

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

**11** NOVE  
MBRE



**LA DIAGNOSTICA VIROLOGICA E L'APPLICAZIONE NGS: La rete NGS**

***Valeria Ghisetti***

## RETE NGS – MICROBIOLOGIA



***A partire dal 2022*** (DGR n.35-6381 del 28/12/2022; DD A1400A del 3 febbraio 2023)

- **Definizione aree di competenza**
- **Definizione aree di sviluppo NGS in microbiologia**
  - Virus, varianti e resistenza agli antivirali
  - Resistenza antimicrobica, Microbiota e Tubercolosi
- **Identificazione piattaforme NGS di riferimento**
- **Definizione livelli di produttività e incrementi annui**
  - Circa 10 000 pazienti a fine 2024

# RETE NGS – MICROBIOLOGIA



| Area Omogenea         | Laboratorio NGS DI RIFERIMENTO | Tipo di piattaforma NGS | AREA DIAGNOSTICA DI SVILUPPO                                                    |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Torino e Torino Ovest | Micro&Viro ASO CDSS            | Microbiologia           | TRAPIANTO MICROBIOTA FECALE, RESISTENZA ANTIMICROBICA, FARMACORESISTENZA VIRALE |
|                       | Micro&Viro ASL Città di Torino | Microbiologia           | FARMACORESISTENZA VIRALE, VIRUS EMERGENTI, TUBERCOLOSI                          |
| Piemonte Sud-Est      | Micro&Viro ASO ALESSANDRIA     | Core-lab                | TRAPIANTO MICROBIOTA FECALE, RESISTENZA ANTIMICROBICA                           |
| Piemonte Sud-Ovest    | Micro&Viro ASO CUNEO           | Core-lab                | TUBERCOLOSI                                                                     |
| Nord-Est              | Micro&Viro ASO NOVARA          | Core-lab                | FARMACORESISTENZA VIRALE, VIRUS EMERGENTI                                       |

