

ALESSANDRIA 11/11/2023

Salone di Rappresentanza AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Via Venezia 16, Alessandria

IL SEQUENZIAMENTO NGS NEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA: VALIDAZIONE, IMPLEMENTAZIONE ED UTILITÀ CLINICA

RESPONSABILE Scientifico

Dr. Andrea Rocchetti,

Direttore SC Microbiologia e Virologia e Anna, AOU SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

Dr.ssa Annalisa Roveta,

Responsabile SSD Laboratori della Ricerca, AOU SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo,
Alessandria

INTRODUZIONE

Le tecnologie che includono la genomica, la proteomica e i test rapidi molecolari stanno entrando rapidamente nei workflow diagnostici dei laboratori. Gli strumenti analitici avanzati, come l'intelligenza artificiale e l'apprendimento automatico, possono migliorare le informazioni estratte dai dati raccolti.

L'utilità clinica e diagnostica è vasta e comprende la speciazione/classificazione dei microrganismi, la tipizzazione dei ceppi batterici e virali, le indagini metagenomiche sui microbiomi, la previsione della resistenza antimicrobica, la sorveglianza della prevenzione delle infezioni e la localizzazione dei focolai.

Le numerose evidenze presenti in letteratura illustrano i vantaggi di ciascuno di questi punti. Nonostante le prove schiaccianti del valore e del potenziale trasformativo dell'NGS esistono diversi ostacoli da superare. Le tecniche di sequenziamento sono complesse, time-consuming e richiedono risorse e competenze specifiche.

L'integrazione del sequenziamento nei flussi di lavoro del laboratorio presenta ulteriori sfide legate al controllo di qualità, all'infrastruttura e agli standard di riferimento stabiliti. Ad esempio, l'implementazione di metriche di qualità standard non è facilmente adattabile ai tipici saggi diagnostici. Il costo delle apparecchiature e del software bioinformatico e informatico, sebbene in diminuzione, rimane relativamente alto. Infine, le linee guida standardizzate per l'NGS sono agli albori.

Il convegno del giorno 11 di Novembre 2023 ha coinvolto in quattro tavole rotonde tematiche esperti internazionali, professionisti di settore, aziende della diagnostica in vitro a altri portatori di interesse in un dibattito multidisciplinare al fine di ottenere al termine di ogni sessione una sintesi programmatica in grado di orientare le scelte e gli sviluppi della rete dei laboratori NGS.

TAVOLA ROTONDA n°1

Titolo: “L’applicazione del sequenziamento nello studio del Microbiota intestinale con un focus sulle problematiche relative al trapianto”

Relatori: *Sanguinetti M., Bona E., Drago L., Novi ML.*

Sono stati resi noti i dati relativi al numero di trapianti di microbiota intestinale (FMT) sinora eseguiti in Italia dai Centri FMT (n°169) per la gestione dell’infezione da C. difficile (CDI) ed i risultati raggiunti in termini di efficacia terapeutica (risoluzione delle recidive nel 98% dei casi trattati senza ulteriori trapianti e senza più ricorso alla chirurgia).

Sono stati descritti potenziali impieghi del trapianto di microbiota intestinale nel trattamento di alcune patologie ma mancano ancora delle evidenze. La maggiori promesse vengono riposte nel trattamento della colite ulcerosa.

Nella discussione sono emersi alcuni punti critici delle analisi NGS applicate al trapianto di microbiota ed allo studio delle popolazioni microbiche mediante analisi metagenomiche che possono essere così sintetizzati : necessità di maggiore dettaglio analitico per arrivare alla identificazione di specie batterica al di là dell’approccio seguito, la necessità di ottenere un referto esaustivo che contenga le informazioni essenziali, la remunerazione dei test da parte del SSN quando eseguiti nell’ambito FMT sia per il donatore nella fase di screening che nel ricevente nel follow-up. Sono stati esposti aspetti tecnici, vantaggi e criticità dell’approccio basato sul 16S (maggiormente diffuso per disponibilità di kit CE-IVD e facilità di utilizzo) e shotgun (meno diffuso, più complicato nella fase di analisi bioinformatiche, tuttavia più completo come informazioni). È emersa inoltre la necessità di figure formate nell’ambito della bioinformatica a supporto dei dati ottenuti per la loro corretta analisi e la necessità di un team multidisciplinare in cui confluiscono competenze microbiologiche, informatiche e gastroenterologiche.

