

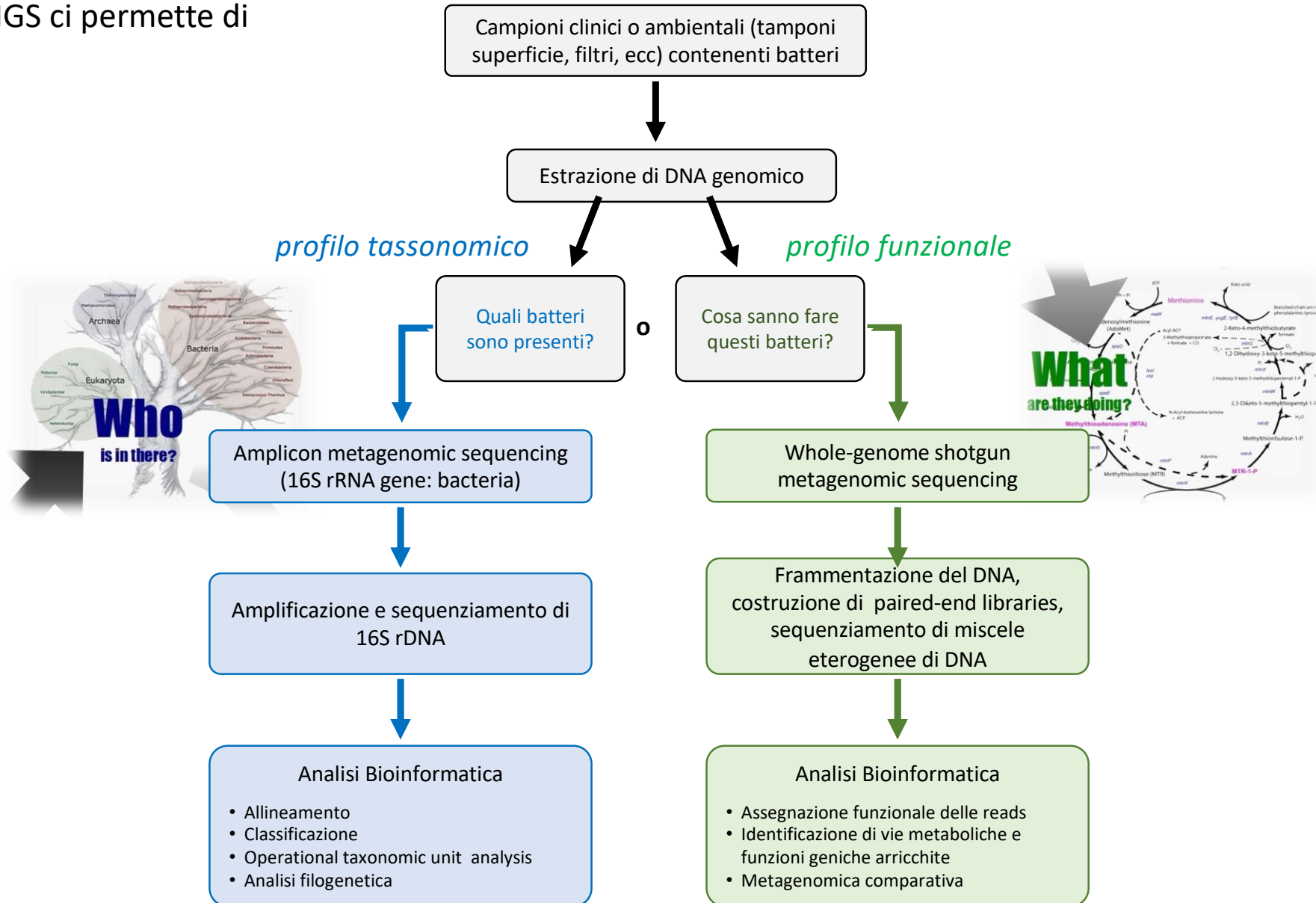
IL SEQUENZIAMENTO NGS NEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA: VALIDAZIONE, IMPLEMENTAZIONE ED UTILITÀ CLINICA

11 **NOVE**
MBRE
2023
ore
9.00



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

L'approccio NGS ci permette di analizzare....





MINISTERO DELLA SALUTE

Istituto Superiore di Sanità
Centro Nazionale Trapianti



WHO Collaborating Centre
On Vigilance and Surveillance for
Human Cells, Tissues and Organs

Unit Microbiota: Autorizzazione Trapianto Microbiota Fecale Umano (FMT)



CENTRO NAZIONALE
TRAPIANTI



WHO Collaborating Centre
On Vigilance and Surveillance for
Human Cells, Tissues and Organs

Alla cortese attenzione

Dott. Carlo Gemme
Responsabile Centro FMT
AOAL Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo
Alessandria

e, p.c. Dott. Luciano Bernini
Direttore Sanitario
AOAL Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo
Alessandria

Prof. Antonio Amoroso
Responsabile Centro Regionale Trapianti
Regione Piemonte/Valle D'Aosta

Oggetto: autorizzazione alla partecipazione al Programma Nazionale sul Trapianto di Microbiota Fecale umano (FMT)

Gentile Dott. Gemme,
in seguito alla domanda di adesione al Programma Nazionale FMT e in considerazione dell'esito della verifica effettuata in loco in data 28 aprile 2022, relativa alla valutazione della conformità ai requisiti tecnico organizzativi previsti, e della risposta della AOAL Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo (Prot 12396 del 31.05.2022 e successiva revisione del DVA 113-rev 3) alle osservazioni emerse nel corso della visita ispettiva (Prot. AOO-ISS-20/05/2022-0019679 Class: CNT 01.00),

il Centro Nazionale Trapianti autorizza

la partecipazione della AOAL Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria al Programma Nazionale sul Trapianto di Microbiota Fecale umano (FMT) secondo le indicazioni previste dal Programma stesso.