# Rete Piemontese Laboratori SSR COVID-19

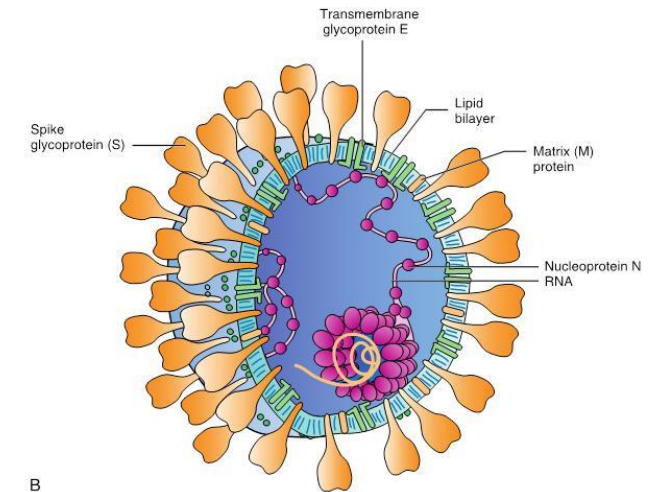


Amedeo di Savoia

RESPIVIRNET  
SORVEGLIANZA INTEGRATA DEI VIRUS RESPIRATORI

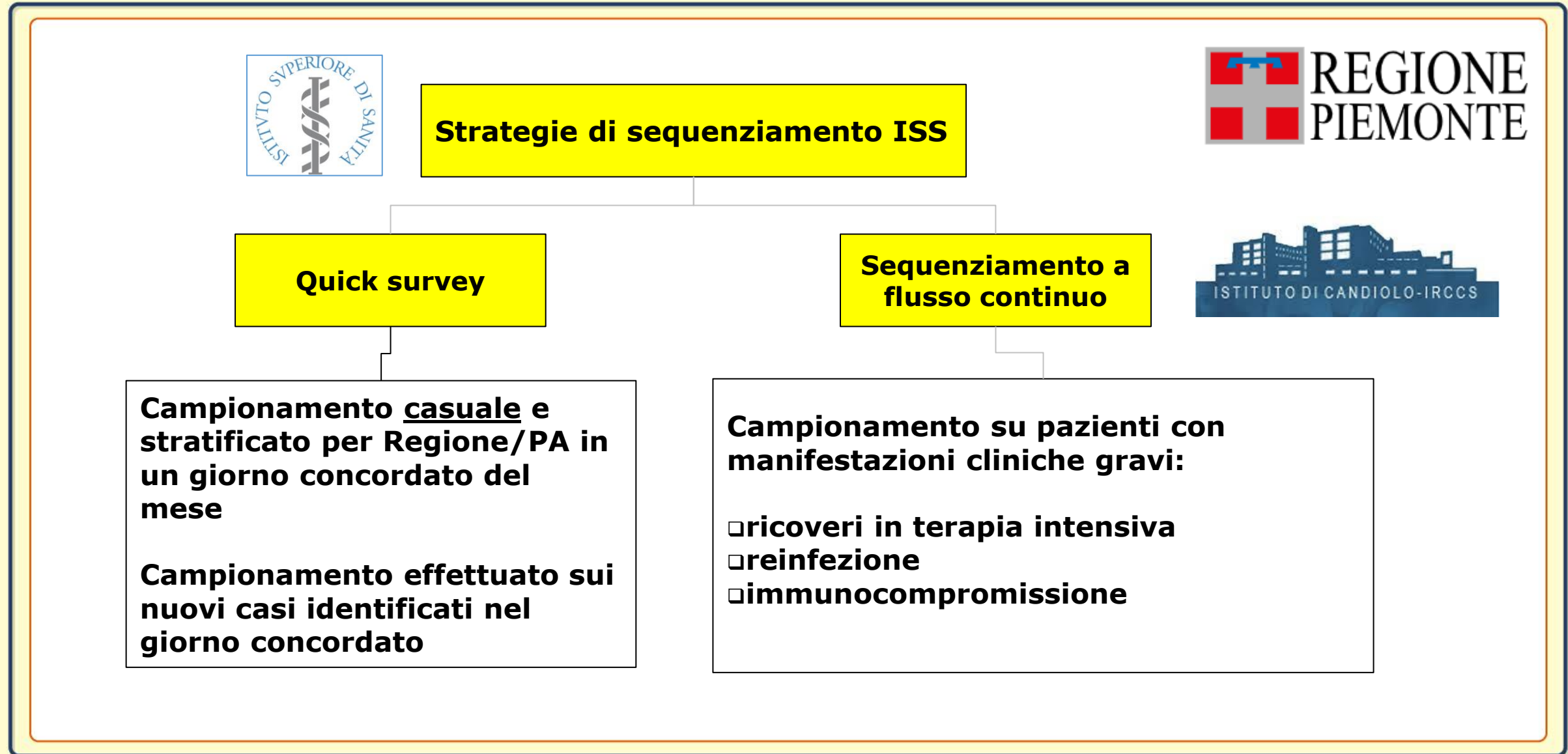


N. 16 Lab SSR COVID



**IRCCS Candiolo: Centro Unico Regionale  
sequenziamento SARS CoV-2: 6806  
sequenze depositate in I.Co.Gen**

# Sorveglianza genomica e sequenziamento di SARS-CoV-2



# Sorveglianza genomica e sequenziamento di SARS-CoV-2



| Periodo   | N. sequenze analizzate | Variante prevalente    | Varianti minoritarie                           |
|-----------|------------------------|------------------------|------------------------------------------------|
| Anno 2021 | 3675                   | Alpha<br>B.1.1.7 (80%) | Delta<br>B.1.617.2 (12%)                       |
| Anno 2022 | 2568                   | Omicron<br>BA.1 (44%)  | Omicron<br>BA.2 (29%)<br>Omicron<br>BA.5 (20%) |
| Anno 2023 | 292                    | Ricombinanti<br>(54%)  | XBB.1 (39%)                                    |



**16 185 920** sequenze di SARS CoV-2

I-Co-Gen (ISS, dal 2021): **209.236** sequenze

**Piemonte: 6.806** sequenze al 30/09/2023



**Azienda Sanitaria Locale "Città di Torino"**  
Regione Piemonte



**REGIONE  
PIEMONTE**

Dal 2002 laboratorio di Biologia Molecolare

□ **Circa 70.000 test/anno escluso SARS CoV-2**

□ Sequenziamento full-pop/bulk per HIV dal 2002, dal 2008 anche virus influenzali ed epatitici



**RespiVirNet - Sorveglianza integrata dei virus respiratori**

Istituto Superiore di Sanità

**NGS**  
*Dal 2021*

**SARS CoV-2**

**HIV**

**HCV**

**Flu A & B**

**Mpox**

**Farmacoresistenza  
Analisi di CLUSTER**

**Circa 1500 pazienti/anno**

# Resistenze di SARS-CoV-2 ad anticorpi e antivirali



580 pazienti



Stanford University  
**CORONAVIRUS ANTIVIRAL & RESISTANCE DATABASE**  
A Stanford HIVDB team website. Last updated on 9/7/2022, 8:18:38 PM.

