18-3-20

For the actual experiment (following production of genomic material):

Each negative tube should have 92 microliter (ul) liquid (note that if tested twice before – might have only 84 ul)

(1) 382 negative tubes are grouped in racks into 8 groups of 48 tubes (8th group is only 46 tubes) – so that they can fit a 48-tube holder of these tubes. Number the caps from 1 to 384. The 8 groups are kept on ice or in 4c.

(2) Arrange the first 48 negative tubes in the appropriate holder (keep track of the caps)

(3) For each tube – using the appropriate software ("48 genome tubes into 5 pools") aliquot 2 ul / well (6 pool wells per tube; the 6 wells are different from tube to tube) – for 5 pools in the 384 well plate on a cold block (total is 2ul x 6 wells/pool x 5 pools = 60 ul)

(4) Add back the caps and clear the holder back to the original rack.

(5) Repeat steps (2) to (4) for the next 6 48-tubes groups (total 7 groups)

(6) Repeat (2) to (4) for the 8th 46-tube group using the software ("46 genome tubes into 5 pools")

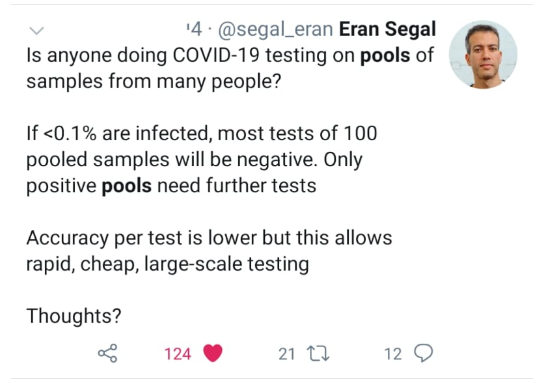
(7) Arrange 10 tubes (5 pairs) in the 48 tube holder and operate software (" 2x5 tubes to add 383-384"). Note that the 5 pairs are: negative pair, cycle 16 pair, cycle 20 pair, cycle 25 pair, cycle 30 pair). Each has only 50 ul (important for the tip height)

Software should aliquot negative pair to pool 1 (as 383, 384 tubes), 16 cycle pair to pool 2; 20 cycle pair to pool 3; 25 cycle pair to pool 4; and 30 cycle pair to pool 5.

17-3-20

שלום לנועם ותומר

הנושא של פולינג של דגימות רץ כאש בשדה קוצים בקבוצות מחקר בתל אביב, הדסה ווייצמן (רק ממה שאני יודע). יתרה מזאת, החברה של תל-אביב פועלים להסבת מעבדת BSL2+ שיש להם במעבדות אוני' תל-אביב (לא בבית חולים) ויצרו קשר לקבלת דגימות שנאספות בשיטת ה DRIVETHROUGH הקוריאני מאוכלוסייה לא סימפטומטית – פרויקט שמתחיל מחר או מחרתיים בתל-אביב. אני יודע זאת כי קישרתי בינם לבין יונת שמר אבני לקבלת פרוטוקול ה INHOUSE לתהליך (פרוטוקול שהריצה לפני הכנסת הרובוט של חי לבורטוריז היום לפעולה. אבל פרוטוקול שמתאים לחברה של תל-אביב כי אין להם רובוט).



בקיצור, עם או בלי מימון של משרד הבריאות, אם מתייחסים לשאלה מי יוכיח ראשון את יעילות הפולינג, אז סביר להניח שזה לא יהיה מכאן – אלא אם כן נבוא עם יצירתיות יתר.

אז הנה הצעה פרקטית לעשות את הניסויים שבוע הבא ולנסות לשלוח לפרסום עוד שבועיים:

שהייתי במסגרת פרויקט ההתנדבות היום אצל יונת, הבנתי ממנה שהיא עומדת לזרוק את השאריות מהדגימות שיצאו שליליות (גם מה שנוטרל מהמטושים וגם שארית הפקת הגנומי) – מיד ביקשתי ממנה לעצור זאת ולהמשיך לשמור אותם במקפיא העמוק למרות חוסר המקום. יש לה כרגע להערכתי כ 600 שליליים ובימים הקרובים תגיע ל1000 (שיא הקיבול). במקביל יש לה דוגמאות שיצאו חיוביות ובסייקלים בין 16 ל 30 (מעל 35 סייקלים לכל גן נחשב שלילי)

סגרתי אתה שאם נעבוד פיזית בתוך המעבדה הוירולוגית (בערב המאוחר) – אז נוכל גם להשתמש בקיט ה PCR שלה (שאריות – בכל קיט של 100 ריאקציות PCR יש חומר ל 130 ריאקציות, והשאריות של הקיטים גם נשמרות).

אז הרעיון הוא מאוד פשוט (אבל למיטב ידיעתי אף אחד בקבוצות האחרות עוד לא עלה עליו מרוב פשטותו/טמטומו של הרעיון) – במקום לאסוף 1000 דגימות חדשות מהאוכלוסייה הלא סימפטומטית כדי לבדוק את רעיון הפולינג (אין מי שיאסוף, אין מי שיבדוק, אין תקציב לערכות הפקה ו PCR) – נשתמש בשאריות של הדגימות שיצאו שליליות ונוכל להוסיף להם איזה אחוז שאנו רוצים של חיוביות ובצורה המייצגת את האוכלוסייה.

