culoare care indică participanții convalescenți (roșu) și vaccinați (albastru). Linia neagră reprezintă cea mai bună estimare a relației dintre aceste două variabile, în timp ce banda gri reprezintă intervalul de valori în care relația autentică se va încadra probabil. Faptul că există o linie de regresie liniară cea mai potrivită, cu un interval de încredere corespunzător, sugerează o corelație între nivelurile de IgG anti-RBD și anticorpii neutralizanți la acești indivizi.

Interesant este că am observat că au existat unele probe cu anticorpi neutralizanți nedetectabili care încă mai aveau anticorpi de legare, ceea ce indică faptul că o mare parte din anticorpi nu neutralizează virusul. Cu toate acestea, cu cât titrul de legare este mai mare, cu atât este mai probabil ca neutralizarea să fie detectată, sugerând că legarea și neutralizarea se corelează într-o anumită măsură. Constatările noastre sugerează că măsurarea neutralizării și a anticorpilor legați este importantă pentru evaluarea cuprinzătoare a răspunsului imun umoral la SARS-CoV-2.

Persoanele care au trecut prin boala COVID-19 și au fost vaccinați cu Sinopharm, au prezentat niveluri mai ridicate de anticorpi în comparație cu cei care au avut doar una sau alta. Diferența a fost semnificativă din punct de vedere statistic numai în titrurile HCI dintre persoanele convalescente și cele vaccinate ($p < 0,05$). Interesant este că nu a existat nicio semnificație statistică dintre cei care s-au recuperat după boală și cei care au primit vaccinul, dar nu au contractat niciodată virusul SARS-CoV-2. În plus, persoanele convalescente și cele care au fost expuse anterior la virus și vaccinate au avut niveluri de anticorpi semnificativ mai ridicate în comparație cu cei care au primit doar vaccinul ($p < 0,001$).

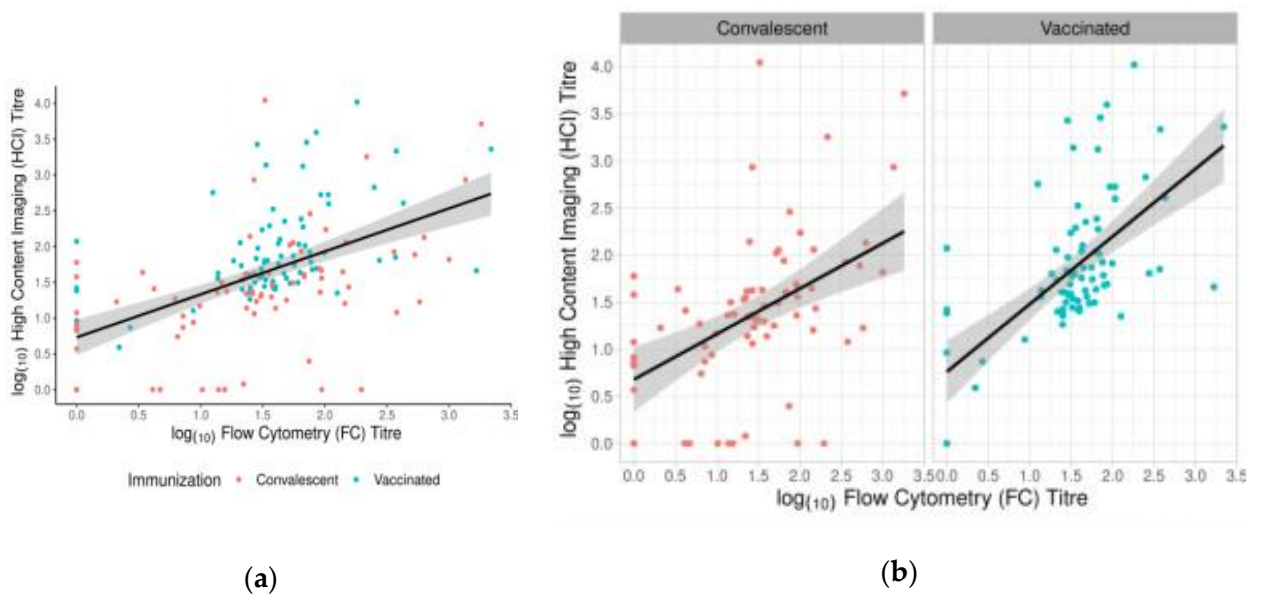


Figura 9. Corelația titrurilor de anticorpi neutralizanți în grupuri convalescente și vaccinate, determinată de FC și HCI

Figura 10 oferă o comparație detaliată a nivelurilor de anticorpi între aceste subgrupuri diferite de participanți și prezintă distribuția titrurilor de anticorpi pentru fiecare grupă.