HOME VARIANTS **RESISTANCE** ANALYSIS PROGRAM CITATION SUPPORT COVDB

## Susceptibility summaries

[Search database](#) • [Suggest new study](#) • [report error](#)

SEARCH DATABASE

Last updated on Sep 7, 2022, 9:46 PM

**Table 1**

Virus variants and spike mutations vs monoclonal antibodies

**Table 2**

Convalescent plasma and variant cross neutralization titer

**Table 3**

Vaccinee plasma and variant neutralization titer

**Figure 1**

Distribution of absolute neutralizing titers of 2 dose, no history of infection vaccinee plasma (VP) associated with

## Table 1: Virus variants and spike mutations vs monoclonal antibodies

### Fold reduced neutralizing susceptibility to monoclonal antibodies under Emergency Use Authorization (EUA)

Copy to clipboard

| Test mAb | BAM                 | ETE               | BAM/ETE           | CAS               | IMD               | CAS/IMD           | CIL               | TIX               | CIL/TIX           | SOT               | BEB              | ADI              |
|----------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Alpha    | 1 <sub>22</sub>     | 11 <sub>19</sub>  | 1.3 <sub>9</sub>  | 1 <sub>31</sub>   | 0.6 <sub>32</sub> | 0.9 <sub>14</sub> | 0.6 <sub>13</sub> | 1.5 <sub>13</sub> | 0.9 <sub>12</sub> | 2 <sub>26</sub>   | 0.9 <sub>6</sub> | 1.3 <sub>6</sub> |
| Beta     | >1000 <sub>27</sub> | 474 <sub>24</sub> | 990 <sub>12</sub> | 76 <sub>37</sub>  | 0.6 <sub>37</sub> | 1.6 <sub>19</sub> | 1.1 <sub>13</sub> | 5.8 <sub>15</sub> | 2 <sub>13</sub>   | 1.0 <sub>26</sub> | 1 <sub>7</sub>   | 2.8 <sub>6</sub> |
| Gamma    | >1000 <sub>16</sub> | 348 <sub>16</sub> | 404 <sub>4</sub>  | 124 <sub>24</sub> | 0.4 <sub>24</sub> | 1 <sub>9</sub>    | 0.5 <sub>11</sub> | 3.7 <sub>11</sub> | 0.9 <sub>8</sub>  | 1 <sub>21</sub>   | 1 <sub>5</sub>   | 2.2 <sub>6</sub> |
| Delta    | >1000 <sub>23</sub> | 0.4 <sub>23</sub> | 1 <sub>9</sub>    | 0.7 <sub>30</sub> | 2 <sub>31</sub>   | 1.5 <sub>12</sub> | 2.5 <sub>12</sub> | 1 <sub>13</sub>   | 1 <sub>13</sub>   | 1.3 <sub>23</sub> | 1 <sub>11</sub>  | 1.5 <sub>6</sub> |

