



Universitatea
Ștefan cel Mare
Suceava

Nr. 29.469/16.12.2022

**Situație justificativă proiect pentru finanțarea din Fondul pentru Situații Speciale (FSS)
a activităților de monitorizare și testare a variantelor virusului SARS-CoV-2 pe teritoriul
României
în cadrul Universității „Ștefan cel Mare” din Suceava**

Denumire proiect

Activități de monitorizare și testare a variantelor virusului SARS-CoV-2 pe teritoriul României

Suma aprobată:

207.000 lei conform adresei Ministerului Educației nr. 24626/15.02.2022, înregistrată la Universitatea Ștefan cel Mare din Suceava (USV) cu nr. 3759/16.02.2022 de aprobare a utilizării Fondului de situații speciale (FSS) pentru derularea activităților de monitorizare și testare a variantelor virusului SARS-CoV-2 pe teritoriul României

Necesitatea și scopul proiectului

Finanțarea a răspuns unei situații speciale generată de răspândirea a noi tulpini ale virusului SARS-CoV-2 cu potențial infecțios crescut pe teritoriul României. Identificarea inițială a mutațiilor și, implicit a variantelor virale, se face exclusiv pe baza secvențierii, analiză recomandată la nivel european și mondial. Având în vedere necesitatea derulării urgente a unor studii avansate în contextul actual al pandemiei SARS-CoV-2 pentru secvențierea genomului SARS-CoV-2, cercetării variantelor virusului circulante pe teritoriul României și a realizării de baze de date genomice Sars-CoV-2, activitățile descrise în continuare se constituie ca situație specială care se regăsește în Ordinul Ministerului Educației nr. 5823/2021, articolul 2, alin. (3), litera (g), după cum urmează: *asigurarea în timpul exercițiului financiar a finanțării acelor cheltuieli cu caracter neprevăzut și de urgență, care nu au fost cuprinse în bugetul inițial.*



Universitatea
Ștefan cel Mare
Suceava

Activități derulate în cadrul proiectului

Toate activitățile prevăzute pentru 2022 au fost desfășurate conform planului de realizare și au constat, în principal, în continuarea monitorizării variantelor virale în o serie de probe clinice, precum și dezvoltarea capacităților de testare prin metode de secvențiere.

Persistența agenților virali infecțioși precum Sars-CoV-2 în populația globului presupune și certitudinea evoluției genotipice și fenotipice a acestora. Acest lucru induce o serie de provocări, atât în plan epidemiologic, dar și în ceea ce privește managementul sanitar, precum și capacitatea de detecție timpurie și precisă a acestor agenți. Universitatea „Ștefan cel Mare” din Suceava a fost una din primele instituții care a realizat secvențierea genomului virusului SARS-CoV-2 în România în anul 2020 (și singura universitate) și printre primele care a identificat tulpina de interes VOC B.1.1.7, originară din UK, pe teritoriul României, datorită unei expertize adecvate. Având în vedere aceasta, o instituție academică poate să devină furnizor de expertiză, pregătind viitori specialiști sau formând pe cei existenți. Astfel, USV a implementat, pe lângă testarea unui număr de peste 100 de probe de Sars-CoV-2, infrastructura necesară pentru instruirea studenților și a specialiștilor în biologie moleculară în testarea prin secvențiere de generația a 2-a, și, suplimentar, de generație a 3-a. Totodată, s-au asigurat condițiile necesare desfășurării în siguranță a activităților, precum și asigurarea unei capacități suplimentare pentru stocarea datelor rezultate în urma unui volum crescut de probe și analize de laborator și asigurarea unei capacități suplimentare pentru procesarea și interpretarea datelor complexe obținute în urma proceselor de secvențiere genomică.

Prezentăm, în continuare, sinteza principalelor activități desfășurate, a rezultatelor obținute și a cheltuielilor efectuate în scopul atingerii obiectivului proiectului.

