

ROMÂNIA  
MINISTERUL APĂRĂRII NAȚIONALE



Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare  
Medico-Militară „Cantacuzino”

Proiectul AcvaCov  
„Dezvoltarea în regim de urgență a unor instrumente moleculare  
pentru evaluarea emergenței și re-emergenței COVID-19”

Cod proiect: PN-III-P2-2.1-SOL-2020-2-0324

Proiect: 24SOL/2020

Acronim: AcvaCov

Finanțare: Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a  
Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI)

Perioada: 01.07 - 31.12.2020

Componența parteneriatului de proiect: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare  
Medico-Militară "Cantacuzino"

Director proiect: Gabriela OPRIȘAN, tel. 0213069223, Fax: 0213069307,  
email: goprisan2002@yahoo.fr

Partenerii din Consorțiul AcvaCov

<u>Nr. crt.</u>	<u>Denumirea institutiei</u>	<u>Rol proiect (CP, P1-Pn)</u>	<u>Buget lei 700.000</u>
1	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „CANTACUZINO” (IC)	CP	220.000
2	Institutul de Biochimie al Academiei Române (IBAR)	P1	120.000
3	Spitalul Clinic Militar de Urgență „Dr. I. Czihac” Iași (SCM Iași)	P2	50.000
4	Spitalul Universitar de Urgență Militar Central „Dr Carol Davila” (SUUM)	P3	50.000

5	Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale “Dr V. Babeș” București (SVB)	P4	50.000
6	Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca (UMF Cluj)	P5	80.000
7	Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș Timișoara (UMF Timi)	P6	50.000
8	ICA Reserch&Development (ICA)	P7	80.000

**Valoarea totală de la buget: 700.000,00 lei**

**Valoarea totală cofinanțare (surse proprii, P7): 68.003,00 lei**

**Valoarea totală a Contractului: 768.003,00 lei**

### **Rezumatul proiectului**

Unul dintre aspectele esențiale pentru înțelegerea epidemiologiei COVID-19 este legat de condițiile care favorizează persistența virusului în mediul exterior și riscurile asociate cu diferitele sale nișe. Conform datelor acumulate până în prezent, diseminarea interumană a SARS-CoV-2 se realizează, în principal, prin aerosolii produși prin tuse sau strănut și contact direct cu indivizi infectați, existând însă și dovezi în favoarea transmiterii indirecte, prin contact cu obiecte și suprafețe contaminate cu produse biologice (inclusiv materii fecale) care conțin particule infecțioase. Faptul ca apa, elementul esențial al vieții, poate fi și sursă de îmbolnăvire nu mai reprezintă un paradox ci o certitudine solid argumentată științific pentru o serie de patogeni umani virali, bacterieni și parazitari. Proiectul vizează evaluarea unui model microbiologic și epidemiologic de screening al apelor reziduale care să servească sistemului de sănătate publică pentru documentarea unor proceduri naționale de monitorizare a circulației SARS-CoV-2 în mediu. Proiectul se va concretiza într-un studiu multicentric observational și prospectiv care oferă o soluție de laborator pentru identificarea moleculară a SARS-CoV-2 în probe de apă reziduală, precum și o soluție epidemiologică de îmbunătățire a sistemului de supraveghere și alertă a emergenței și re-emergenței virusului la nivel regional/național. În ceea ce privește abordarea microbiologică, noutatea constă în primul rând în detecția virusului în probe de apă, în condițiile în care singurele probe pentru care s-a acumulat, până acum, suficientă experiență de testare în laboratoarele din Romania sunt cele provenite direct de la pacienți. Suplimentar se adaugă ocazia unică de a urmări comportamentul acestor virusuri în sincronitate cu o pandemie în evoluție.

## **Obiective**

### **Obiectivul principal al proiectului:**

Proiectul vizează evaluarea unui model microbiologic și epidemiologic de screening al apelor reziduale care să servească sistemului de sănătate publică pentru documentarea unor proceduri naționale de monitorizare a circulației SARS-CoV-2 în mediu.

### **Obiective specifice:**

1. Structurarea unui sistem coerent de detecție a acizilor nucleici virali în ape reziduale printr-o abordare multi-instrumentală de identificare și validare.