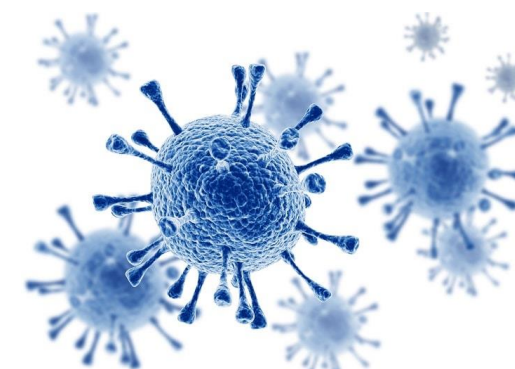
# Rete Piemonte-Valle d'Aosta HIV-Net

**Amedeo di Savoia**  
**NGS da Aprile 2021 (prima Sanger)**

| Numero di Test NGS FARMACORESISTENZA HIV |            |            |                     |
|------------------------------------------|------------|------------|---------------------|
| per area geografica                      | Anno 2021  | Anno 2022  | Anno 2023 (ottobre) |
| AL                                       | 36         | 58         | 44                  |
| AT                                       | 28         | 27         | 13                  |
| BI                                       | 2          | 0          | 1                   |
| CN                                       | 38         | 28         | 29                  |
| NO                                       | 4          | 0          | 1                   |
| VC                                       | 0          | 0          | 4                   |
| TO-CDSS                                  | 9          | 7          | 7                   |
| TO CDT                                   | 357        | 300        | 319                 |
| VDA                                      | 20         | 26         | 26                  |
| <b>TOTALE</b>                            | <b>494</b> | <b>446</b> | <b>444</b>          |

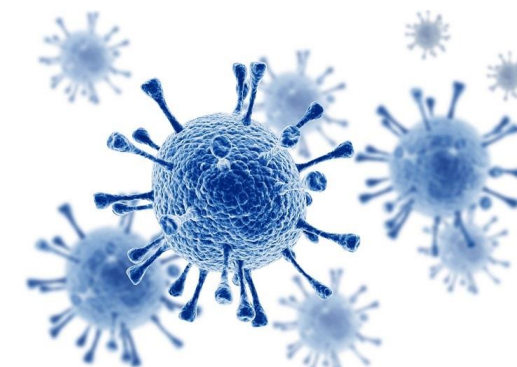


**HIV-NGS: Sensibilità:**  
**HIV RNA 500 copie/ml**



# Rete Piemonte-Valle d'Aosta HIV-Net

## Prevalenza della diffusione delle resistenze di HIV



| Anni           | N.PAZ | PI/Resistenza |     | NN/Resistenza |      | N/Resistenza |      | I/Resistenza |     |
|----------------|-------|---------------|-----|---------------|------|--------------|------|--------------|-----|
|                |       | N.            | %   | N.            | %    | N.           | %    | N.           | %   |
| 2021           | 494   | 12            | 2.4 | 79            | 16.0 | 36           | 7.3  | 17           | 3.4 |
| 2022           | 446   | 10            | 2.2 | 50            | 11.2 | 33           | 7.4  | 13           | 2.9 |
| 2023 (OTTOBRE) | 444   | 15            | 3.4 | 80            | 18.0 | 49           | 11.0 | 16           | 3.6 |

NOTA:

Il test per la farmacoresistenza di HIV viene eseguito sulle nuove diagnosi in pazienti naive e in quelli in fallimento virologico che corrispondono a circa il 15-20% dei pazienti in HAART.

Nel triennio 2019 - 2021, sono state segnalate in Piemonte 365 nuove diagnosi di infezione da HIV, nel 2021 i casi sono stati 137 pari a un tasso di incidenza di 3,2 casi ogni 100.000 abitanti (*fonte: SEREMI*)

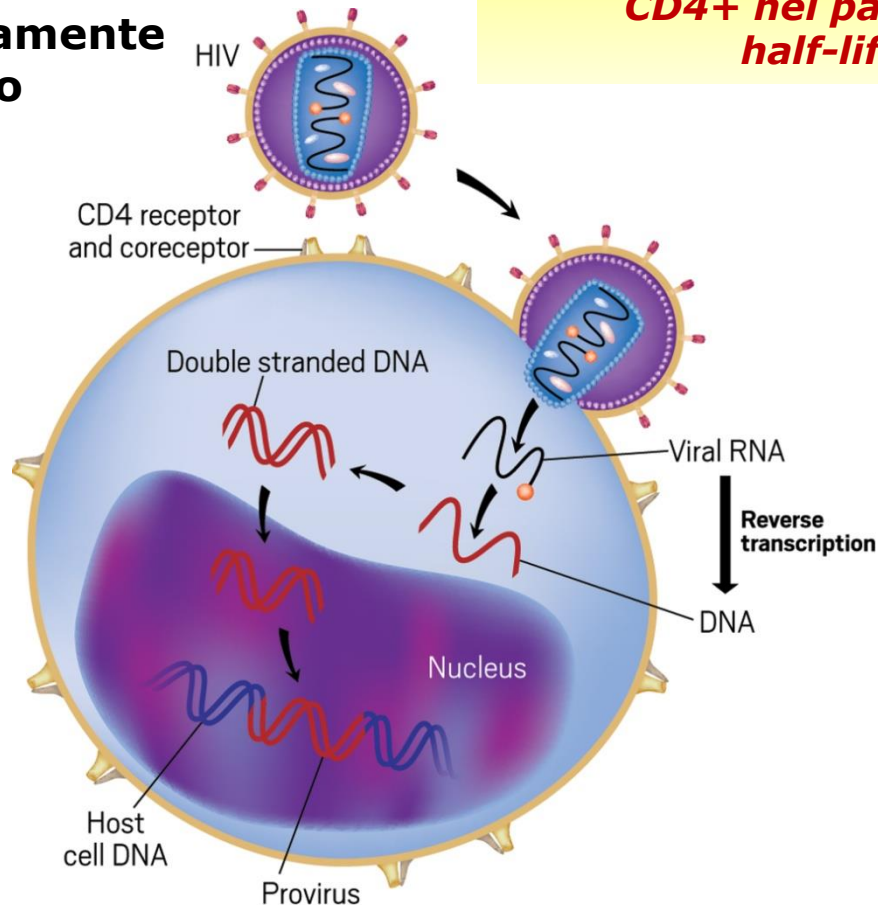
# Direzioni di lavoro: reservoirs di HIV