S-au selectat un număr de 260 de probe clinice, constând în extracte ARN, provenite din exsudate nazo-faringiene, din cadrul Spitalului Județean Suceava, care au fost transportate la Laboratorul de Metagenomică și Biologie Moleculară al USV. Selecția s-a realizat pe baza valorilor Ct obținute la testarea în scop de diagnostic. După transportul la sediul beneficiarului, probele au fost alicotate și procesate, în vederea stabilirii cantității de ARN conținută, pentru a determina parametrii necesari următoarelor activități de biologie moleculară. S-au achiziționat



consumabile de tip vârfuri de pipetă pentru evitarea contaminării, personalul a fost echipat corespunzător, pentru a evita infectarea acestuia, iar în această etapă s-a realizat o bază de date electronică pentru 260 de probe și, pe baza identificării cantității de ARN conținută și a altor criterii de calitate, au fost selectate 120 de probe pentru analize ulterioare.

S-au achiziționat reactivii necesari pentru revers-transcripția probelor biologice, pregătirea, purificarea și cuantificarea și secvențierea lor prin tehnici de generația a doua. S-a analizat prin tehnica Realtime PCR cantitatea de virus prezentă în probe și, pe această bază, s-au determinat parametrii necesari secvențierii. Au rezultat un număr de 110 probe corespunzătoare calitativ (Fig. 1). Valorile au fost tabulate și s-a constituit o bază de date electronică cu probele analizate și datele asociate.



Fig. 1 Curbele de amplificare RT-PCR în vederea screening-ului probelor



Universitatea
Ștefan cel Mare
Suceava

După realizarea revers-transcripției, s-a realizat pregătirea librărilor și s-a efectuat secvențierea prin tehnici de generația a 2-a, Ion Torrent, a unui număr de 60 de probe. Inițial, s-au urmărit parametrii de calitate ai librărilor încărcate pe chip-uri, constatându-se o eficiență foarte bună, cu peste 85% librării de calitate (Fig. 2).

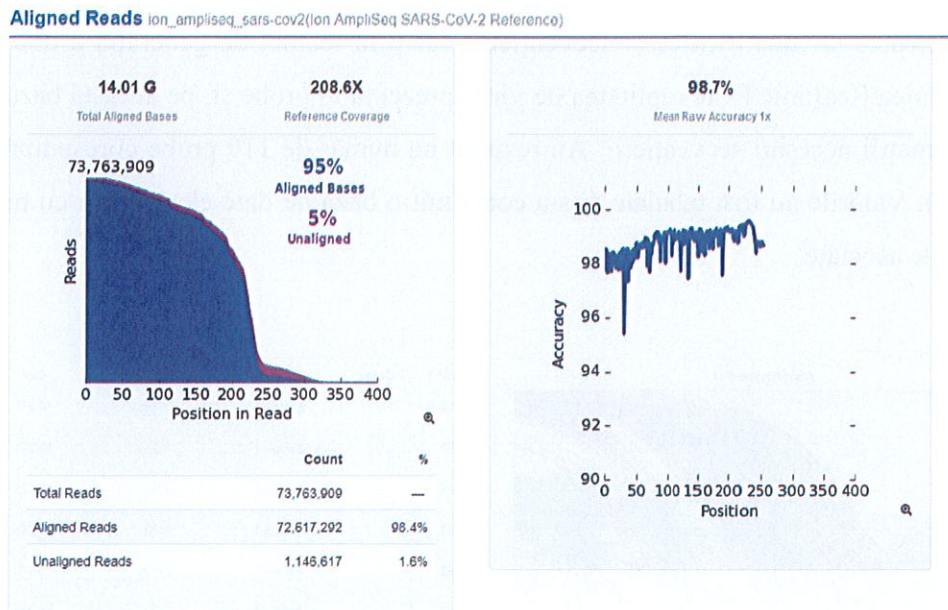


Fig. 2 Parametrii de calitate ai librărilor genetice

În urma analizei bioinformatică, s-a constatat că majoritatea probelor aparțineau variantelor BA 5.1, 5.2, BF 7 și subvariantelor acestora (Fig. 3).

