

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

Denumire proiect

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

Număr de înregistrare Ministerul Educației: 101-GP-10.03.2021 și 26513-12.03.2021

Suma aprobată:

226.200 lei conform adresei Ministerului Educației nr. 101/GP/26513/22.04.2021, înregistrată la Universitatea Ștefan cel Mare din Suceava (USV) cu nr. 8973/27.04.2021 de aprobare a utilizării Fondului de situații speciale (FSS) pentru susținerea 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 apariția și răspândirea unor noi variante ale virusului SARS-CoV-2 pe teritoriul României, cu potențial infecțios și severitate a manifestărilor crescute, fiind necesar un aport de finanțare pentru derularea de studii avansate pentru secvențierea genomului SARS-CoV-2 și identificării noilor variante ale virusului răspândite pe teritoriul României. Această situație specială s-a încadrat în Ordinul Ministerului Educației nr. 3322/2021, 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.*

Activități derulate în cadrul proiectului

Toate activitățile prevăzute pentru 2021 au fost desfășurate conform planului de realizare. Proiectul și-a propus și a realizat monitorizarea și testarea unei serii de probe virale SARS-CoV-2, provenite de la pacienți de pe teritoriul României, într-o serie de etape, de la condiționarea și pregătirea probelor, screening-ul unor tulpini cu potențial epidemiologic crescut, până la secvențierea propriu-zisă și analiza bioinformatică. Reamintim că 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. În noul context, activitățile au constat, conform planului, atât în desfășurarea procedurilor obișnuite de lucru cât și în acțiuni suplimentare precum asigurarea unui grad ridicat de siguranță a personalului și a spațiilor utilizate, instruirea personalului propriu și al colaboratorilor, 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-a achiziționat și s-a efectuat transportul probelor selectate de la parteneri din județele Timișoara și Cluj, în condiții de temperatură scăzute, la -80° , probe care s-au adăugat celor selectate din cadrul județului Suceava, încercând astfel să asigurăm o monitorizare a situației în diverse regiuni ale țării, regiuni care nu dispuneau de centre pentru efectuarea secvențierii virusului. În acest sens, s-a asigurat transportul cu mijloace auto dotate cu unități de congelare, pe gheață carbonică, a unui număr de 80 de probe, realizându-se, totodată, și evitarea contaminării lor. La acestea s-au adăugat 70 de probe selectate din cadrul Spitalului Județean Suceava, conducând la 150 de probe de virus SARS-CoV-2 selectate și transportate la Laboratorul de Metagenomică și Biologie Moleculară al USV. 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. Pentru aceasta, au fost achiziționate și s-au utilizat pipete dedicate doar acestui scop, pentru a reduce posibilitatea contaminării, tuburi de polipropilena sterile și vârfuri de pipetă de unică folosință. De asemenea, personalul a fost echipat corespunzător, pentru a evita infectarea acestuia sau contaminarea probelor.

În urma acestei etapă s-a realizat o bază de date electronică pentru 150 de probe și, pe baza identificării cantității de ARN conținută și a altor criterii de calitate, au fost selectate 100 de probe pentru analiza prin tehnica Real time PCR.

- S-au achiziționat reactivi specifici și s-a realizat analiza prin tehnica Real time PCR a unui număr de 100 de probe în vederea identificării rapide a probelor cu potențial ridicat de noi variante de îngrijorare la nivel național și european. Aceasta a permis, cu kituri (reactivi) specifice, depistarea tulpinilor cu anumite mutații într-un interval de aproximativ 3 ore, comparativ cu intervalul de 2 săptămâni necesar unui proces complet de secvențiere, oferind însă informații doar despre regiuni restrânse din genomul viral. Pentru aceasta activitate, probele selectate au fost procesate, respectând protocoalele indicate de producător. S-au analizat un număr de 100 de probe, folosind kit-ul EliGene Delta RT, care depistează mutațiile L452R și P681R, specifice variantei Delta a SARS-CoV-2. Rezultatele obținute au indicat apartenența a 79 din cele 100 de probe la varianta Delta, cu valori ale Ct – cycle threshold, între 14 și 37 (**Figurile 1 și 2**). Valorile au fost tabulate și s-a constituit o bază de date electronică cu probele analizate și datele asociate.