**Icona, 2023:**

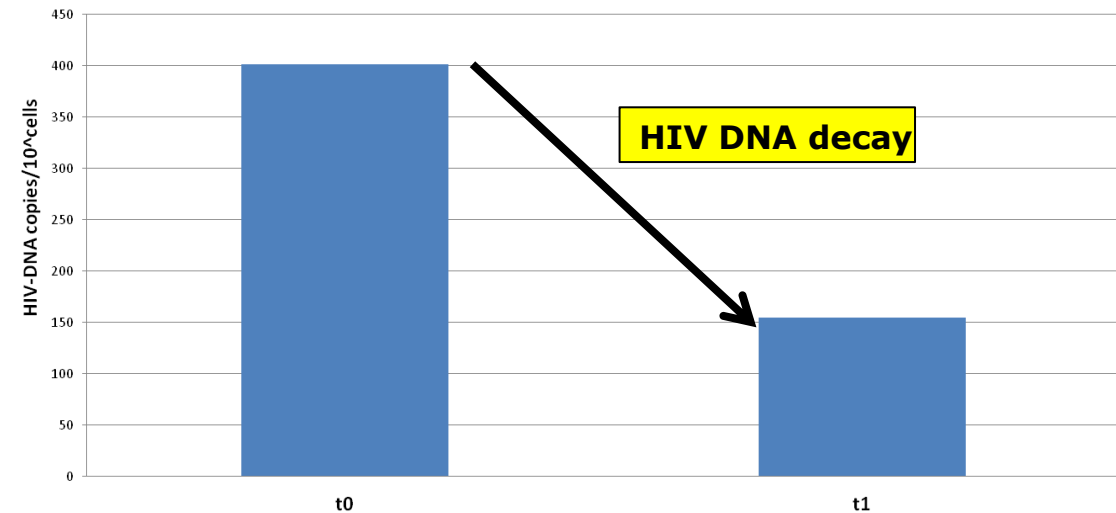
**Il 93% pazienti con  
infezione da HIV è  
virologicamente  
soppresso**