2. Definirea unui algoritm epidemiologic de alertă precoce, de anvergură națională, bazat pe supravegherea prezenței SARS-CoV-2 în mediul acvatic din „puncte fierbinți”.

## **Activități**

### **Coordonator IC:**

- Organizează derularea activităților proiectului și a demersurilor aprobarea studiului conform legislației aflate în vigoare

- Stabilește, împreună cu partenerii din consorțiu, protocolul de recoltare a apelor

- Evaluează protocoalele de concentrare a apelor

- Participă la evaluarea metodelor de extracție a acizilor nucleici

- Participă la stabilirea controalelor pozitive și negative pentru testele moleculare

- Stabilește protocolul RT-PCR și genele virale țintă

- Participă la evaluarea sensibilității și specificității protocoalelor moleculare de amplificare RT-PCR și LAMP

- Organizează crearea unor bănci de probe de ape și a unei baze de date privind probele recoltate în cadrul consorțiului

- Organizează recoltarea, stocarea, distribuirea și înregistrarea în bazele de date a probelor de apă, conform protocolului stabilit și ajustează protocolul în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare

- Participă la concentrarea probelor de apă prin metodele stabilite

- Evalueaza metodele de extracție a acizilor nucleici din probe
- Contribuie la ajustarea protocolului de recoltare și prelucrare a probelor de apă în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare a metodelor moleculare (metodele de extracție și tehnica de amplificare, RT-PCR și o tehnică alternativă, tipul de martori pozitivi și negativi)
- Contribuie la testarea moleculară a probelor de apă
- Realizează secvențierea unor probe de ape pozitive și analiza bioinformatică a secvențelor
- Contribuie la analiza epidemiologică prin coroborarea datelor moleculare obținute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane
- Realizează transferul tehnologic de metode moleculare către IMM din consorțiu – P7 (ICA)
- Contribuie la dezvoltarea unui Plan național de supraveghere SARS-Cov-2 în ape reziduale și asigură comunicarea rezultatelor cercetării către forurile decidente din sănătatea publică
- Contribuie la elaborarea unui articol științific

#### **P1 – IBAR**

- Stabilește, împreună cu partenerii din consorțiu, protocolul de recoltare a apelor și organizarea cadrului legal pentru acest studiu
- Participă la evaluarea metodelor de extracție a acizilor nucleici
- Participă la stabilirea controalelor pozitive și negative pentru testele moleculare
- Stabilește protocolul RT-PCR și genele virale țintă
- Asigură dezvoltarea unui protocol alternativ de amplificare
- Participă la evaluarea sensibilității și specificității protocoalelor moleculare de amplificare
- Evaluează metodele de extracție a acizilor nucleici din probe
- Contribuie la ajustarea protocolului în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare a metodelor moleculare (metodele de extracție și cele două tehnici de amplificare, tipul de martori pozitivi și negativi)

- Contribuie la testarea moleculară a probelor de apă pentru validarea tehnicilor moleculare - Contribuie la analiza epidemiologică prin coroborarea datelor moleculare obținute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane

- Realizează transferul tehnologic de metode moleculare către IMM din consorțiu – P7 (ICA)

- Contribuie la dezvoltarea unui Plan național de supraveghere SARS-Cov-2 în ape reziduale și asigură comunicarea rezultatelor cercetării către forurile decidente din sănătatea publică

- Contribuie la elaborarea unui articol științific

### **P2 - SCM Iași și P3 – SUUM**

- Stabilește, împreună cu partenerii din consorțiu, protocolul de recoltare a apelor și organizarea cadrului legal pentru acest studiu

- Participă la stabilirea controalelor pozitive și negative pentru evaluarea sensibilității testelor moleculare

- Organizează recoltarea, stocarea, distribuirea și înregistrarea în bazele de date a probelor de apă, conform protocolului stabilit și ajustează protocolul în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare

- Contribuie la analiza epidemiologică prin coroborarea datelor moleculare obținute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane

- Contribuie la dezvoltarea unui Plan național de supraveghere SARS-Cov-2 în ape reziduale și asigură comunicarea rezultatelor cercetării către forurile decidente din sănătatea publică

- Contribuie la elaborarea unui articol științific

### **P4 - SVB**

- Stabilește, împreună cu partenerii din consorțiu, protocolul de recoltare a apelor și organizarea cadrului legal pentru acest studiu