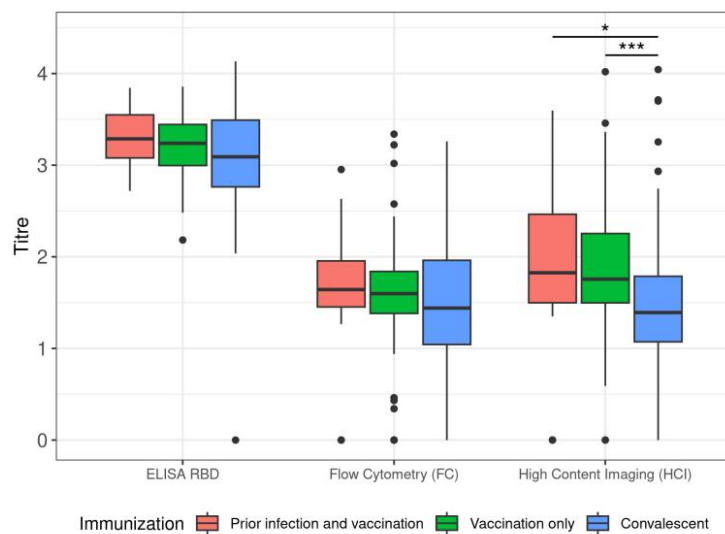


Figura 10. Relația dintre anticorpii induși de expunerea la SARS-CoV-2 și de vaccinul Sinopharm

Studiul nostru oferă informații importante despre corelația dintre anticorpii neutralizanți și IgG anti-RBD SARS-CoV-2. Aceste constatări au implicații importante pentru dezvoltarea unor tratamente și vaccinuri eficiente împotriva COVID-19, deoarece sugerează că un răspuns imun umoral puternic, inclusiv anticorpii neutralizanți și de legare, ar putea fi necesar pentru protecția împotriva virusului. Cu toate acestea, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a clarifica natura exactă a relației dintre anticorpii de legare și neutralizanți, pentru a confirma această relație, pentru a evalua imunitatea protectoare pe termen lung conferită de acești anticorpi și pentru a determina cele mai eficiente metode de măsurare a răspunsului imun umoral la SARS-CoV-2.

CONCLUZII

1. SARS-CoV-2 trece printr-o evoluție moleculară continuă, după cum reiese din prezența mai multor substituții de aminoacizi în proteinele virale în probele analizate din Republica Moldova. Unele dintre aceste mutații sunt frecvente și pot avea implicații asupra transmisibilității, virulenței și evadării imune a virusului, cum ar fi mutații Spike D614G, N G204R, N R203K, L452R și P681H.

2. Monitorizarea continuă a evoluției moleculare a SARS-CoV-2 este necesară pentru a identifica mutații emergente și impactul potențial al acestora asupra eficacității vaccinurilor și tratamentelor.

3. Lentivirusul pseudotipat SARS-CoV-2 a fost produs cu succes folosind sistemul HIV-LV de generația a 2-a, și ar putea fi utilizat pentru a identifica anticorpii ce pot detecta proteina spike în forma sa naturală.

4. Testele de neutralizare au arătat că doar 20% din probe au neutralizat eficient pseudovirusul SARS-CoV-2 la titruri de peste 1:250, ceea ce indică faptul că o parte semnificativă a persoanelor convalescente și vaccinate poate nu au dezvoltat un răspuns imun umoral puternic la virus.

5. Vaccinul Sinopharm împotriva COVID-19 induce un răspuns imun robust și specific la persoanele vaccinate, după cum reiese din nivelurile ridicate de anticorpi IgG anti-RBD detectați în probele de ser.

6. Răspunsul imun umoral indus de vaccinul Sinopharm este mai puternic decât răspunsul observat la persoanele care s-au vindecat de COVID-19, după cum indică nivelurile mai ridicate de anticorpi IgG anti-RBD detectați la persoanele vaccinate în comparație cu pacienții convalescenți.

7. Există o corelație pozitivă moderată între nivelurile anticorpilor IgG anti-RBD SARS-CoV-2 și răspunsul neutralizant al virusului. Acest lucru sugerează că nivelurile mai ridicate de anticorpi IgG anti-RBD SARS-CoV-2 sunt asociate cu un răspuns mai puternic de neutralizare al virusului.

8. Studiul a demonstrat importanța dezvoltării instrumentelor de diagnosticare și a efectuării de studii privind răspunsul imunitar umoral pentru a lupta împotriva transmiterii SARS-CoV-2 și pentru a atenua în mod eficient impactul acestuia asupra sănătății publice. Acest lucru este deosebit de important pentru Republica Moldova, deoarece astfel de eforturi pot oferi informații neprețuite despre epidemiologia moleculară a virusului și pot contribui la lupta globală împotriva pandemiei.

RECOMANDĂRI

1. Este esențial să se consolideze și să se îmbunătățească eficacitatea sistemelor de supraveghere pentru a monitoriza evoluția moleculară a SARS-CoV-2. Ar trebui să se efectueze o monitorizare periodică pentru a urmări prevalența mutațiilor, în special a celor care au implicații asupra transmisibilității, virulenței și scăpării imunitare.