## ARCHIVED DRUG-RESISTANT MUTATIONS

***HIV proviral DNA: 1-3 copie/10 000  
CD4+ nei pazienti soppressi  
half-life  $\approx$  25 anni***



## HIV-RNA plasma negative patients switching to CAB/RPV



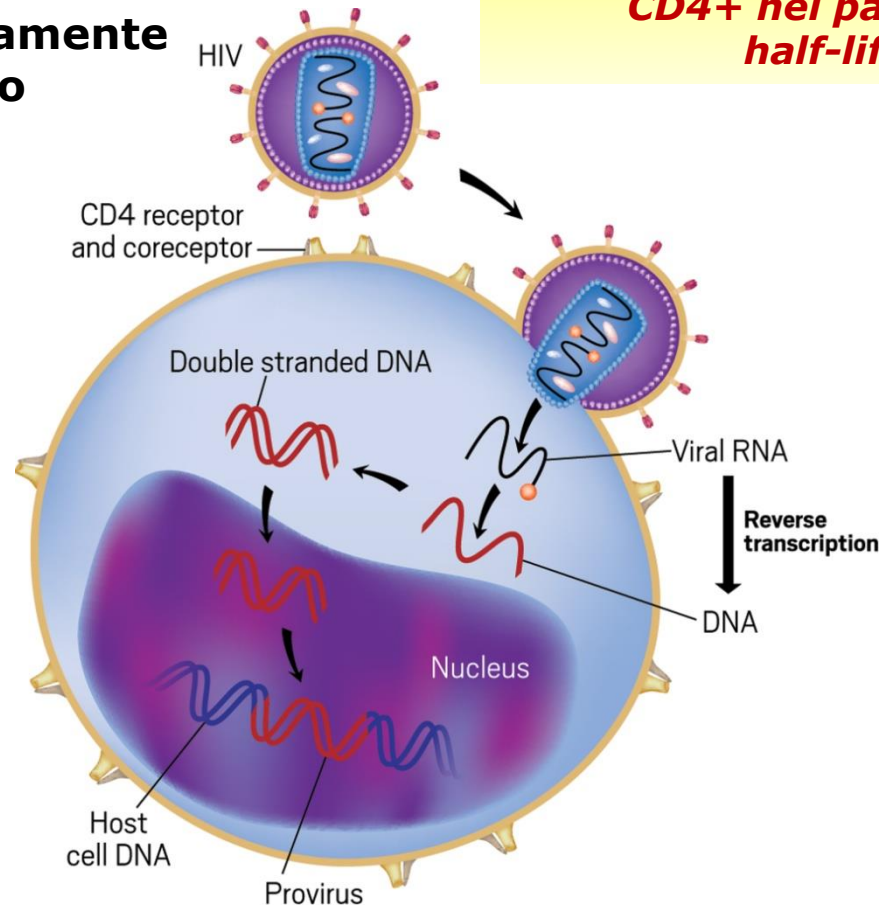
**N.32 patients.  $\approx$  150 day-monitoring  
Ghisetti & Alice personal data, 2023**

# Direzioni di lavoro: reservoirs di HIV

**Icona, 2023:**  
Il 93% pazienti con  
infezione da HIV è  
virologicamente  
soppresso

## ARCHIVED DRUG-RESISTANT MUTATIONS

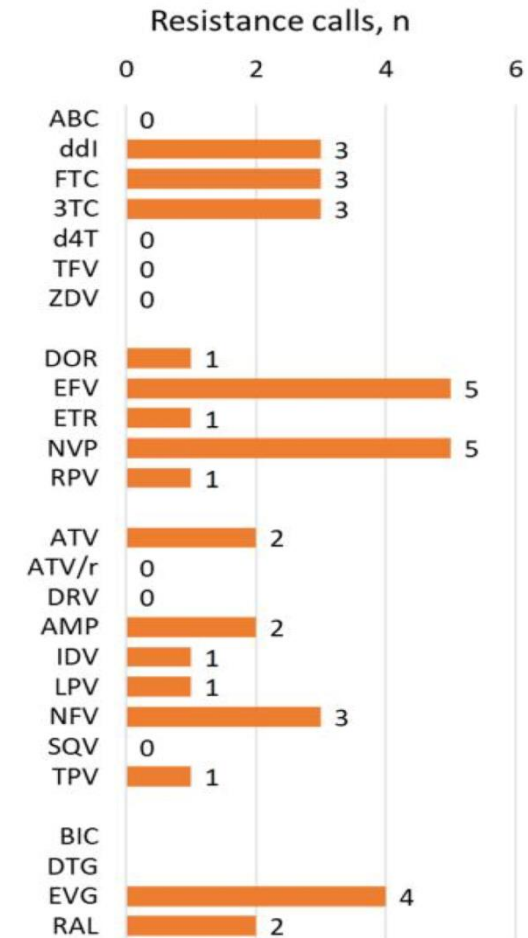
**HIV proviral DNA: 1-3 copie/10 000  
CD4+ nei pazienti soppressi  
half-life  $\approx$  25 anni**



**NGS**

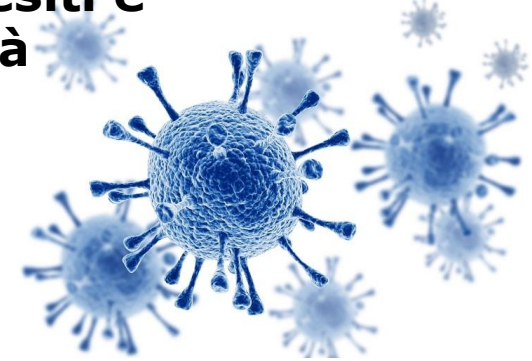
Resistance to ARVs detected in  
HIV-1 DNA across test pairs from  
65 patients with pan-sensitive  
plasma