Occorrono delle Linee Guida condivise sulla gestione del prodotto da trapiantare (fresco o congelato), sulle tecniche microbiologiche da applicare e sui comportamenti da adottare al fine di individuare i criteri minimi che i microbiologi devono seguire per garantire la qualità delle procedure adottate nella gestione del processo.

TAVOLA ROTONDA n°2

Titolo: “Il percorso diagnostico della tubercolosi”

Relatori: *Cirillo D., Gotta F., Piana F., Calcagno A., Corcione S.*

Sono stati esposti gli ultimi aggiornamenti sulle procedure di sequenziamento per la diagnosi di infezione da *Mycobacterium tuberculosis*. È emerso il ruolo preponderante del WGS per analisi clinico-epidemiologiche e per la completa identificazione delle farmaco-resistenze.

Tuttavia, parallelamente all'approccio WGS di riferimento, è stata esposta la possibilità di avvalersi di test commerciali CE IVD. Tuttavia, il test di elezione per produrre un antibiogramma genotipico sostitutivo di quello fenotipico resta il WGS in quanto i test fenotipici presentano problemi nella riproducibilità dei risultati e su alcune molecole antibiotiche sovrastimano la resistenza.

Alla luce delle nuove linee guida AMCLI (Associazione Microbiologi Clinici Italiani) sulla diagnostica microbiologica delle infezioni da micobatteri è stata sottolineata la necessità di ridefinire le attività dei laboratori regionali in quanto esiste una forte dispersione delle risorse e un non chiaro e condiviso flusso operativo tra i centri della rete.

Il numero di nuovi casi annui e l'incidenza ridotta di ceppi resistenti giustifica una razionalizzazione delle attività negli ospedali ed un accentramento di alcuni servizi in poche sedi dotate di requisiti strutturali ed organizzativi che consentano un flusso informativo rapido ed efficace sia in termini di sorveglianza epidemiologica che di risposta terapeutica sul singolo caso.

La diagnosi con metodiche molecolari rapide in Real time PCR (meglio se incluse nella lista dei prodotti approvati dall'OMS) deve affermarsi come imprescindibile test di prima linea soppiantando, gradualmente, l'esame microscopico. I laboratori periferici devono essere dotati di tale tecnologia.

I campioni positivi devono essere inviati in laboratori HUB dotati di BLS3 e che hanno possibilità di coltivare in fase liquida almeno 2.000 campioni/anno. Progressivamente l'analisi WGS sulle colture positive dovrà soppiantare i test fenotipici di sensibilità in vitro sui ceppi wild-tipe.

Alla luce degli interventi e degli elementi emersi dalla tavola rotonda si concretizza la possibilità di valutare un nuovo algoritmo diagnostico che partendo dalla positività del test Real time-PCR per *Mycobacterium tuberculosis* preveda l'invio immediato del campione al laboratorio HUB per l'effettuazione della coltura. Sulle colonie isolate in coltura, il laboratorio HUB esegue sequenziamento WGS e quando si evidenzia un ceppo Wild Type viene refertato l'antibiogramma genotipico che soppianta l'antibiogramma fenotipico.

Quando sono presenti resistenze al test di screening in Real time PCR per la Rifampicina, il campione di MTB MDR viene inviato al laboratorio HUB che esegue la coltura e la invia al centro di riferimento per l'analisi WGS e l'antibiogramma fenotipico (per la conferma delle analisi mutazionali) ed infine, per le analisi epidemiologiche su larga scala.

Occorre individuare, per ragioni di natura medico-legale, la sede più idonea per conservare tutti ceppi MTB isolati garantendo la qualità dello stoccaggio oltre che la corretta distribuzione dei dati ad essi associati.

