

Raport de activitate finala

In cadrul proiectului FDI al Universității de Medicina si Farmacie din Timișoara au fost realizate următoarele activități:

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 SARS-CoV2. Protocolul a fost optimizat folosind recoltoarele și euvioanele 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 in vederea analizei genomice

A fost elaborat si implementat protocolul de purificare a ARN viral din probele biologice (exsudat naso si oro-faringian), folosind extractorul automat Maxwell RSC48 (Promega) si doua seturi de controale 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 rezervă). 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 de la centre de testare din spitale partenere UMF Timișoara. Doar probele cu Ct < 35 (cel puțin una din genele SARS-Cov2) sunt utile pentru secvențiere si au fost supuse controlului de calitate folosind metoda fluorimetrică Qubit in vederea secvențierii.

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 efectuata marți 23.11.2021; ulterior, conform contractului, am participat la workshop-ul de Training introductiv (14 decembrie) si Data Analysis (15 decembrie).

A fost efectuata 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 Artic Network):

- Sinteza cDNA folosind LunaScript RT SuperMix
- Amplificarea cDNA folosind panelul de primeri ARTIC nCoV-2019 V3 si master mix-ul Q5 Hot Start High-Fidelity 2X, dupa cum urmeaza: 25 de cicluri (probele cu Ct 18-21), 35 de cicluri (probele cu Ct 21-35).
- Native barcoding folosind Ultra II End Prep Enzyme Mix / Blunt/TA Ligase Master Mix si barcode-uri EXP-NBD104 (1-12), EXP-NBD114 (13-24).
- Cuantificarea ampliconilor (post-spălare) utilizând fluometrul Qubit 2.0.
- Ligarea adaptorilor de secvențiere folosind NEBNext Quick Ligation Reaction/Adapter Mix AMII.
- Cuantificarea ADN post-ligare utilizând fluometrul Qubit 2.0.

- Încărcarea probelor pe aparatul de secvențiere Mk1C si lansarea secvențierii propriuzise.

A fost descărcat, instalat (pe o mașina 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 aparatele Oxford Nanopore. Acest program ne permite sa avem o cale alternativa (prin intermediul computerului) de accesare a aparatului de secvențiere Nanopore.

A fost alcătuit un material care descrie operarea acestui program (pe aparatul de secvențiere Mk1C si pe iMac) in vederea efectuării următoarelor operațiuni

- inițializare
- check-up hardware /flow cell,
- încărcarea genomului de referința (.fasta)
- programarea si comanda experimentului de secvențiere (setare durata, ajustare voltaj)
- programarea scanării Mux spentru diagnosticarea statusului sănătății porilor
- monitorizarea scorului Qscore in vederea identificării momentului optim de reîncărcare a celulei
- network (eventual wifi) configuration
- data management
- local basecalling si aliniere
- analiza post-secvențiere.

A fost deschis un cont de utilizator pe platforma Geneious unde pot fi efectuate analizele de aliniere (MAFFT / Clustal Omega) si filogenetice (RAxML & PAUP*).

A fost instalata si operaționalizată suita EPI2ME Agent (v3.4.20) care permite analiza *in cloud* EPI2ME a secvențelor FASTA:

1. analiza de calitate si
2. analiza de varianta si cladistică (ARTIC + Nextclade + Pangolin v2021.12.02)

Urmare a aplicării controlului de calitate, a putut fi folosite doar 72 de probe (3 X 24 de probe) in vederea secvențierii multiplexate, care au furnizate seturi de documente (FAST5, FASTQ SI BAM, etc.) de peste 300Gb. Lungimea medie a secvențelor analizate a fost de 384, 522 respectiv 572 de baze, cu scoruri de calitate de 14,2 11.8 si respectiv 7.24.

Datorită dimensiunilor foarte mari ale fișierelor analizate si a resurselor computaționale locale reduse, întreaga analiza a fost făcută *in cloud*, pe mașini virtuale EPI2ME.

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

Datorita întârzierii in livrarea aparatului Mk1C, aceasta etapa a fost îndeplinită doar in proporție de 75%; un al patrulea set de probe este in pregătire (selecție calitativă pre-secvențiere). Menționăm ca vom continua sa selecționăm probe pentru includerea in protocolul de secvențiere Nanopore; ritmul de secvențiere este dictat in principal de identificarea probelor cu o calitate corespunzătoare secventierii.

5. Baza de date DisbioTM

La aceasta ora, din motive ce țin de existenta consimțământului informat si a colaborării cu partenerii clinicieni, doar pentru o parte din probele analizate am reușit sa colectam date clinice.

Id-urile tuturor probelor incluse in analiza sunt stocate anonimizat intr-un fișier Excel parolat stocat in computerul de la sediul LDBM.