*OFID, 2023 Curanovic et al.*



# Global sharing Net-works: HIV e virus epatitici

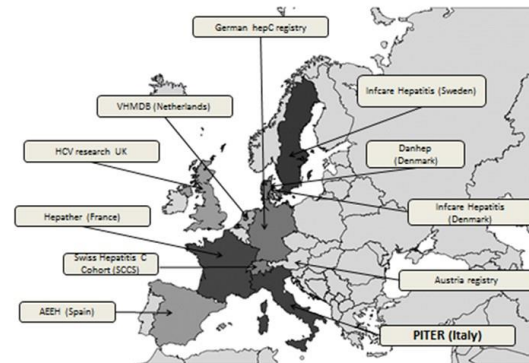
**Multidisciplinarietà, partecipazione, condivisione esiti e linee di lavoro, programmi di verifica di qualità**



**FONDAZIONE VIRONET C ONLUS**



Coorti HCV in EUROPA  
**STRUMENTI PER LA CREAZIONE DI EVIDENZE**



**Fondazione Icona**  
ITALIAN COHORT NAIVE ANTIRETROVIRALS

[www.fondazioneicona.org](http://www.fondazioneicona.org)



# Net-work di qualità per NGS nella virologia



AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY

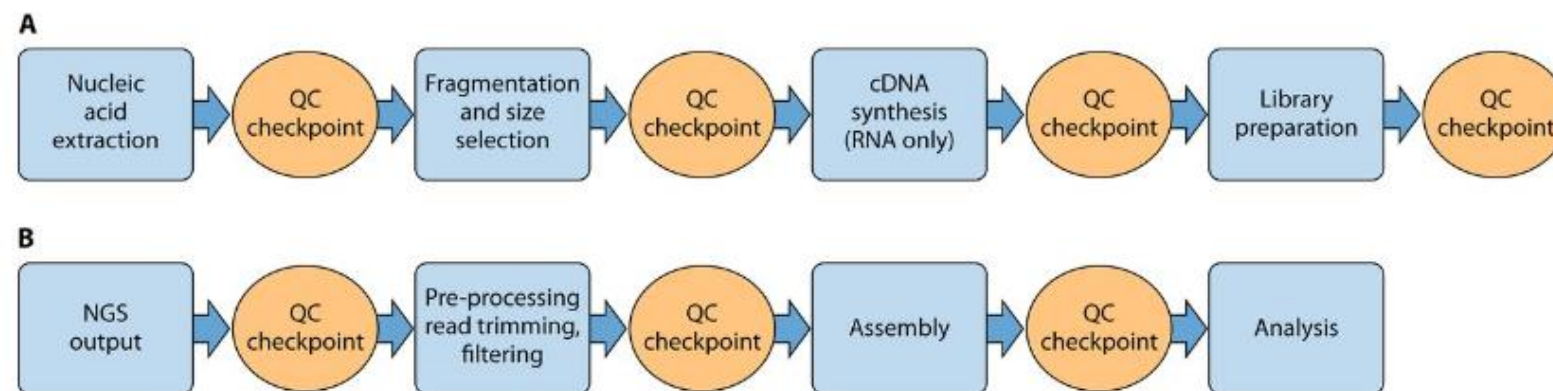


FIG 1 NGS workflow with QC checkpoints in the wet laboratory (A) and dry laboratory (B).

# Net-work di qualità per NGS nella virologia



**EVD-LabNet**

|                                     |                             |                                                    |                                     |                           |                              |                                                                                     |  |
|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>Individual Report</b>            |                             | <b>QCMD 2022 HIV Drug Resistance EQA Programme</b> |                                     |                           |                              |  |  |
| <b>Catalogue Code:</b><br>QAV024131 | <b>Ref Code:</b><br>HIVDR22 | <b>Challenge:</b><br>S                             | <b>Analysis Type:</b><br>Sequencing | <b>Dataset:</b><br>587420 | <b>Participant:</b><br>IT023 |                                                                                     |  |



**Grazie dell'attenzione !**