La conservazione dei ceppi batterici, l'analisi WGS dei ceppi e le analisi epidemiologiche costituiscono rilevanti problemi non ancora risolti e la mancanza di un percorso chiaro e condiviso con la definizione delle responsabilità e delle competenze rimane ad oggi aperto.

TAVOLA ROTONDA n°3

Titolo: **“La diagnostica virologica post Covid-19”**

Relatori: **Capobianchi M.R., Ghisetti V., Sambri V.; Costa C.**

Sono stati riportati gli aspetti metodologici applicabili alla diagnostica virologica ponendo l'accento sulla necessità di investigare le potenzialità delle tecnologie con approccio long reads. Queste tecnologie possono generare letture lunghe da decine a migliaia di kilobasi con un'accuratezza che si avvicina a quella delle tecnologie di sequenziamento short reads e possono risolvere alcune problematiche interpretative delle regioni più “impegnative” del genoma virale.

Le potenzialità dell'analisi si estendono fino a livello di quasi specie (es. HIV), al tracciamento delle dinamiche di popolazione, in risposta a trattamenti terapeutici, e allo sviluppo di vaccini a mRNA (contro SARS-CoV-2). È stata successivamente presentata la struttura della rete NGS per COVID-19 e per le farmacoresistenze di HIV-1. In questa sessione sono emersi i seguenti aspetti e le criticità che occorrerà in futuro affrontare: la centralizzazione delle analisi WGS nell'ambito virologico e quindi la necessità di una rete che preveda centri di riferimento nazionali, la necessità di automazione delle library per processare grandi numeri e la comprensione di quali virus sorvegliare attivamente parallelamente a quanto fatto dalla rete Respivirnet. È stato introdotto anche l'argomento del viroma e la necessità di impegnarsi nella ricerca per integrare le conoscenze sul microbiota e per affrontare complessivamente le criticità legate ad aspetti etici e tecnici (contaminazione, standardizzazione, analisi di grandi flussi di dati).

TAVOLA ROTONDA n°4

Titolo: “I Le sorveglianze microbiologiche e i problemi legati all’informatizzazione dei flussi di dati”

Relatori: *Stefanelli P., Raglio A., Ferrara L., Zotti C.; De Rosa F.*

Il focus sulla piattaforma nazionale per il monitoraggio dell'infezioni da SARS CoV-2 e sulla possibilità di estendere a breve l'automazione informatica ai virus influenzali ha evidenziato come il tema delle Sorveglianze Microbiologiche sia attenzionato a livello Nazionale e come molto si stia facendo rispetto al passato.

Purtroppo, sul versante della sorveglianza delle resistenze batteriche e sulla circolazione dei microrganismi ALERT occorre lavorare in una logica di rete cercando l'integrazione tra centri e scardinando molti dei principi regolatori che sinora hanno prevalso nei nostri sistemi organizzativi locali e regionali.

Emerge la grande difficoltà a lavorare in rete in quanto manca un coordinamento regionale ma soprattutto un'automazione informatica della raccolta dati. Tutti i dati vengono raccolti manualmente dai laboratori a discapito della qualità e sono possibili solo analisi retrospettive mentre la pandemia ha messo in luce la necessità di ottenere informazioni, quasi in tempo reale per monitorare nuovi cluster e focolai sostenuti da batteri MDR.

Il WGS, tramite lo sviluppo di kit commerciali, piattaforme user-friendly per l'interpretazione dei dati e l'ottimizzazione dei flussi di informazioni intra e inter-ospedalieri può rappresentare un mezzo utile a gestire e comprendere cluster epidemici. Si sottolinea la necessità di individuare i centri in grado di lavorare rapidamente su questa linea di produzione anche per gli risvolti che tale attività potrebbe rivestire in ambito medico legale.

Una stretta collaborazione con aziende ospedaliere, con i CIO e con i medici infettivologici potrebbe portare in breve tempo ad utilizzare l'NGS in ambito clinico sui singoli casi ed in ambito epidemiologico per la tipizzazione clonale degli isolati.

Redazione ad opera di Andrea Rocchetti