

Relazione sullo svolgimento del progetto  
di ricerca collaborativa  
“NGS4COV”

## **1. Introduzione**

Questo documento riepiloga lo stato di avanzamento del Progetto NGS4COV alla data del 06 Aprile 2020 (data di conclusione del progetto).

## **2. Stato di avanzamento nel periodo di riferimento**

Si descrivono nel seguito le attività svolte nel corso del periodo oggetto della presente relazione.

### **WP1 - Messa a punto del protocollo**

Il WP1 è stato dedicato alle attività di disegno delle sequenze dei primer di retrotrascrizione e di amplificazione del virus, alla messa a punto delle condizioni di reazione per ottenere prodotti di amplificazione specifici del virus e alla messa a punto della pipeline di analisi dei dati di sequenziamento.

#### **Attività svolte**

Il progetto NGS4COV è stato ideato durante la prima ondata di infezioni da virus SARS-Cov-2 che si è verificata tra febbraio e maggio 2020 e aveva l'obiettivo di sviluppare un test che avesse la possibilità di essere applicato su un elevato numero di campioni, idealmente di saliva, per poter potenziare le capacità di screening della popolazione da parte dei laboratori ospedalieri. Con l'evolversi della situazione pandemica, è stata eseguita una modifica all'idea originale per cercare di offrire una soluzione efficace per affrontare le esigenze correnti del sistema sanitario. Il protocollo originale è stato quindi adattato allo screening di campioni positivi o negativi e contemporaneamente alla loro caratterizzazione rispetto alle varianti geniche attualmente circolanti in Sardegna e più in generale nella popolazione. Si rimanda all'allegato a questo Report per una descrizione di dettaglio del protocollo sviluppato.

### **WP2 - Validazione del protocollo**

Il WP2 è dedicato alle attività di validazione del protocollo su un numero di campioni sufficiente per poter valutare la riproducibilità del metodo e misurare l'affidabilità diagnostica mediante valutazione della specificità e della precisione dei risultati rispetto ai dati ottenuti nel laboratorio ospedaliero con le tecniche convenzionali.

### **Attività svolte**

Le attività di validazione sono state condotte in collaborazione con il Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, AOU Cagliari (Dr. Ferdinando Coghe, Prof. Germano Orrù) su un totale di circa 400 campioni. Si rimanda all'allegato a questa relazione per ulteriori informazioni. A causa dell'eccessivo carico di lavoro a cui è sottoposta l'intera filiera diagnostica del COVID-19, delle difficoltà che stanno incontrando le aziende ospedaliere nella gestione dell'emergenza, e la conseguente e giustificata scarsa disponibilità ad altre attività, è risultato estremamente complicato organizzare la raccolta di campioni di saliva per poter verificare se il protocollo sviluppato fosse applicabile anche su questo tipo di campione biologico. Questo ulteriore aspetto innovativo avrebbe dovuto coinvolgere tutti gli operatori sanitari: il personale tecnico-amministrativo che gestisce l'elenco dei soggetti da tamponare, con la produzione di provette etichettate dedicate alla saliva; il personale medico-infermieristico che esegue il tampone, con la raccolta di un secondo campione biologico; i tecnici-biologi di laboratorio che eseguono la disattivazione del virus e la successiva purificazione. Una valutazione obiettiva effettuata nel corso dello svolgimento del progetto ha consentito di verificare come fosse purtroppo impraticabile la possibilità per la ATS di organizzare questa filiera e di conseguenza per il CRS4 di avere a disposizione i campioni.

### **WP3 - Diffusione**

E' stato preparato un report contenente la descrizione dettagliata del protocollo (vedi allegato). Come previsto il laboratorio NGS del CRS4 è a richiesta disponibile per l'organizzazione del training di formazione del personale di laboratorio per facilitare la corretta e pronta applicazione del protocollo sviluppato.

### **3. Conclusioni**

Il sistema di screening ideato ha le potenzialità di processare in un'unica sessione di analisi un elevato numero di campioni. Sfruttando la doppia combinazione di indexing dei campioni si potrebbe arrivare ad analizzare migliaia di campioni in contemporanea su una flow cell di strumenti Illumina più performanti come Illumina HiSeq3000 o NovaSeq6000. Le 384 combinazioni dei kit commerciali possono essere moltiplicate per N index di retrotrascrizione. Tuttavia attualmente il sistema presenta alcune criticità, probabilmente risolvibili con ulteriori approfondimenti nella messa a punto del protocollo, relativi a (i) messa a punto della purificazione RT; (ii) possibile automatizzazione dei processi di laboratorio; (iii) specificità della strumentazione di sequenziamento utilizzata. Si rimanda all'allegato a questo report per i dettagli.

