

**RAPORT TEHNIC ȘI FINANCIAR**

<b>Cod final de înregistrare:</b>	CNFIS-FDI-2021-0484
<b>Denumire instituție:</b>	UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE " VICTOR BABEȘ " TIMISOARA
<b>Titlu proiect:</b>	Dezvoltarea unui centru zonal de referință pentru secvențierea de nouă generație
<b>Domeniu vizat:</b>	6.Dezvoltarea capacității instituționale pentru cercetare în universități
<b>Bugetul aprobat:</b>	332.000 LEI

**Raport tehnic****(cuantificarea rezultatelor și gradul de atingere a indicatorilor asumați)**

In cadrul proiectului au fost realizate următoarele activități (expuse in ordinea regăsită in aplicație - Descrierea Activităților):

1. Ghid de proceduri standardizate si bune practici privind recoltarea, transportul si arhivarea in vederea analizei microbiene si virale

A fost elaborat si implementat protocolul de recoltare a probelor biologice (exsudat naso-faringian si oro-faringian) pentru detecția SARSC-CoV2. Protocolul a fost optimizat folosind recoltoarele și ecuvioanele model MF, furnizate de Shenzhen Dakewe Bio-engineering Co. Pana in prezent au fost recoltate (urmând acest protocol) in cadrul laboratorului peste 500 de probe.

Au fost elaborate si optimizate procedurile de transport si de arhivare a probelor native (la 4°C sau -20°C).

2. Ghid de proceduri standardizate de izolare, purificare si caracterizare a ADN/ARN viral /bacterian in vederea analizei genomice bacteriene si virale

A fost elaborat si implementat protocolul de purificare a ARN din probele biologice (exsudat naso-faringian si oro-faringian) pentru detecția SARSC-CoV2. Protocolul a fost optimizat folosind detaliile de lucru aferente utilizării extractorului automat Maxwell RSC48 oferit de Promega. Un accent deosebit a fost pus pe utilizarea controalelor interne pozitive si negative.

Au fost elaborate si optimizate doua proceduri de caracterizare a calității materialului genetic extras: metoda fluorimetrică (Qubit 2.0 - de elecție) si metoda spectrofotometrică (Nanodrop1000 - de rezerva). In baza experienței de secvențiere pe platforma IonTorrent, au fost stabilite criteriile calitative de selecție a probelor in vederea secvențierii.

Pana la acest moment, au fost analizate peste 500 de probe de ARN viral (provenite din mai multe surse si cu un Ct pe cel puțin una din genele SARS-Cov2 La ora actuala, LDBM dispune de o colecție de material genetic viral stocat la -80°C de peste 800 de probe.

3. Ghid de proceduri de analiza a genomului viral

Analiza genomului viral SARS-COV2 se bazează pe utilizarea aparatului de secvențiere MinION Mk1C. Recepția acestuia a fost efectuată marți 23.11.2021; ulterior, conform contractului, a fost rezervat un loc la workshop-ul de Training introductiv (14 decembrie) si Data Analysis (15 decembrie).

A fost efectuată recepția tuturor kiturilor si reactivilor necesari desfășurării etapelor preparative pentru secvențierea pe Mk1C. Toate aceste etape preparative au fost sumarizate intr-un document care detaliază etapele întregului protocol de secvențiere (conform Arctic Network):

- sinteza cDNA folosind LunaScript RT SuperMix (volum de reacție de 10X mai mic decât in cazul SuperScriptIV)
- Amplificarea cDNA folosind cele doua seturi-pool de primeri din panelul ARTIC nCoV-2019 V3; am optat pentru master mix-ul Q5 Hot Start High-Fidelity 2X si un numar de cicluri de 25 (pentru probele cu Ct între 18-21 și maxim 35 de cicluri pentru probe cu Ct până la 35).
- Native barcoding folosind Ultra II End Prep Enzyme Mix / Blunt/TA Ligase Master Mix si barcode-uri de la EXP-NBD104 (1-12), EXP-NBD114 (13-24).
- Cuantificarea ampliconilor (dupa procesul de spalare extensiva) utilizând un fluoroetru Qubit 2.0si un kit specific dsDNA.
- Ligarea adaptorilor de secventiere NEBNext Quick Ligation Reaction/Adapter Mix AMII urmata de spălarea excesului de adaptor.
- Cuantificarea ADN utilizând un fluoroetru Qubit 2.0si un kit specific dsDNA.