Barcode	Sample	Lineage	Pangolin QC	Note	Most common countries
IonXpress_001	65167	BA.5.2.1	pass	Usher placements: BA.5.2.1(2/2)	United States of America 44.0%, United Kingdom 10.0%, Denmark 5.0%, Israel 4.0%, France 4.0%
IonXpress_002	64999	BF.7	pass	Usher placements: BF.7(1/1)	
IonXpress_003	65028	BA.5.2	pass	Usher placements: BA.5.2(1/1)	United States of America 22.0%, United Kingdom 12.0%, Israel 7.0%, Indonesia 7.0%, France 7.0%
IonXpress_004	64960	BA.5.2.1	pass	Usher placements: BA.5.2.1(1/1)	United States of America 44.0%, United Kingdom 10.0%, Denmark 5.0%, Israel 4.0%, France 4.0%
IonXpress_006	64943	BA.5.2.1	pass	Usher placements: BA.5.2.1(1/1); scorpio found insufficient support to assign a specific lineage	United States of America 44.0%, United Kingdom 10.0%, Denmark 5.0%, Israel 4.0%, France 4.0%
IonXpress_007	64950	BA.5.2	pass	Usher placements: BA.5.2(1/1)	United States of America 22.0%, United Kingdom 12.0%, Israel 7.0%, Indonesia 7.0%, France 7.0%
IonXpress_008	64951	BA.5.2	pass	Usher placements: BA.5.2(1/1)	United States of America 22.0%, United Kingdom 12.0%, Israel 7.0%, Indonesia 7.0%, France 7.0%
IonXpress_009	64871	BA.5.1	pass	Usher placements: BA.5.1(2/2)	United Kingdom 14.0%, United States of America 14.0%, France 14.0%, Denmark 9.0%, Germany 7.0%

Fig. 3 Încadrarea taxonomică a variantelor identificate prin secvențiere



Universitatea
Ștefan cel Mare
Suceava

S-au achiziționat kituri specifice și s-a realizat încadrarea genetică a unui număr de 50 de probe, utilizându-se o tehnică de secvențiere de a 3-a generație NGS, pe platforma Oxford Nanopore. Aceasta permite identificarea genomului virusului SARS-CoV-2, într-un număr redus de pași, nemaifiind necesară amplificarea fragmentelor de ARN, ci permite citirea secvențelor lungi, de până la 20 kb sau mai mult. Astfel, la nivelul laboratorului, s-a implementat o tehnică de secvențiere rapidă și mai economicoasă, reducând costurile cu aproximativ 40%. La această tehnică, la fel ca la cea de generație a 2-a, s-au urmărit parametrii de calitate ai secvențierii, constatându-se o eficiență bună a pregătirii librăriilor (Fig. 4). Totodată, analiza bioinformatică pe platforma Epi2Me a relevat rezultate similare cu cele obținute pe platforma Ion Torrent. În prezent, laboratorul a fost dezvoltat, prin achiziționarea de tehnică de secvențiere de generația a 3-a, putând să secvențeze un număr de peste 24 de probe simultane de agenți patogeni, infecțioși sau virali, simultan, prin această tehnică.



Fig. 4. Parametrii de calitate ai secvențierii pe platforma Oxford Nanopore

Pentru a analiza posibilitatea corelării anumitor variante virale cu existența unor agenți patogeni bacterieni, în probe de mediu, s-a realizat și secvențierea regiunilor genetice de tip 16S, prin aceleași tehnici de secvențiere de generația a 3-a. S-au identificat prin această metodă, un număr de peste 2000 de taxoni microbieni (Fig. 5), pentru care s-au tabulat frecvențele și incidența alături de Sars-CoV-2.