**מעבר לזה – הנה האתגרים הנוספים לאתגר הפולינג המתמטי – שמייצגים את הסיבוך הביולוגי במקרה הזה שצריך להוסיף עוד חשיבה לגביו** - מעבר לנוסחה הרגילה שמבוססת על כך שכל חבר באוכלוסייה הוא או שלילי או חיובי אבל באותה רמה של שליליות או חיוביות וגם שכל חבר באוכלוסייה מיוצג בערך שווה.

1. החומר הגנומי הכללי המופק פר נבדק במטושים – שונה מנבדק לנבדק (להערכתי בטווח של אחד עד ארבע)

2. החומר הגנומי הספציפי (של הוירוס) שונה בין מודבק למודבק (בפקטור של לפחות 2 בחזקת 9 - בין סייקל 16 לסייקל 25 – ולפעמים יש כאלה גם שיוצאים חיוביים בסייקל 30)

3. יש לימיט לרגישות – למשל זיהוי מעל סייקל 35 נחשב כשלילי – אז פולינג ל 100 דגימות לפול ימהל חיובי של סייקל 30 למצב של פחות מסף הרגישות המקובל – ויש לקחת זאת בחשבון

4. נושא המטא-אלגוריתם של ה PCR. יש 3 גנים נבדקים ב PCR. כרגע ב PCR של דגימות בודדות – זיהוי חיובי של 3 גנים זה הדבקה וזיהוי של שניים זה החלטה לחזור על הבדיקה.

**הצעתי לעבודה:**

כרגע פרקציית הזיהוי של מודבקים בתוך דגימות שמגיעות מחולים סימפטומטיים היא 6 מ 300. אבל גם ה 6 האלה שונים אחד מהשני – מתגלים בסייקל 16 או 20 או 25. 3 גנים או 2 (במיוחד אלה שבסייקלים הגבוהים יותר)

ניתן להניח בביטחון שבאוכלוסיה לא סימפטומטית פרקציית המודבקים היא 1 ל 300 או פחות והסייקל בו יתגלה המודבק יהיה יותר בכיוון ה 25 במקום ה 16 (מה שמחייב לחשוב על גודל הפול שהוא בעצם מיהול הדגימה)

**לכן מציע לבנות 2 מערכות של חישוב פולינג (על בסיס שימוש בשאריות הדגימות השליליות והחיוביות) –**

(א) לאוכלוסיה של חולים סימפטומטים בה נשמור על היחס של 6 חיוביים ל 300 דגימות – ונשקף בחיוביים את הדיסטריביוציה בין סייקל 16 לסייקל 25 בדגימות החיוביות

(ב) לאוכלוסיה משוערת של לא-סימפטומטים בה נשמור על יחס של 1 חיובי ל 330 דגימות (3 ל 1000) ונשתמש ב3 חיוביים מתוך סייקל 20 ל 25 עם שיקול גודל קבוצת הפולינג (פחות מ 100 )

**טכנית**

נעביר את הרובוט של תומר למעבדה של יונת (חדר ליד). תומר יתכנת אותו לאיסוף פולים לפי ההצעות של (1) ו (2) או משהו דומה יחסית - וכמובן לאחר החישוב המתמטי של נועם וסטודנטים שלי (שכבר מתנדבים שם) יכינו את הדגימות (ידנית) ל PCR ויריצו במכשיר PCR אצל יונת.

מכיוון שנשתמש בשאריות הדגימות לאחר הפקת חומר גנומי – חסכנו לעצמינו גם את שלב הפקת החומר הגנומי וגם את הצורך לעבוד ב P3 .

**תוצאה אפשרית**

בניבוי פולינג נכון של נועם (בהתייחסות לנושאים 1 עד 4 שהעליתי) ועל אוכלוסיות (א) ו (ב) – נוכל לעשות ניסוי + חזרה על כל אוכלוסייה ב 4 ימי (ערבי) עבודה – במהלך שבוע הבא, לכתוב ולשלוח לפירסום כמכתב בעוד שבועיים.

והכי חשוב – אם באמת זה יעבוד ונכון – אולי נוכל לשכנע להתחיל לדגום את האוכלוסייה הלא סימפטומטית גם באזור הדרום החל בעובדי סורוקה (וגם בארץ כמובן) – ונתנו את תרומתנו למלחמה בקורונה.

דרך אגב – אם הפולינג של נועם לא יוכיח את עצמו – תמיד נוכל לחזור לשנת 1945 ולחלק 1000 דגימות עם 3 חיוביים ל 50 פולים נפרדים – ואז לסרוק את ה 1000 במקסימום של 170 בדיקות (אם 3 החיוביים נופלים ב 3 קבוצות שונות) או במינימום 70 בדיקות (אם 3 החיוביים נופלים באותה קבוצה של 50.