2. Cercetarea științifică ar trebui să continue pentru a dezvolta instrumente de diagnostic care să poată măsura cu precizie răspunsul imun umoral la SARS-CoV-2. Prin măsurarea anticorpilor neutralizanți și a anticorpilor de legare, se poate realiza o evaluare completă a răspunsului imunitar. Acest lucru va oferi informații valoroase privind eficacitatea vaccinurilor, va identifica persoanele cu răspunsuri imune slabe și va contribui la dezvoltarea de terapii specifice.

3. Având în vedere impactul global al pandemiei, colaborarea regională și internațională și schimbul de date și rezultate științifice sunt esențiale. Republica Moldova ar trebui să participe în mod activ la inițiativele globale de combatere a transmiterii SARS-CoV-2. Împărtășirea cunoștințelor obținute în urma studiilor efectuate în țară poate contribui la lupta globală împotriva pandemiei și poate ajuta la dezvoltarea unor strategii eficiente de izolare și tratament.

4. Se recomandă implementarea protocoalelor și a instrumentelor dezvoltate în cadrul acestui proiect de cercetare în cadrul curriculum-ului didactic și practic al Departamentului de microbiologie și imunologie. Acest lucru le va oferi studenților experiență practică și expunere la metodologii de cercetare de ultimă oră, pregătindu-i pentru viitoarele activități științifice și echipându-i cu cunoștințe și abilități pentru a fi pregătiți și a răspunde la o potențială pandemie viitoare.

BIBLIOGRAFIE

1. Lai, C.C.; Shih, T.P.; Ko, W.C.; Tang, H.J.; Hsueh, P.R. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Coronavirus Disease-2019 (COVID-19): The Epidemic and the Challenges. *Int J Antimicrob Agents* **2020**, *55*, 105924, doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105924.
2. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 8 February 2023).
3. Cov-Lineages Available online: <https://cov-lineages.org/> (accessed on 16 March 2023).
4. *SARS-CoV-2 Variants of Concern as of 9 March 2023*. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern> (accessed on 16 March 2023).
5. Duchene, S.; Featherstone, L.; Haritopoulou-Sinanidou, M.; Rambaut, A.; Lemey, P.; Baele, G. Temporal Signal and the Phylodynamic Threshold of SARS-CoV-2. *Virus Evol* **2020**, *6*, 1–8, doi:10.1093/ve/veaa061.
6. Houldcroft, C.J.; Beale, M.A.; Breuer, J. Clinical and Biological Insights from Viral Genome Sequencing. *Nat Rev Microbiol* **2017**, *15*, 183–192, doi:10.1038/nrmicro.2016.182.
7. *Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health; 2021*; Available online: [Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health \(who.int\)](https://www.who.int/publications/m/item/genomic-sequencing-of-sars-cov-2-a-guide-to-implementation-for-maximum-impact-on-public-health) (accessed on 16 March 2022).
8. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 727–733, doi:10.1056/nejmoa2001017.
9. Giovanetti, M.; Cella, E.; Benedetti, F.; Rife Magalis, B.; Fonseca, V.; Fabris, S.; Campisi, G.; Ciccozzi, A.; Angeletti, S.; Borsetti, A.; et al. SARS-CoV-2 Shifting Transmission Dynamics and Hidden Reservoirs Potentially Limit Efficacy of Public Health Interventions in Italy. *Commun Biol* **2021**, *4*, 1–9, doi:10.1038/s42003-021-02025-0.
10. "MSMPS confirmă primul caz de Coronavirus de tip nou în Republica Moldova" [MSMPS confirms first new-type coronavirus case in the Republic of Moldova]. [msmps.gov.md](https://msmps.gov.md/comunicare/comunicate/in-republica-moldova-a-fost-confirmat-primul-caz-de-coronavirus-se-iau-masuri-pentru-limitarea-raspirarii-virusului/) (in Romanian). <https://msmps.gov.md/comunicare/comunicate/in-republica-moldova-a-fost-confirmat-primul-caz-de-coronavirus-se-iau-masuri-pentru-limitarea-raspirarii-virusului/>. 7 March 2020. Archived from the original on 11 April 2020. Retrieved 8 March 2020.
11. Ulinici, M.; Soñora, M.; Orsini, E.; Licastro, D.; Dal Monego, S.; Todiras, M.; Lungu, L.; Groppa, S.; Marcello, A. Genome Sequences of SARS-CoV-2 Strains from the Republic of Moldova. *Microbiol Resour Announc* **2023**, *12*, doi: 10.1128/mra.01132-22.
12. "Situația epidemiologică prin infecția COVID-19, 2 aprilie, ora 17.30" [The epidemiological situation related to COVID-19 infection, 2 April, 17:30]. msmps.gov.md (in Romanian). Ministry of Health, Labour and Social Protection of the Republic of