- Contribuie la stabilirea și furnizarea controalelor pozitive și negative pentru evaluarea sensibilității testelor moleculare

- Organizează recoltarea, stocarea, distribuirea și înregistrarea în bazele de date a probelor de apă, conform protocolului stabilit și ajustează protocolul în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare

- Contribuie la analiza epidemiologică prin coroborarea datelor moleculare obținute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane

- Contribuie la dezvoltarea unui Plan național de supraveghere SARS-Cov-2 în ape reziduale și asigură comunicarea rezultatelor cercetării către forurile decidente din sănătatea publică

- Contribuie la elaborarea unui articol științific

### **P5 - UMF Cluj**

- Stabilește, împreună cu partenerii din consorțiu, protocolul de recoltare a apelor și organizarea cadrului legal pentru acest studiu

- Evaluează protocoalele de concentrare a apelor

- Participă la evaluarea metodelor de extracție a acizilor nucleici

- Participă la stabilirea controalelor pozitive și negative pentru testele moleculare

- Stabilește protocolul RT-PCR și genele virale țintă

- Participă la evaluarea sensibilității și specificității protocoalelor moleculare de amplificare

- Organizează recoltarea, stocarea, distribuirea și înregistrarea în bazele de date a probelor de apă, conform protocolului stabilit și ajustează protocolul în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare

- Participă la concentrarea probelor de apă prin metodele stabilite

- Evaluează metodele de extracție a acizilor nucleici din probe

- Contribuie la ajustarea protocolului de recoltare și prelucrare a probelor de apă în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare a metodelor moleculare (metodele de extracție și cele două tehnici de amplificare, tipul de martori pozitivi și negativi)

- Contribuie la testarea moleculară a probelor de apă

- Realizează secvențierea unor probe de ape pozitive și analiza bioinformatică a secvențelor

- Contribuie la analiza epidemiologică prin coroborarea datelor moleculare obținute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane

- Realizează transferul tehnologic de metode moleculare către IMM din consorțiu – P7 (ICA)

- Contribuie la dezvoltarea unui Plan național de supraveghere SARS-Cov-2 in ape reziduale și asigură comunicarea rezultatelor cercetării către forurile decidente din sănătatea publică

- Contribuie la elaborarea unui articol științific

### **P6 - UMF Timi**

- Stabilește, împreună cu partenerii din consorțiu, protocolul de recoltare a apelor și organizarea cadrului legal pentru acest studiu și asigurarea reprezentativității teritoriale, a posibilităților de intercomparare între medii de rezidență sau între regiuni cu incidență diferită a COVID19

- Organizează crearea unei baze de date privind probele recoltate în cadrul consorțiului și a structurii acestora

- Completarea bazei de date, actualizarea “bazinelor” de colectare a apelor reziduale în raport cu incidența cazurilor de boală

- Analiza epidemiologică prin coroborarea datelor moleculare obținute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane

- Realizează prelucrarea statistică a datelor - descriptivă și analitică

- Corelarea rezultatelor obținute cu incidența COVID 19 în teritoriul acoperit și evaluarea riscurilor de transmitere fecal-orală a SARS-COV-2

- Contribuie la dezvoltarea unui Plan național de supraveghere SARS-Cov-2 in ape reziduale și asigură comunicarea rezultatelor cercetării către forurile decidente din sănătatea publică prin:

- Adaptarea strategiei de supraveghere în contextul epidemiologic actual

- Evaluarea sistemului de supraveghere din punct de vedere al riscurilor posibile

- Stabilirea și introducerea elementelor de profilaxie și control în Planul Național de supraveghere a SARS-COV-2 în apele reziduale și diseminarea datelor la nivel național

- Contribuie la elaborarea unui articol științific pentru diseminarea datelor la nivel național și internațional

### **P7 – ICA**

- Stabilește, împreună cu partenerii din consorțiu, protocolul de recoltare a apelor și organizarea cadrului legal pentru acest studiu

- Asigură caracterizarea apelor din punct de vedere chimic, compoziție materii organice, microbiologic

- Evaluează protocoalele de concentrare a apelor

- Participă la evaluarea metodelor de extracție a acizilor nucleici

- Participă la stabilirea controalelor pozitive și negative pentru testele moleculare