Attualmente il protocollo, sulla base di queste considerazioni non si può considerare affidabile per lo screening di positivi e negativi su larga scala ma è invece promettente per l'identificazione dei campioni con varianti. Questo perché i campioni che vengono caratterizzati per le varianti provengono da un primo test molecolare nel quale il fallimento dell'amplificazione per il prodotto del gene S è indicativa della presenza della variante e deve essere confermata mediante sequenziamento.

#### **4. Sviluppi futuri**

Con questa idea progettuale è stato sviluppato un nuovo sistema di multiplexing sfruttabile per numerose applicazioni. Per esempio la caratterizzazione della sequenza di porzioni di un determinato gene per un elevato numero di campioni potrebbe essere svolta ingegnerizzando primer di PCR con lo stesso concetto. La necessità di individuare tempestivamente i pazienti portatori delle varianti attuali, o di quelle che presumibilmente emergeranno in futuro, richiede un protocollo ad alta processività ed economico rispetto al sequenziamento del genoma virale o del solo gene S mediante kit commerciali. I costi di questo sistema sono di circa 1/10 rispetto ai kit commerciali. Il sistema potrebbe essere trasferito su altre piattaforme di sequenziamento cambiando le code alle sequenza dei primer

#### **5. Criticità eventualmente emerse durante lo sviluppo delle attività.**

Durante il periodo di svolgimento delle attività si sono presentate le seguente criticità:

- L'approvvigionamento dei reagenti necessari per lo svolgimento del progetto è stato particolarmente difficoltoso a causa della pandemia in corso, in particolare per gli esperimenti che utilizzano reagenti comuni ai test di screening in atto nei laboratori diagnostici;
- I laboratori ospedalieri che hanno le attrezzature e la preparazione specifica per maneggiare materiale altamente infettivo erano e sono tuttora sottoposti ad un eccessivo carico di lavoro. Per questo motivo, sia i campioni estratti da tampone rinofaringeo e soprattutto molte delle informazioni utili all'interpretazione dei risultati sono stati ottenuti con difficoltà. Per lo stesso motivo, non è stato in nessun modo possibile accedere a campioni di saliva.

Infine, nel quadro più generale della trasferibilità dei risultati, va considerato che lo sviluppo di nuovi protocolli non commerciali e non certificati per la diagnostica non è facilmente trasferibile ai laboratori ospedalieri, anche a causa della tradizionale mancanza di iterazioni strette tra laboratori di ricerca e laboratori di diagnostica che si riflette in una scarsa propensione all'innovazione da parte di questi ultimi. La recente letteratura supporta però l'utilità e la possibilità di applicare protocolli innovativi. Per esempio, una strategia di multiplexing dei campioni a monte dell'estrazione dell'RNA virale è stata applicata con

successo da Shental<sup>1</sup> per poter eseguire test molecolari su popolazione a basso costo e ad alta processività. In un'altra pubblicazione recente Vogels et al<sup>2</sup> descrivono una procedura estremamente semplificata ed economica per l'analisi molecolare da campioni di saliva. I risultati ottenuti dal confronto tra estrazione da tampone e test salivare sono perfettamente sovrapponibili. Il confronto tra test su tampone e campione salivare ha portato alla conclusione che i test su saliva sono più sensibili rispetto ai test su tamponi<sup>3</sup>.

### Cronoprogramma del progetto

Il progetto si è svolto secondo il seguente cronoprogramma, in accordo a quanto programmato nel Report 03 di progetto.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
WP1											
WP2											
WP3											
	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic	Gen	Feb	Mar

Pula, 07/04/2021

---

<sup>1</sup> Efficient high throughput SARS-CoV-2 testing to detect asymptomatic carriers Noam Shenta et al, : medRxiv preprint <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20064618>

<sup>2</sup> SalivaDirect: A simplified and flexible platform to enhance SARS-CoV-2 testing capacity Chantal B.F. Vogels et al, medRxiv preprint <https://doi.org/10.1101/2020.08.03.20167791>

<sup>3</sup> Saliva is more sensitive than nasopharyngeal or nasal swabs for diagnosis of asymptomatic and mild COVID-19 infection Alvin Kuo Jing Teo et al, Scientific Reports volume 11, Article number: 3134 (2021), <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82787-z>