- Moldova. 2 April 2020. Archived from the original on 12 April 2020. Retrieved 12 April 2020. Available online: [Situatia epidemiologica prin infectia COVID-19, 2 aprilie, ora 17.30 | Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale \(archive.org\)](#).
13. Republic of Moldova: WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data Available online: <https://covid19.who.int/region/euro/country/md> (accessed on 16 March 2023).
 14. Barnes, C.O.; Jette, C.A.; Abernathy, M.E.; Dam, K.M.A.; Esswein, S.R.; Gristick, H.B.; Malyutin, A.G.; Sharaf, N.G.; Huey-Tubman, K.E.; Lee, Y.E.; et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Structures Inform Therapeutic Strategies. *Nature* **2020**, *588*, 682, doi:10.1038/S41586-020-2852-1.
 15. Ulinici, M.; Suljić, A.; Poggianella, M.; Bonotto, R.M.; Rus, K.R.; Paraschiv, A.; Bonetti, A.M.; Todiras, M.; Corlateanu, A.; Groppa, S.; et al. Characterisation of the Antibody Response in Sinopharm (BBIBP-CorV) Recipients and COVID-19 Convalescent Sera from the Republic of Moldova. *Vaccines* **2023**, *Vol. 11*, Page 637 **2023**, *11*, 637, doi:10.3390/vaccines11030637.
 16. Maistriau, M.; Carletti, T.; Zakaria, M.K.; Braga, L.; Faoro, V.; Vasileiadis, V.; Marcello, A. A Method for the Detection of Virus Infectivity in Single Cells and Real Time: Towards an Automated Fluorescence Neutralization Test. *Virus Res* **2017**, *237*, 1–6, doi:10.1016/J.VIRUSRES.2017.05.004.
 17. Wajnberg, A.; Amanat, F.; Firpo, A.; Altman, D.R.; Bailey, M.J.; Mansour, M.; McMahon, M.; Meade, P.; Mendu, D.R.; Muellers, K.; et al. Robust Neutralizing Antibodies to SARS-CoV-2 Infection Persist for Months. *Science* **2020**, *370*, 1227–1230, doi:10.1126/SCIENCE.ABD7728.
 18. Li, D.; Sempowski, G.D.; Saunders, K.O.; Acharya, P.; Haynes, B.F. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies for COVID-19 Prevention and Treatment. *Annu Rev Med* **2022**, *73*, 1–16, doi:10.1146/ANNUREV-MED-042420-113838.
 19. Ministerul Sănătății al Republicii Moldova. 30 March 2020. Protocol Clinic Național Provizoriu, Infecția Cu Coronavirus de Tip Nou (COVID-19) [Interim National Clinical Protocol, Novel Coronavirus Infection (COVID-19)]. (In Romanian). https://msmps.gov.md/sites/default/files/pcn_provizoriu_infecția_cu_coronavirus_de_tip_nou_covid-19_aprobat_prin_ordinul_msmps_nr.336_din_30.03.2020_ro.pdf (accessed on 27 July 2022).
 20. Recommendations for Investigational COVID-19 Convalescent Plasma | FDA Available online: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/investigational-new-drug-applications-inds-cber-regulated-products/recommendations-investigational-covid-19-convalescent-plasma> (accessed on 17 December 2022).
 21. Ulinici, M.; Vorobjit, V. COVID-19-Teste de Neutralizare. *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină* **2020**, *87*, 95–100.
 22. Interim Guidelines for Biosafety and COVID-19 | CDC Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html> (accessed on 30 April 2023).
 23. Cruz-Cardenas, J.A.; Gutierrez, M.; López-Arredondo, A.; Castañeda-Delgado, J.E.; Rojas-Martinez, A.; Nakamura, Y.; Enciso-Moreno, J.A.; Palomares, L.A.; Brunck, M.E.G. A Pseudovirus-Based Platform to Measure Neutralizing Antibodies in Mexico Using SARS-CoV-2 as Proof-of-Concept. *Scientific Reports* **2022**, *12:1* **2022**, *12*, 1–12, doi:10.1038/s41598-022-22921-7.
 24. Hyseni, I.; Molesti, E.; Benincasa, L.; Piu, P.; Casa, E.; Temperton, N.J.; Manenti, A.; Montomoli, E. Characterisation of SARS-CoV-2 Lentiviral Pseudotypes and Correlation between Pseudotype-Based Neutralisation Assays and Live Virus-Based Micro Neutralisation Assays. *Viruses* **2020**, *12*, doi:10.3390/v12091011.