- Stabilește protocolul RT-PCR și genele virale țintă

- Participă la evaluarea sensibilității și specificității protocoalelor moleculare de amplificare RT-PCR și LAMP

- Organizează crearea unor bănci de probe de ape și a unei baze de date privind probele recoltate în cadrul consorțiului

- Organizează recoltarea, stocarea, distribuirea și înregistrarea în bazele de date a probelor de apă, conform protocolului stabilit și ajustează protocolul în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare

- Participă la concentrarea probelor de apă prin metodele stabilite

- Evaluează metodele de extracție a acizilor nucleici din probe

- Contribuie la ajustarea protocolului de recoltare și prelucrare a probelor de apă în funcție de rezultatele demersurilor de testare și validare a metodelor moleculare (metodele de extracție și cele două tehnici de amplificare, RT-PCR și LAMP, tipul de martori pozitivi și negativi)

- Recoltarea probelor din zonele geografice reprezentative ale țării și din zone unde se semnalează cazuri pozitive sau focare și distribuirea acestora în consorțiu

- Asigură aplicarea metodelor de concentrare a apelor stabilite în etapele anterioare

- Contribuie la testarea moleculară a probelor de apă



- Contribuie la analiza epidemiologică prin coroborarea datelor moleculare obținute din probele de ape cu cele disponibile, pentru probe umane

- În calitate de IMM permite transferul tehnologic de metode moleculare de către parteneri din consorțiu

- Contribuie la dezvoltarea unui Plan național de supraveghere SARS-Cov-2 în ape reziduale și asigură comunicarea rezultatelor cercetării către forurile decidente din sănătatea publică

- Contribuie la elaborarea unui articol științific

### **Rezultatele etapei I**

Eșantioanele de apă vor fi colectate din puncte urbane și rurale. Procesul de recoltare va începe la sfârșitul lunii august și vor fi recoltate pentru început 30 de probe din zonele indicate de partenerii epidemiologi și spitale.

Partenerii cu sediul în vestul, estul și sudul țării vor primi informații epidemiologice solicitate de la DSP-uri, cu privire la următoarele aspecte:

1. care sunt laboratoarele de ape uzate (de origine menajeră și spitalicească) și ce localități deserveșc acestea în județul respectiv
2. care sunt stațiile de epurare ale apelor uzate, unde sunt acestea localizate și ce localități deserveșc
3. care sunt localitățile urbane și rurale care au înregistrat focare cu mai mult de trei cazuri de infecție cu SARS-COV-2 în lunile iulie-august 2020
4. care sunt secțiile de Boli Infecțioase care tratează pacienți Covid 19 și unde există bazine de neutralizare a apelor reziduale înainte de deversarea lor în rețelele de canalizare

Recoltarea se va face manual, exclusiv de către operatori instruiți. Aceștia vor purta echipamente de protecție personală adecvate pentru a minimaliza expunerea la agenții infecțioși (inclusiv SARS-CoV-2) prezenți în apele uzate menajere (filtre respiratorii eficiente împotriva aerosolilor biologici, viziere, mănuși și halate de unică folosință).

Probele se transportă la laborator în ziua recoltării, în condiții de refrigerare, ideal în domeniul de temperatură de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  și ferite de lumina. Dacă durata transportului este mai mare de 8 ore se monitorizează și înregistrează constant temperatura. Analiza apei trebuie să înceapă de îndată ce este posibil, după primirea la laborator, în conformitate cu recomandările prevăzute de standardele în vigoare.

5. Rezultate, stadiul realizării obiectivului, concluzii și propuneri pentru continuarea proiectului. În urma evaluării în consorțiu a Protocolului elaborat de P7 ICA, s-a definitivat **Protocolul de recoltare a apelor reziduale.**

**Prin reuniunile din cadrul consorțiului realizate la IC (CO, P1, P7) și on-line, s-a stabilit fluxul de lucru pentru următoarea etapa:**

1. Colectare ape uzate – minim 600 mL (600 mL – 4L) : P7 redactează protocolul de colectare a apelor care va fi trimis la UEFISCDI ca livrabil, după consultare în consorțiu.
2. Transport refrigerat al probelor spre partenerii din consorțiu care realizează testarea moleculară.