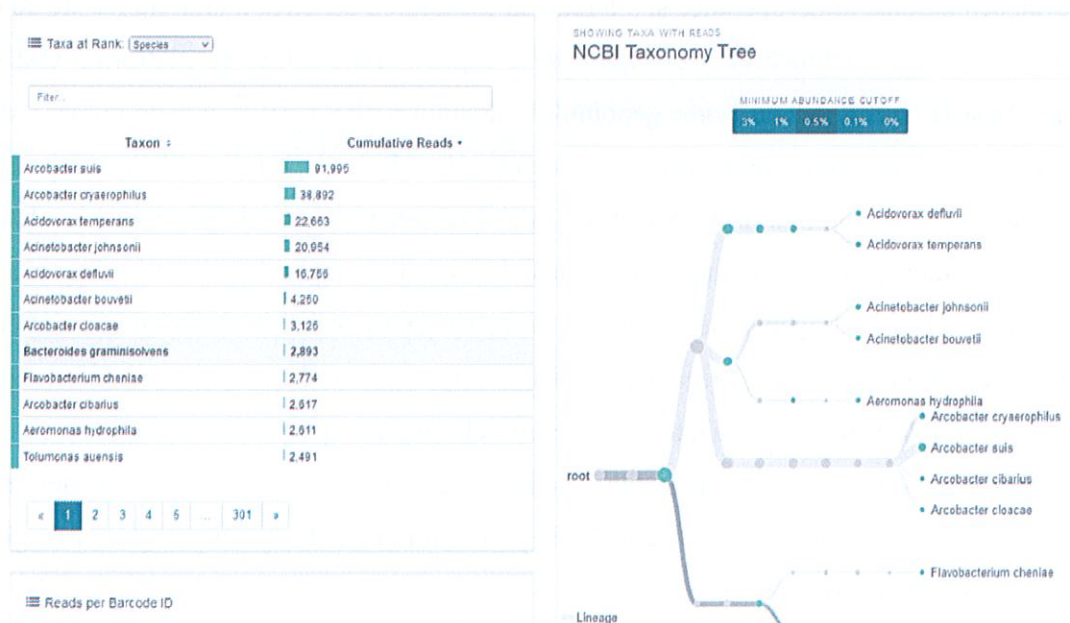


Fig. 5 Încadrarea taxonomică a identităților 16S analizate prin secvențiere Oxford Nanopore

Având în vedere volumul mare de date rezultate în urma proceselor de secvențiere genomică, s-a achiziționat, conform planului, o capacitate suplimentară pentru stocarea datelor rezultate, sub forma de medii de stocare de tip SSD.

De asemenea, pentru a dezvolta competențele resursei umane într-un domeniu aflat în continuă evoluție (secvențierea genomică și bioinformatică) și pe o tematică nouă omenirii (virusul SARS-CoV-2), s-a achiziționat tehnică medicală și accesorii pentru instruire tehnici de biologie moleculară – analiză de tip mini PCR, ce permite amplificarea unui număr redus de probe, cu economie de reactivi. În acest sens, aparatura de tip PCR a fost completată cu componente auxiliare, de tip microcentrifugi și vizualizatoare pentru geluri de agaroză. Totodată, s-au achiziționat pentru instruirea personalului de laborator în tehnici de analiză a produșilor de expresie genică, prin amplificare și vizualizare în fluorescență.

La aceste activități, personalul laboratorului a fost instruit în tehnologiile noi de secvențiere, inclusiv pentru SARS-CoV-2, s-a optimizat fluxul de lucru, s-a actualizat baza de date electronică cu probe și secvențe genetice. Mai mult decât atât, pentru aceste activități, s-au achiziționat și implementat reactivi și consumabile pentru capabilități de analiză de proteine, inclusiv cele provenite de la Sars-CoV-2 prin detectarea semnăturii moleculare la trecerea prin



Universitatea
Ștefan cel Mare
Suceava

nanopori sintetici, completând astfel informațiile genetice asupra virusului, a produșilor săi de expresie genică, dar și a interacțiunii cu gazda. Instruirea personalului a cuprins și derularea unui curs legat de conceptul de spin-off în domeniul biomedical la care au participat un număr de 10 persoane din cadrul universității.