25. Li, Q.; Liu, Q.; Huang, W.; Li, X.; Wang, Y. Current Status on the Development of Pseudoviruses for Enveloped Viruses. *Rev Med Virol* **2018**, *28*, doi:10.1002/rmv.1963.
26. Crawford, K.H.D.; Eguia, R.; Dingens, A.S.; Loes, A.N.; Malone, K.D.; Wolf, C.R.; Chu, H.Y.; Tortorici, M.A.; Veessler, D.; Murphy, M.; et al. Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays. *Viruses* **2020**, *12*, doi:10.3390/V12050513.
27. Yu, F.; Xiang, R.; Deng, X.; Wang, L.; Yu, Z.; Tian, S.; Liang, R.; Li, Y.; Ying, T.; Jiang, S. Receptor-Binding Domain-Specific Human Neutralizing Monoclonal Antibodies against SARS-CoV and SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther* **2020**, *5*, doi:10.1038/S41392-020-00318-0.
28. Yu, Y.; Esposito, D.; Kang, Z.; Lu, J.; Remaley, A.T.; De Giorgi, V.; Chen, L.N.; West, K.; Cao, L. mRNA Vaccine-Induced Antibodies More Effective than Natural Immunity in Neutralizing SARS-CoV-2 and Its High Affinity Variants. *Scientific Reports* **2022**, *12*:1 **2022**, *12*, 1–10, doi:10.1038/s41598-022-06629-2.
29. Zhang, Y.; Belayachi, J.; Yang, Y.; Fu, Q.; Rodewald, L.; Li, H.; Yan, B.; Wang, Y.; Shen, Y.; Yang, Q.; et al. Real-World Study of the Effectiveness of BBIBP-CorV (Sinopharm) COVID-19 Vaccine in the Kingdom of Morocco. *BMC Public Health* **2022**, *22*, doi:10.1186/S12889-022-14016-9.
30. Dashdorj, N.J.; Wirz, O.F.; Röltgen, K.; Haraguchi, E.; Buzzanco, A.S.; Sibai, M.; Wang, H.; Miller, J.A.; Solis, D.; Sahoo, M.K.; et al. Direct Comparison of Antibody Responses to Four SARS-CoV-2 Vaccines in Mongolia. *Cell Host Microbe* **2021**, *29*, 1738-1743.e4, doi:10.1016/J.CHOM.2021.11.004.
31. Omran, E.A.; Habashy, R.E.; Ezz Elarab, L.A.; Hashish, M.H.; El-Barrawy, M.A.; Abdelwahab, I.A.; Fekry, M.M. Anti-Spike and Neutralizing Antibodies after Two Doses of COVID-19 Sinopharm/BIBP Vaccine. *Vaccines (Basel)* **2022**, *10*, doi:10.3390/VACCINES10081340.
32. Vokó, Z.; Kiss, Z.; Surján, G.; Surján, O.; Barcza, Z.; Pályi, B.; Formanek-Balku, E.; Molnár, G.A.; Herczeg, R.; Gyenesei, A.; et al. Nationwide Effectiveness of Five SARS-CoV-2 Vaccines in Hungary—the HUN-VE Study. *Clinical Microbiology and Infection* **2022**, *28*, 398–404, doi:10.1016/j.cmi.2021.11.011.
33. Ismail AlHosani, F.; Eduardo Stanciole, A.; Aden, B.; Timoshkin, A.; Najim, O.; Abbas Zaher, W.; AlSayedsaleh AlDhaheri, F.; Al Mazrouie, S.; Rizvi, T.A.; Mustafa, F. Impact of the Sinopharm's BBIBP-CorV Vaccine in Preventing Hospital Admissions and Death in Infected Vaccinees: Results from a Retrospective Study in the Emirate of Abu Dhabi, United Arab Emirates (UAE). *Vaccine* **2022**, *40*, 2003–2010, doi:10.1016/J.VACCINE.2022.02.039.
34. Dolscheid-Pommerich, R.; Bartok, E.; Renn, M.; Kümmerer, B.M.; Schulte, B.; Schmithausen, R.M.; Stoffel-Wagner, B.; Streeck, H.; Saschenbrecker, S.; Steinhagen, K.; et al. Correlation between a Quantitative Anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA and Neutralization Activity. *J Med Virol* **2022**, *94*, 388–392, doi:10.1002/JMV.27287.
35. Cristiano, A.; Pieri, M.; Sarubbi, S.; Pelagalli, M.; Calugi, G.; Tomassetti, F.; Bernardini, S.; Nuccetelli, M. Evaluation of Serological Anti-SARS-CoV-2 Chemiluminescent Immunoassays Correlated to Live Virus Neutralization Test, for the Detection of Anti-RBD Antibodies as a Relevant Alternative in COVID-19 Large-Scale Neutralizing Activity Monitoring. *Clinical Immunology* **2022**, *234*, 108918, doi:10.1016/J.CLIM.2021.108918.
36. Johnson, M.C.; Lyddon, T.D.; Suarez, R.; Salcedo, B.; LePique, M.; Graham, M.; Ricana, C.; Robinson, C.; Ritter, D.G. Optimized Pseudotyping Conditions for the SARS-COV-2 Spike Glycoprotein. *J Virol* **2020**, *94*, doi:10.1128/JVI.01062-20.
37. Muruato, A.E.; Fontes-Garfias, C.R.; Ren, P.; Garcia-Blanco, M.A.; Menachery, V.D.; Xie, X.; Shi, P.Y. A High-Throughput Neutralizing Antibody Assay for COVID-19 Diagnosis and Vaccine Evaluation. *Nature Communications* **2020**, *11*:1 **2020**, *11*, 1–6, doi:10.1038/s41467-020-17892-0.