•Încărcarea probelor pe aparatul de secvențiere Mk1C si lansarea secvențierii propriu-zise.

A fost descărcat, instalat (pe o masina iMac procesor 3.5GHz QuadCore Intel Core i7, 32GB RAM DDR3 1600MHz, placa grafica NVIDIA GeForce GTX 780M 4GB) si funcționalizat programul MinKnow UI varianta 4.3.25, care reprezintă interfața de operare cu întreaga gama de aparate de secvențiere Oxford nanopore, inclusiv Mk1C.

A fost alcătuit un material care descrie operarea acestui program in vederea efectuării următoarelor operațiuni

- inițializare
- check-up hardware /flow cell
- configurarea (flow\_cell\_id, position\_id, sample\_id, experiment\_id, flow\_cell\_product\_code, kit, alias, type, barcode) si încărcarea sample sheet (format .csv) in Mk1C
- încărcarea genomului de referința ( format .fasta)
- programarea si comanda experimentului de secvențiere (setare lungime, ajustare voltajului de start/pe parcursul secvențierii)
- monitorizarea vitezei de translocare si a scorului Qscore in vederea identificării momentului optim pentru reîncărcarea flow cells
- data management
- network/wifi configuration
- live local basecalling folosind suita Guppy preinstalata
- live alignment
- programarea scanării Mux scan pentru diagnosticarea statusului sănătății porilor celulelor utilizate
- generarea graficelor de aliniere

A fost deschis un cont de utilizator pe platforma Geneious unde vom folosi efectua analiza de aliniere (algoritmi MAFFT and Clustal Omega) si analiza filogenetica (RAxML and PAUP\*) a secvențelor obținute.

Analiza cladistică a secvențelor si atribuirea filogenetică a acestor funcție de nomenclatura Pngo a outbreaks globale va fi efectuata folosind un Tool online, Pangolin COVID-19

Lineage Assigner (<https://pangolin.cog-uk.io/>)

4. Set de minim 96 secvențe genomice SARS-CoV-2 analizate

Datorita întârzierii in livrarea aparatului Mk1C, aceasta etapa nu a fost încă efectuată; experimentele propriu zise de secvențiere încep in aceasta săptămână.

5. Baza de date DisbioTM

La aceasta ora, din motive ce tin de existenta consimțământului informat si a colaborării cu partenerii clinicieni, doar pentru o parte din probele analizate am reușit sa colectam date clinice relevante. Id-urile tuturor probelor analizate din punct de vedere a calității si cantității (estimare Ct post qRT-PCR si cuantificare Qubit) sunt cuprinse intr-un fișier Excel parolat. Probele propriu zise sunt păstrate la -80°C in ultra-congelatorul Laboratorului de Diagnostic Biochimic si Molecular (LDBVM) al UMFVBT.

## DEVIZ POSTCALCUL

Nr. crt.	DENUMIRE CAPITOL BUGET	TOTAL VALOARE PROIECT [LEI]		VALOARE CHELTUITĂ ȘI ANGAJATĂ [LEI]	
		APROBATĂ ME	COFINANȚARE	APROBATĂ ME	COFINANȚARE
I.	Cheltuieli de personal	59.285,00	0,00	59.285,00	0,00
I.1.	din care*, cheltuieli de management	8.169,00	0,00	8.169,00	0,00
II.	Cheltuieli materiale	242.533,00	0,00	242.533,00	0,00
III.	Alte cheltuieli eligibile	30.182,00	0,00	30.182,00	0,00
IV.	Alte cheltuieli finanțate din veniturile proprii ale universității**	0,00	54.545,40	0,00	58.500,00
<b>TOTAL (pe tipuri de finanțare)</b>		<b>332.000,00</b>	<b>54.545,40</b>	<b>332.000,00</b>	<b>58.500,00</b>
<b>TOTAL GENERAL</b>		<b>386.545,40</b>		<b>390.500,00</b>	

\*Maximum 20% din cheltuielile de personal.

\*\*Nu se acordă de la bugetul ME. Sunt valabile doar la cofinanțare, unde se introduc sumele cofinanțate de universitate cu titlu de cheltuieli de capital (dacă este cazul).

**Rector**

Prof.univ.Dr. Octavian-Marius Cretu

Semnătură, ștampilă

Data: \_\_\_\_\_

**Contabil Șef**

Ec. Maria-Mihaeala Stepan

Semnătură

**Director proiect**

Prof.univ.Dr. Cristian-Iulian Oancea

Semnătură