În concluzie, toate obiectivele au fost îndeplinite, iar pentru realizarea activităților prezentate au fost achiziționate, conform planului, consumabile și servicii specifice secvențierii necesare pentru procesarea, transportul, manipularea probelor, instruirea în tehnici avansate de biologie moleculară și metagenomică a resursei umane, procesarea bioinformatică a datelor metagenomice.

Raportul de execuție bugetară

Titlul proiectului: Activități de monitorizare și testare a variantelor virusului SARS-CoV-2 pe teritoriul României	
Coordonator proiect: Mihai DIMIAN	
Sumă proiect solicitată	336.000
Sumă proiect aprobată	207.000
Disponibil	0.00
Tipul cheltuielii	Suma *Lei)
Cheltuieli consumabile reactivi secvențiere generația a 2-a (secvențiere NGS) Furnizor ANTISEL SRL Factura nr. 25120/15.06.2022	62.356,00
Cheltuieli consumabile reactivi secvențiere generația a 3-a (secvențiere Nanopore) Furnizor DEXTER SRL Factura nr. 18434/15.06.2022	29.876,14
Cheltuieli consumabile reactivi secvențiere generația a 3-a (secvențiere Nanopore) Furnizor DEXTER SRL Factura nr. 18985/14.10.2022	12.978,14
Cheltuieli consumabile reactivi secvențiere generația a 3-a (secvențiere Nanopore) Furnizor DEXTER SRL Factura nr. 18697/26.07.2022	2.142,00
Cheltuieli consumabile procesare și testare adițională Furnizor ANTISEL SRL Factura nr. 26570/01.11.2022	22.629,70
Cheltuieli consumabile procesare și testare adițională Furnizor ADIS INTERNATIONAL Factura nr. 26570/01.11.2022	1.294,83
Cheltuieli consumabile procesare și testare adițională Furnizor DEXTER SRL Factura nr. 19117/09.11.2022	8.507,31



Universitatea
Ștefan cel Mare
Suceava

Tehnică medicală și accesorii pentru instruire tehnici de biologie moleculară – PCR Furnizor SOLUTION PLUS SRL Factura nr. 19962.10/01.11.2022	44.855,97
Cheltuieli consumabile măsuri suplimentare de biosiguranță în laborator Furnizor ANTISEL SRL Factura nr. 2621/04.10.2022	3.332,00
Cheltuieli consumabile măsuri suplimentare de biosiguranță în laborator Furnizor MKD medicale Factura nr. 372755/20.09.2022	565,02
Cheltuieli instruire spin-off biomedical Furnizor CODECS SA Factura 10731/25.11.2022	8.185,06
Suplimentare capacitate de stocare și procesare bioinformatică a datelor metagenomice Furnizor SOLUTION PLUS SRL Factura nr. 19725.10/19.09.2022	2.968,63
Cheltuieli consumabile procesare și testare adițională Furnizor DEXTER SRL Factura nr. 19339/15.12.2022	1.013,88
Cheltuieli consumabile procesare și testare adițională Furnizor DEXTER SRL Factura nr. 19340/15.12.2022	5.460,91
Cheltuieli consumabile procesare și testare adițională Furnizor DEXTER SRL Factura nr. 19341/15.12.2022	819,91
Cheltuieli consumabile procesare și testare adițională Furnizor UNIQIT SYSTEM SRL Factura nr. 21148/02.05.2022	14,5
TOTAL CHELTUIELI EFECTUATE	207.000