38. Zhong, L.; Krummenacher, C.; Zhang, W.; Hong, J.; Feng, Q.; Zhao, Q.; Chen, Y.; Zeng, M.-S.; Zeng, Y.-X.; Xu, M.; et al. A High-Throughput Neutralizing Assay for Antibodies and Sera Evaluation against Epstein-Barr Virus. *Virology Journal* 2022 19:1 **2022**, 19, 1–15, doi:10.1186/S12985-022-01911-1.

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE

la care au fost prezentate rezultatele cercetărilor la teza de doctor în științe medicale

cu tema „Evoluția moleculară a SARS-CoV-2 și răspunsul imun uman la infecție”
realizată în cadrul Disciplinei de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină
Preventivă

Mariana Ulinici

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie ”Nicolae Testemițanu”

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

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

1. **Ulinici, M.**, Covantev, S., Wingfield-Digby, J., Beloukas, A., Mathioudakis, A.G., Corlateanu, A. Screening, Diagnostic and Prognostic Tests for COVID-19: A Comprehensive Review. In: *Life*. 2021;11(6), p. 561. ISSN: 2075-1729. <https://doi.org/10.3390/life11060561>, (IF: **3,817**).
2. Heydari, Z., Peshkova, M., Gonen, Z.B., Coretchi I., Eken A., Yay A.H., Dogan M. E., Gokce N., Akalin H., Kosheleva N., Galea-Abdusa D., **Ulinici M.**, Vorobjit V., Shpichka A., Groppa S., Vosough M., Todiras M., Butnaru D., Ozkul Y. & Timashev P. EVs vs. EVs: MSCs and Tregs as a source of invisible possibilities. In: *Journal of Molecular Medicine*. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00109-022-02276-2> (IF **5.606**).
3. **Ulinici M.**, Soñora M., Orsini E., Licastro D., Monego S. D., Todiras M., Lungu L., Groppa S., Marcello A. Genome Sequences of SARS-CoV-2 Strains from the Republic of Moldova. In: *ASM Journals, Microbiology Resource Announcements*. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/mra.01132-22> (IF **0.819**).
4. **Ulinici, M.**, Suljič, A., Poggianella, M., Milan Bonotto, R., Resman Rus, K., Paraschiv, A., Bonetti, A.M., Todiras, M., Corlateanu, A., Groppa, S., Ceban, E., Petrovec, M., Marcello, A. Characterisation of the Antibody Response in Sinopharm (BBIBP-CorV) Recipients and COVID-19 Convalescent Sera from the Republic of Moldova. In: *Vaccines*. 2023; 11, 637. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030637> (IF **7.8**).

- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**

- ✓ **articole în reviste de categoria B**

5. Cemortan, I., Vorobjit, V., Capcelea, S., **Ulinici, M.**, Ursu, E., Croitoru, D., Grigoriev, T. Biologia virusului SARS-CoV-2: sinteză narativă. *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2020, nr. 1(23), pp. 8-16. ISSN 2345-1467.
6. **Ulinici M.**, Vorobjit V. COVID-19 – teste de neutralizare. *Sănătate publică, economie și management în medicină*. 2020, consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF "Nicolae Testemițanu", 21-23 octombrie 2020. 5(87) 2020, pp.96-100. ISSN 1729-8687.

- **Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice naționale și internaționale**

7. **Ulinici, M.**, Vorobjit V., COVID-19 – teste de neutralizare. In: *Abstract book – Congresul (online) consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF "Nicolae Testemițanu"*. 21 - 23 octombrie 2020, p.178.
8. **Ulinici M.**, Licastro D, Dal Monego S, Rajasekharan S, Marcello A. Înregistrarea și publicarea rezultatelor secvențierii complete a genomului SARS-CoV-2 ce circulă pe