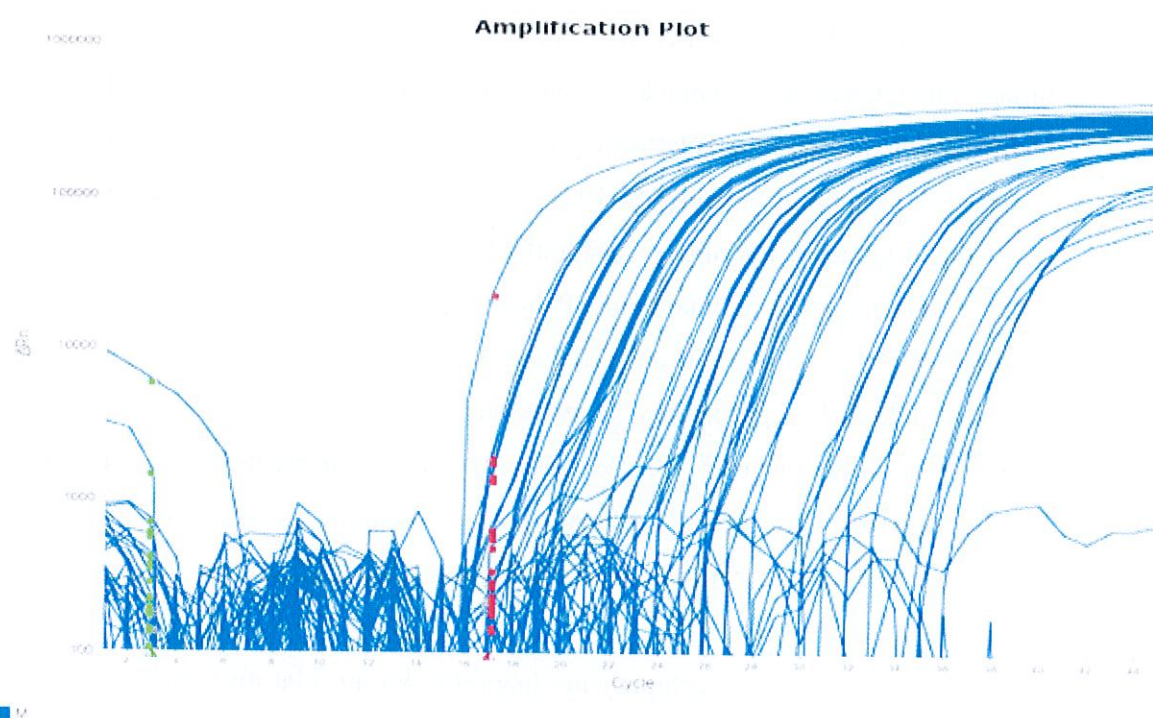


Figura 1. Curbele de amplificare RT-PCR pentru mutația L452R

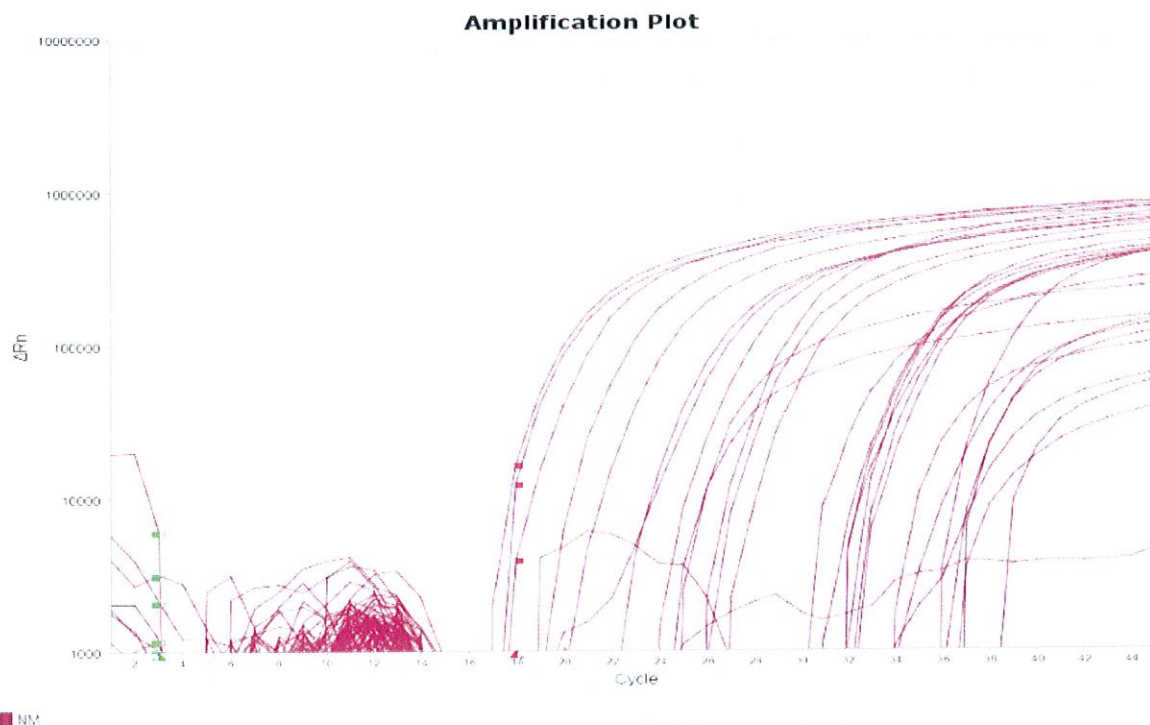


Figura. 2. Curbele de amplificare RT-PCR pentru mutația P681R

- S-au achiziționat kituri specifice și s-a realizat caracterizarea genetică completă a 60 de probe, utilizându-se o tehnică de secvențiere de ultimă generație (NGS – Next-Generation Sequencing), pe platforma Ion Torrent. Aceasta permite obținerea informației complete a genomului virusului SARS-CoV-2, putându-se astfel depista diferențele față de tulpina originală a virusului și încadrarea fiecărei probe într-o anumită variantă virală, conform nomenclurii internaționale. Pentru caracterizarea genetică completă a probelor de SARS-CoV-2, s-a efectuat cuantificarea titrului viral al probelor, revers-transcripția, pregătirea librăriilor, purificarea și secvențierea propriu-zisă (platforma Ion Torrent), folosind kit-urile recomandate de producătorul echipamentelor de secvențiere și achiziționate în cadrul acestui proiect, conform planului de realizare. Dintre probele secvențiate, 89% au aparținut variantei Delta a Sars-CoV-2, iar restul unor variante mai vechi, din ramurile 20B și 20C.
