



Ministero dell'Università e della Ricerca
Direzione generale per il coordinamento e la valorizzazione della ricerca e dei suoi risultati
Uff. V.

Rendiconto di spesa Fondi 5 per mille ANNO 2017
Enti della Ricerca Scientifica

Ente¹: FONDAZIONE IEO-CCM
Codice fiscale: 97121070151
Indirizzo sede legale: Via Filodrammatici 10, 20121 Milano MI
Referenti (nominativo, telefono, e.mail): Daniela Pezzi – 0257489798 –
fondazione@ieo.it

Attività: Identificazione di falsi negativi nella diagnostica molecolare di SARS-CoV-2 mediante digital PCR e sequenziamento NGS.

Data di inizio progetto: 01/05/2020

Data di fine progetto: 01/05/2021

| VOCI DI SPESA | COSTO COMPLESSIVO | QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE |
|--|--------------------------|---|
| Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte) | | |
| Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing) | | |
| Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, ecc.) | € 36.270,24 | € 36.270,24 |
| Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi, missioni ecc.) | | |

¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

| | | |
|------------------------|--------------------|--------------------|
| Elaborazione dati | | |
| Spese amministrative | | |
| Altro (indicare quali) | | |
| | | |
| TOTALE | € 36.270,24 | € 36.270,24 |

Data

29/04/2020

Il Legale Rappresentante

Patrizia Sandretto Re Rebaudengo

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante

Patrizia Sandretto Re Rebaudengo

Progetto 5x1000 quota 2017

Titolo: "Identificazione di falsi negativi nella diagnostica molecolare di SARS-CoV-2 mediante digital PCR e sequenziamento NGS"

Responsabile: Prof. Camera Marina, Dr. Gualtiero Colombo, Dr. Paolo Poggio, Dr. Maurizio Pesce

L'approccio diagnostico standard attuale dell'infezione da SARS-CoV-2 è basato sulla ricerca dell'RNA virale nel tampone oro/rinofaringeo. Dal materiale biologico viene effettuata l'estrazione e la purificazione di RNA totale (compreso quello umano, quindi) per la successiva ricerca dell'RNA virale utilizzando una metodica molecolare abbastanza rapida, la cosiddetta Reverse Real-Time PCR (rRT-PCR). I kit per la diagnosi molecolare certificati, normalmente, contengono *primer* e sonde disegnati su regioni conservate del genoma virale SARS-CoV-2, più quelli per rilevare un gene "*housekeeping*" umano (controllo positivo interno).

Nella nostra esperienza non è, però, infrequente il riscontro di **pazienti con quadro clinico riferibile a grave sindrome respiratoria acuta**, comprovata da segni evidenti alla **TAC polmonare**, a fronte di **ripetuta negatività del tampone** così come rilevata dal kit diagnostico standard in uso presso il nostro Centro. **L'ipotesi da testare nello studio è che questi siano falsi negativi.**

Oggetto della presente proposta è, perciò, estendere l'indagine molecolare di ricerca dell'RNA virale con altre **metodiche potenzialmente più sensibili** e precise rispetto alla rRT-PCR, come la **digital PCR (dPCR)**. Questa è un perfezionamento tecnologico dei metodi convenzionali di PCR, che amplifica in modo clonale e quantifica direttamente filamenti di acidi nucleici, senza aver bisogno di standard endogeni per la misurazione. A fianco di questa un'altra metodica ad alta sensibilità, veloce ed accurata è l'amplificazione e il **sequenziamento diretto dell'intero genoma virale mediante next-generation sequencing (NGS)**. Questa permette, oltre alla conta diretta degli "ampliconi", la verifica delle varianti virali presenti nel tampone: tali varianti potrebbero sfuggire al rilevamento da parte dei kit standard usati in diagnostica.

In breve, il piano sperimentale prevede di ritestare per la presenza dell'RNA virale eluati precedentemente ottenuti dallo strumento impiegato per diagnosi, mediante sia tecnica dPCR che NGS. Verranno inclusi nello studio pazienti con chiaro quadro TAC suggestivo di polmonite COVID-19 e confrontati quelli positivi verso quelli negativi per diagnosi molecolare standard per SARS-CoV-2.

La durata del progetto è prevista essere di mesi 12.

Il preventivo dei costi del progetto prevede l'acquisto di materiale di consumo per euro 36.270,24

In dettaglio:

Retro transcription reagents , Master Mix for PCR reactions, Covid-19 primers , Digital PCR chips

Digital PCR loading kits, Kit for pathogen detection of SARS-CoV-2 RNA , TaqMan Control Kit

RT-qPCR Master Mix , cDNA Synthesis Kit , Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel

Reagents for library preparaton and loading , Ion Chip Kit, Plasticheria.