- teritoriul RM, în repozitoriul internațional *GISAID*, 24 august 2020. <https://doi.org/10.55876/gis8.221017uv>.
9. **Ulinici M**, Licastro D, Dal Monego S, Rajasekharan S, Marcello A. Înregistrarea și publicarea rezultatelor secvențierii complete a genomului SARS-CoV-2 ce circulă pe teritoriul RM, în baza de date *NEXTSTRAIN*, august 2020.
 10. **Ulinici M**, Licastro D, Dal Monego S, Orsini E, Groppa S, Todiras M, Paraschiv A, Buzurnii L, Marcello A. Înregistrarea și publicarea rezultatelor secvențierii complete a genomului SARS-CoV-2 ce circulă pe teritoriul RM, în repozitoriul internațional *GISAID*, 2 Septembrie 2021. <https://doi.org/10.55876/gis8.221017uv>.
 11. **Ulinici, M.**, Înregistrarea și publicarea rezultatelor secvențierii complete a genomului SARS-CoV-2 ce circulă pe teritoriul RM, în *NCBI*. 06.12.21. [PRJNA786454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36145454/)
 12. **Ulinici M.**, Development of a flow cytometry-based method to detect neutralising antibodies in SARS-COV-2 infection. *Materialele Conferinței științifico-practice naționale „Fiecare doză de vaccin contează”*. 28 aprilie 2023 la <https://journal.ohrm.bba.md/index.php/journal-ohrm-bba-md/issue/view/25>.
 13. **Ulinici M.**, Full genome sequence of the first SARS-COV-2 isolates detected in the republic of moldova. *One Health and Risk Management*, Supplement, VOL. 2, ISSUE 4, 2021.
 14. **Ulinici M.**, Production of lentivirus particles pseudotyped with SARS-COV-2 Spike protein for neutralisation or drug antiviral activity assays. *One Health and Risk Management*, materialele conferinței naționale cu participare internațională: „One Health Approach - achievements and challenges”, 23-24 noiembrie 2023.
 15. **Ulinici M.**, A high-content imaging-based technique for detecting neutralising antibodies in SARS-COV-2 infection. *One Health and Risk Management*, materialele conferinței internaționale: „Tendințe actuale și provocări în medicina preventivă”, 8-9 iunie 2023.
- **Participări active la forumuri științifice:**
 - ✓ **internaționale**
16. **Ulinici, M.**, Strengthening epidemiological surveillance capacity to address COVID-19 and other epidemics - Presentation of project's results and impact. *Workshop “Strengthening epidemiological surveillance capacity to address COVID-19 and other epidemics”*, Online event 21-22-23 SEPT 2021, A Republic of Moldova-Italy cooperation.
 17. **Ulinici, M.**, The role of humoral immunity in SARS-CoV-2. *1st edition of the National Conference with International participation the One Health approach in a Changing World*, Online, 4-5 November, 2021.
 18. **Ulinici, M.**, SARS-CoV-2: Cooperare științifică internațională în supravegherea și diagnosticarea virusului. *Simpozionul Național: "110 ani de la nașterea savantului George Emil Palade, tradiție și continuitate în cercetarea medicală românească"*. Târgu Mureș, România, 7-8 decembrie, 2022.
 19. **Ulinici, M.**, The Role of RT-PCR and Serology Tests in the Diagnosis and Management of COVID-19 patients. *Lecturer at XV International Summer School “Biology, Biotechnology and Biomedicine”*, Odesa, Ukraine. 29 iunie -10 iulie, 2020.
 20. **Ulinici M.**, COVID-19: Ce cunoaștem până acum despre noul coronavirus? *Noaptea Cercetătorilor Europeni 2020*. <https://noapteacercetatorilor.md/covid-19-ulinici-usmf> 15.11.2020.
 21. **Ulinici M.**, Setting up a diagnostic and surveillance laboratory from scratch. *Virus Detection and Biosecurity - A Capacity-Building Course in the Framework of Article X of the BWC*. Trieste Italy. 14-16 iunie 2023.

22. **Ulinici M.**, A high-content imaging-based technique for detecting neutralising antibodies in SARS-COV-2 infection. *Tendințe actuale și provocări în medicina preventivă*. Chișinău, Republica Moldova. 8-9 iunie 2023.