- Având în vedere faptul că echipamentele laboratorului au rulat un număr semnificativ de probe pe parcursul ultimilor 2 ani, s-au achiziționat, conform planului, servicii de calibrare a echipamentelor specifice, pentru o funcționare optimă a acestora și pentru menținerea nivelului ridicat de calitate a rezultatelor obținute.

- 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. De asemenea, având în vedere capacitatea mare de calcul necesară procesării rapide și interpretării datelor complexe obținute în urma proceselor de secvențiere genomică, s-a achiziționat, conform planului, tehnică de calcul pentru procesarea bioinformatică a datelor. S-au realizat analize bioinformatică asupra secvențelor Sars-CoV-2 și s-a completat baza de date realizată cu ocazia colectării primare a probelor. În urma analizei, s-a demonstrat apartenența probelor secvențiate la variantele 20B, 20C și Delta și s-a generat un arbore filogenetic, contextual, incluzând secvențe genomice de la nivel global (**Figura 3**). Prin analiza de tip Blast s-a determinat zona geografică posibilă de origine a probelor secvențiate.

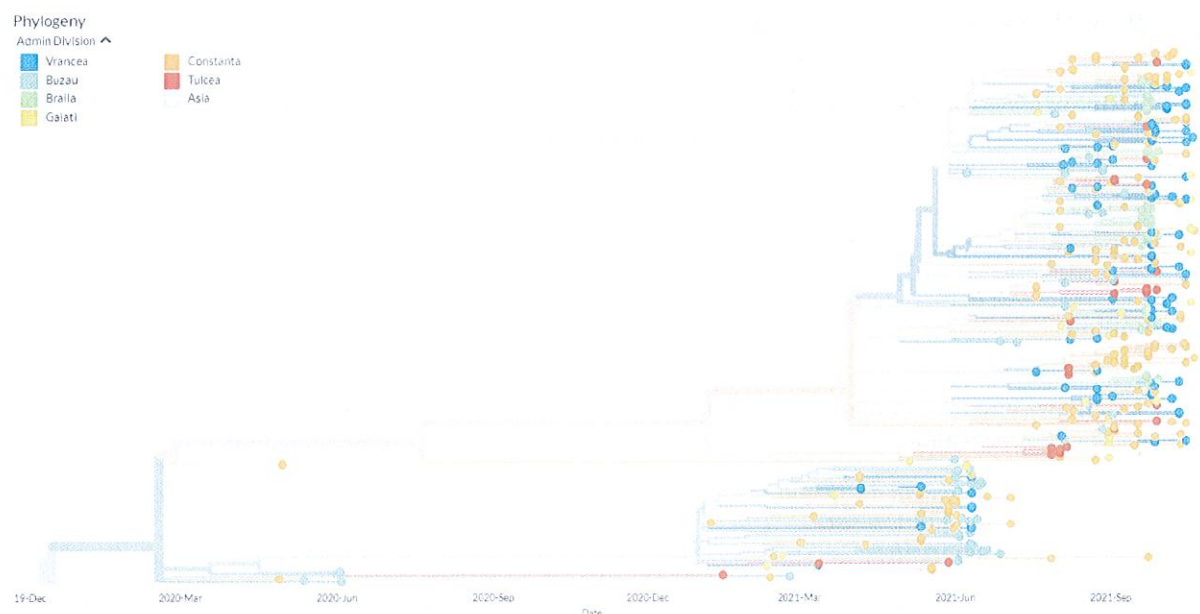


Figura 3. Analiza filogenetică a probelor de Sars-CoV-2 secvențiate, în context global

