

Rezumatul activității și a rezultatelor obținute în subprogram în anul 2025**Supravegherea rezistenței la antimicrobiene în biosubstrate umane și elemente de mediu bazată pe tehnologia metagenomică**Codul subprogramului 130103**Rezumat pentru anul 2025**

În anul 2025, activitățile de cercetare au fost realizate conform acțiunilor planificate în cadrul subprogramului, având ca obiectiv implementarea și validarea secvențierii metagenomice pentru supravegherea rezistenței la antimicrobiene (RAM) în biosubstrate umane și elemente de mediu, în abordare de tip „O Singură Sănătate”. Analiza surselor relevante (PubMed, Mendeley, Google Scholar, OMS și alte organizații internaționale) a evidențiat că secvențierea metagenomică de generație următoare (mNGS) permite analiza materialului genetic din probă. În anumite contexte clinice, mNGS poate crește detectarea agenților patogeni, inclusiv din probe obținute minim invaziv. Totodată, este subliniată necesitatea interpretării prudente, deoarece performanța depinde de factori pre- și post-analitici, iar corelația dintre determinanții genetici și fenotipul real de rezistență nu este completă pentru toate mecanismele. Pentru asigurarea desfășurării corecte și responsabile a cercetării, precum și a confidențialității și protecției datelor, a fost obținut avizul favorabil al Comitetului de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu”, care confirmă respectarea principiilor etice în recrutare și utilizarea probelor și aplicarea măsurilor de securizare a informațiilor pe parcursul întregului proces. Din punct de vedere metodologic, în anul 2025 au fost implementate și validate două abordări complementare: secvențierea 16S rRNA pe platforma Illumina MiSeq și secvențierea metagenomică shotgun pe platforma Oxford Nanopore Technologies (ONT), asigurând caracterizarea comunităților microbiene din eșantioane complexe și, în cazul abordării shotgun, premize pentru evaluarea potențialului genetic, inclusiv a determinanților asociați RAM. Pentru standardizarea procesului de prelevare a fost elaborată Procedura Operațională Standard (POS) și au fost organizate sesiuni de instruire pentru personalul medical implicat. În componenta clinică au fost colectate 39 de probe biologice de la pacienți internați în patru instituții medicale din municipiul Chișinău, în baza acordurilor de colaborare. Probele au inclus mase fecale (35,9%), probe de mucoasă gastrică superficială (23,1%) și lavaj traheal (41,0%). După transportul la Laboratorul Național de Referință în secvențiere genomică al ANSP, s-a efectuat extracția ADN cu QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit și cuantificarea prin metoda fluorimetrică Qubit. Rezultatele probelor testate au evidențiat absența detectării *Helicobacter pylori* în probele gastrice analizate, o diversitate microbială scăzută în probele de lavaj traheal cu predominanța *Streptococcus spp.* și *Prevotella spp.* și detectarea unor bacterii cu potențial patogen (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*), precum și o diversitate ridicată a microbiotei intestinale în probele fecale, inclusiv identificarea *Clostridioides difficile* și *Salmonella enterica*. În componenta de mediu, pentru determinarea și caracterizarea colecției de gene de rezistență au fost colectate 66 de probe de ape reziduale din cadrul S.A. Apă-Canal Chișinău, prelevate la intrarea în stația de epurare cu prelevator automat. Probele au fost procesate imediat pentru extracția acizilor nucleici și depozitate la -70°C . Secvențierea a fost realizată prin ONT MinION Mk1B (Rapid Sequencing DNA Barcoding), iar analiza preliminară prin EPI2ME (workflow Metagenomics) a evidențiat o diversitate ridicată de gene de rezistență, frecvent asociate cu plasmide, indicând un potențial crescut de transfer genetic orizontal. Având în vedere caracterul complex al analizei metagenomice, profilul detaliat al rezistenței la antimicrobiene va fi prezentat după definitivarea și validarea analizei bioinformatică.

Summary for the year 2025

In 2025, the research activities were carried out in accordance with the planned actions of the sub-programme, with the objective of implementing and validating metagenomic sequencing for antimicrobial resistance (AMR) surveillance in human biospecimens and environmental matrices, within a *One Health* approach. Analysis of relevant sources (PubMed, Mendeley, Google Scholar, WHO and other international organizations) has shown that metagenomic next-generation sequencing (mNGS) allows the analysis of genetic material in the sample. In certain clinical contexts, mNGS can increase the detection of pathogens, including from samples obtained minimally invasively. At the same time, the need for cautious interpretation is emphasized, since performance depends on pre-analytical and post-analytical factors, and the correlation between genetic determinants and the actual resistance phenotype is not complete for all mechanisms. To ensure the proper and responsible conduct of the research, as well as confidentiality and data protection, a favourable opinion was obtained from the Research Ethics Committee of Nicolae Testemițanu State University of Medicine and Pharmacy, confirming compliance with ethical principles in recruitment and sample use and the application of information security measures throughout the study. From a methodological perspective, two complementary approaches were implemented and validated in 2025: 16S rRNA sequencing on the Illumina MiSeq platform and shotgun metagenomic sequencing on the Oxford Nanopore Technologies (ONT) platform, enabling characterization of microbial communities in complex samples and, in the case of the shotgun approach, providing a basis for assessing genetic potential, including determinants associated with AMR. To standardize sample collection, a Standard Operating Procedure (SOP) was developed and training sessions were organized for the involved medical staff. Within the clinical component, 39 biological samples were collected from hospitalized patients in four medical institutions in Chișinău, based on collaboration agreements. The samples included stool specimens (35.9%), superficial gastric mucosa samples (23.1%) and tracheal lavage samples (41.0%). After transport to the National Reference Laboratory for Genomic Sequencing of the National Agency for Public Health, DNA extraction was performed using the QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit and DNA concentration was measured by Qubit fluorimetry. The results of the tested samples revealed the absence of detection of *Helicobacter pylori* in the analyzed gastric samples, a low microbial diversity in the tracheal lavage samples with a predominance of *Streptococcus spp.* and *Prevotella spp.* and the detection of potentially pathogenic bacteria (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*), as well as a high diversity of the intestinal microbiota in the fecal samples, including the identification of *Clostridioides difficile* and *Salmonella enterica*. Within the environmental component, to determine and characterize the collection of resistance genes, 66 wastewater samples were collected from S.A. Apă-Canal Chișinău at the inlet of the wastewater treatment plant using an automatic sampler. Samples were processed immediately for nucleic acid extraction and stored at -70°C . Sequencing was performed using the ONT MinION Mk1B (Rapid Sequencing DNA Barcoding), and preliminary analysis via EPI2ME (Metagenomics workflow) revealed a high diversity of resistance genes, frequently associated with plasmids, indicating an increased potential for horizontal gene transfer. Given the complexity of metagenomic data analysis, the detailed AMR profile will be presented after completion and validation of the bioinformatic analysis.

Coordonatorul subprogramului
de cercetare

BURDUNIUC Olga

(numele, prenumele)

_____ (semnătura)

Data: _____

Notă: Rezumatul va fi publicat în acces deschis pe pagina web oficială a AȘM, însoțite de avizul Biroului Secției de științe a AȘM. Rapoartele care nu vor conține rezumatele perfectate conform cerințelor nu vor fi audiate.