✓ **naționale**

23. **Ulinici M.**, Vorobjit, V. COVID-19 – teste de neutralizare. *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”* din Republica Moldova, 21-23 octombrie, Chișinău, 2020.
24. **Ulinici M.**, Raport “Evaluarea testării microbiologice și aspecte imunologice în COVID-19”. *Participare la masa rotundă organizată între AȘM și USMF*. 04.09.2020 <https://usmf.md/ro/noutati/cercetatorii-usmf-nicolae-testemitanu-vin-cu-noi-date-privind-evolutia-covid-19-tara>.
25. **Ulinici M.**, Rolul testelor de diagnostic în managementul pacienților cu COVID-19. Lector invitat la *Medtraining-ul organizat de ASRM Asociația Studenților și Rezidenților în Medicină din Moldova USMF*. Facebook, 26.11.2020.
26. **Ulinici M.**, Strategii de diagnostic în COVID-19. *Atelier de lucru: Strategii de diagnostic și prevenire a infecției COVID-19*. online. 09.02.21.
- **Participări la emisiuni media consacrate științei și educației, inovării și transferului tehnologic**
27. **Ulinici M.**, Interviu ICGEB: https://www.youtube.com/watch?v=Ve_6DXFZ8sM
28. **Ulinici M.**, "Informații despre genomul complet al SARS-CoV-2 izolat de la pacienții din RM" Participare la emisiune radio 23 09.2020. ora 10.15. http://trm.md/ro/spatiul-public/spatiul-public-din-23-septembrie2020?fbclid=IwAR0sLqrk6up6x9GeBbZkPjYoH3kis98BhgfGZN_KgzJTnP4bAzbyWjm91k
29. **Ulinici M.**, "Covid-19 – provocarea anului 2020". Participare la emisiune radio, Radio Vocea Speranței. Facebook 24.11.2020, Mariana Ulinici - Covid 19 – provocarea anului 2020 - YouTube
30. **Ulinici M.**, Participare la dialoguri interactive între cercetători în cadrul evenimentului Noaptea Cercetătorilor Europeni 2020. https://usmf.md/ro/noutati/noaptea-cercetatorilor-europeni-la-chisinau?fbclid=IwAR2OzEgIZsa_bqTAPlnEOFyfZmh2exjixQEZSMir-juS4j6ifOxY81vjEPA; Noaptea Cercetătorilor Europeni 2020 (privesc.eu) minutul - 5:04:50, 27.11.2020
31. **Ulinici M.**, Participare la Emisiunea „Concret” despre vaccinurile anti-COVID și maratonul vaccinării”, TV Moldova1, 24 mai la 17:15 . <https://www.facebook.com/tvmoldova1/videos/230641248427050>
32. **Ulinici M.**, Participare la Emisiunea „Miezul Zilei”, TV Moldova1, 26 septembrie, 2021. <https://www.facebook.com/teleradiomoldova/videos/395699578798680>
33. **Ulinici M.**, Participare la Emisiunea „Fii sănătos cu Maria Marian”, Jurnal TV, 22.11.21, ora 18:00 <https://www.facebook.com/watch/?v=183617873984484&ref=sharing>
34. **Ulinici M.**, Interviu Sănătate Info: http://www.sanatateinfo.md/News/Item/10934?fbclid=IwAR2GI6JGjCipGeYzKrfHWzTNEEx8gm1JUigAPxqx1cjFt_aZTB8y9jHBqy64
35. **Ulinici M.**, Interviu USMF: https://usmf.md/ro/noutati/mariana-ulinici-tot-ce-realizez-este-pentru-aduce-un-aport-dezvoltarea-stiintei-din?fbclid=IwAR0qQxupojj3jr9sPKpu8cdSMBx_xEsFB14F7_yiGW5xBF3eC8Lfhb0v4s
36. **Ulinici M.**, Participare la Mesager TV Moldova 1, minutul 5:40. https://fb.watch/aSBGXOXW_6/ <https://trm.md/ro/social/noi-metode-de-diagnostic-pentru-virusul-sars-cov-2>

37. **Ulinici M.**, Emisiunea: Pro sănătate: <https://youtube.com/playlist?list=PLX...> Radio Vocea Speranței Republica Moldova | Facebook 23 iunie 2022, ora 18:00
- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**
38. **Ulinici M.**, Test serologic pentru detectarea anticorpilor IgG anti SARS-COV-2 RBD. Certificat de Inovator Nr. 6043 din 03.05.2023.
39. **Ulinici M.**, Protocol de producere a vectorilor lentivirali pseudotipizați cu proteina Spike SARS-CoV-2. Certificat de Inovator Nr. 6045 din 04.05.2023.
40. **Ulinici M.**, Test serologic pentru detectarea anticorpilor IgG anti SARS-COV-2 RBD. Act de implementare nr. 73 din 05.05.2023.
41. **Ulinici M.**, Test serologic pentru detectarea anticorpilor IgG anti SARS-COV-2 RBD. Act de implementare nr. 01-4/79 din 05 mai 2023.
42. **Ulinici M.**, Test serologic pentru detectarea anticorpilor IgG anti SARS-COV-2 RBD. Act de implementare nr. 01-9/166 din 10.05.2023.
43. **Ulinici M.**, Protocol de producere a vectorilor lentivirali pseudotipizați cu proteina Spike SARS-CoV-2. Act de implementare nr. 75 din 05.05.2023.
44. **Ulinici M.**, Protocol de producere a vectorilor lentivirali pseudotipizați cu proteina Spike SARS-CoV-2. Act de implementare nr. 01-4/78 din 05.05.2023.
45. **Ulinici M.**, Protocol de producere a vectorilor lentivirali pseudotipizați cu proteina Spike SARS-CoV-2. Act de implementare nr. 01-9/166 din 05.05.2023.
- **Stagiu de cercetare peste hotare**
46. **Ulinici M.**, THE ARTURO FALASCHI ICGEB Short-term FELLOWSHIP at a PhD level (F/MDA20-01). Perioada: 04.06.21-30.08.21.
47. Visiting researcher în cardul proiectului: Capacity building in Virus Surveillance to tackle COVID-19 and beyond. Parteneri: ICGEB, Trieste Italia. (ICGEB, grant nr. CUP:D87D20000020009), Laboratorul de virusologie moleculară, ICGEB, Trieste, Italia: 15.10.21- 19.12.21