- 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-au achiziționat și efectuat instruirii ale personalului propriu de către reprezentanți ai furnizorilor de echipamente de secvențiere (instruire organizată de compania Antisel) ai altor universități din străinătate (workshop organizat de Universitatea din Edinburgh). De asemenea, s-au achiziționat calculatoare în vederea instruirii personalului pentru analiza datelor și bioinformatică. 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-au actualizat resursele electronice ale sistemului și s-a beneficiat de consultanță în obținerea datelor de secvențiere și analiza lor bioinformatică. La rândul nostru, am împărtășit din experiența și expertiza acumulată, un expert al USV deplasându-se la UMF Timișoara pentru efectuarea unei sesiuni de instruire pentru realizarea secvențierii genomului virusului SARS-CoV-2 folosind tehnologiile NGS.

În concluzie, 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	246,200
Sumă proiect aprobată	226,200
Disponibil	0.00
Titlul cheltuielii	Suma (Lei)
Cheltuieli instruire tehnici avansate de biologie moleculară și metagenomică- Deplasare Andrei Lobiuc - instruire	2,141.58
Achizitie tehnica de calcul 10 bucăți *2490 lei/buc Furnizor SOLUTION PLUS SRL Factura nr 18244/27.10.2021	24,969.89
Suplimentare capacitate de stocare si procesare bioinformatica a datelor metagenomice Furnizor SOLUTION PLUS SRL Factura nr 18244/27.10.2021	3,067.96
Cheltuieli instruire tehnici avansate de biologie moleculară și metagenomică Andrei Lobiuc - FurnizorUNIVERSITY OF EDINBURG - Invoice S0175437/12.11.2021	914.93
Suplimentare capacitate de stocare si procesare bioinformatica a datelor metagenomice Furnizor SOLUTION PLUS SRL Factura nr 18402/23.11.2021	4,025.96
Cheltuieli consumabile necesare activității de secvențiere Furnizor ANTISEL SRL Factura 23474/08.12.2021	83,736.43

Pipete și accesorii pentru manipulare probe și reactivi Furnizor ANTISEL SRL Factura 23475/08.12.2021	12,642.56
Cheltuieli consumabile necesare activității de secvențiere Bile magnetice pentru purificare acizi nucleici, suporturi materiale biologice- Furnizor VALDO SRL Factura IS VAD 233/06.12.2021	31,546.90
Cheltuieli consumabile procesare adițională probe și calibrare echipamente, Furnizor ANTISEL SRL Factura 23486/09.12.2021	14,660.80
Cheltuieli instruire tehnici avansate de biologie moleculară și metagenomică - Furnizor AGRESIONE GROUP Factura 3314344/16.07.2021	4.00
Cheltuieli consumabile necesare activității de secvențiere- Eligene COVID19 Delta RT KIT 100 reactii Furnizor BIO YZME, Factura 2318/06.12.2021	2,499.00
Cheltuieli consumabile procesare adiționala probe și calibrare echipamente Oligo card, Furnizor DEXTER SRL, Factura 17628/10.12.2021	1,249.50
Cheltuieli consumabile necesare activității de secvențiere Furnizor Interlab Austria Factura INT 1318/10.12.2021	887.80
Cheltuieli transport probe testare în condiții de biosiguranță și la temperatură scăzută Cheltuieli transport probe testare în condiții de biosiguranță și la temperatură scăzută Transport gheata carbonica Furnizor VLASTON IMPEX SRL Factura F083/21.09.2021	2,975.00
Cheltuieli transport probe testare în condiții de biosiguranță și la temperatură scăzută- Transport gheata carbonica Furnizor VLASTON IMPEX SRL Factura 91/09.12.2021	3,332.00
Cheltuieli consumabile necesare activității de secvențiere Furnizor ANTISEL SRL Factura 23549/14.12.2021	25,544.54
Cheltuieli instruire tehnici avansate de biologie moleculară și metagenomică tehnica de calcul Furnizor SOLUTION PLUS SRL Factura SOL 17824/28.07.2021	12,001.15
TOTAL CHELTUIELI EFECTUATE	226,200.00

Coordonator proiect FSS,
Prof.univ.dr. Mihai DIMIAN



Rector,
Prof.univ.dr.ing. Valentin POPA