Si raccomanda, in caso di utilizzo di materiale congelato, di finalizzare preliminarmente i saggi di vitalità batterica delle specie anaerobie e aerobie del prodotto scongelato in base a quanto riportato nel programma emendato, approvato dal CSS (Prot. 1386.CNT.2020_ emendamento al "Programma Nazionale sul trapianto di microbiota fecale umano).

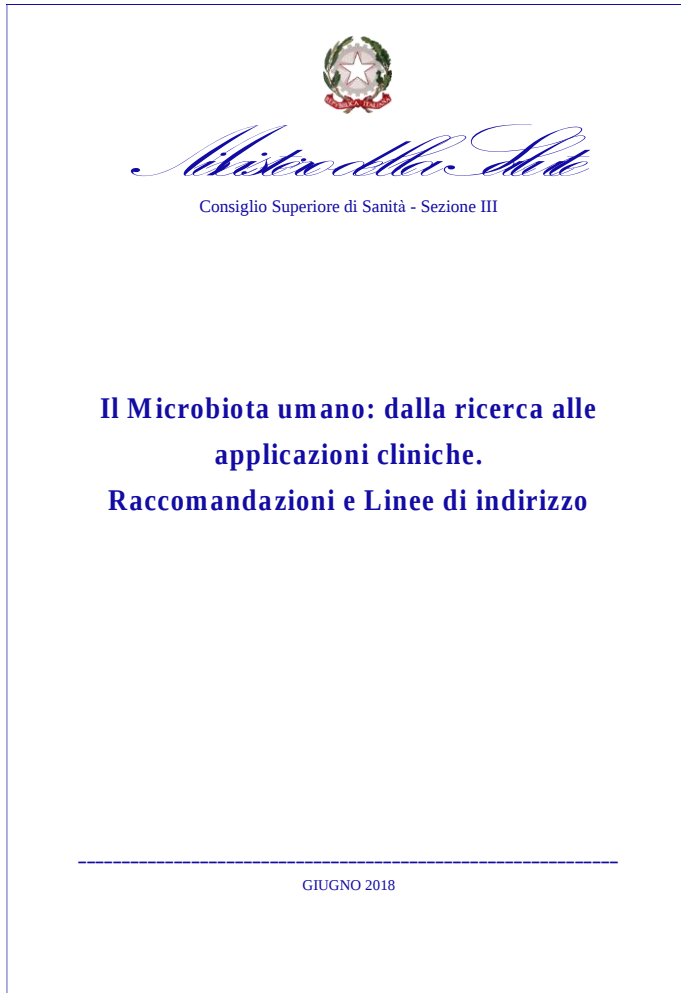
Istituto Superiore di Sanità
Centro Nazionale Trapianti

Viale Regina Elena 299, 00161 - Roma (I)
Partita I.V.A. 03657731000
C.F. 80211730587

Telefono: + 39 06 49904040 - 4041 - 4045
Fax: 06 49904101
e-mail: cnt@iss.it PEC: cnt@pec.iss.it
www.trapianti.salute.gov.it

Giugno 2022
AUTORIZZAZIONE
e adozione del DVA AZIENDALE

Cosa ci indicano le linee guida ministeriali..



INDICAZIONI DEL CENTRO NAZIONALE TRAPIANTI

Donatori

Selezione del donatore

Numerose evidenze dimostrano come non ci sia differenza fra donatori consanguinei e donatori non consanguinei in termini di efficacia e sicurezza, almeno quando il MFU è utilizzato per trattare l'infezione da CDI.

Prima della donazione è necessario fornire adeguate informazioni al donatore e deve essere acquisito il consenso informato dello stesso e il consenso al trattamento dei dati personali, come previsto dalla normativa vigente sulla privacy.

Prima della donazione di MFU è necessario un accurato screening del soggetto per evitare la trasmissione di malattie ai pazienti che consiste in tre procedure fondamentali:

1. screening iniziale tramite questionario preliminare;
2. screening tramite esami bioumorali (siero e feci) dei soggetti risultati idonei al questionario;
3. valutazione finale tramite questionario e test molecolare rapido per i principali patogeni enterici sul campione fecale il giorno stesso della donazione.

È fortemente consigliato lo screening del profilo di microbiota fecale e la comparazione del profilo tra donatore e ricevente.



**Il Microbiota umano: dalla ricerca alle
applicazioni cliniche.
Raccomandazioni e Linee di indirizzo**

**Il sequenziamento NGS del
microbiota non deve avvenire
nella stessa stanza dedicata alla
preparazione del trapianto fecale**

INDICAZIONI DEL CENTRO NAZIONALE TRAPIANTI

1. Requisiti della struttura clinica

Devono essere disponibili stanze di degenza o ambulatoriali dedicati nonché un'attività ambulatoriale dedicata per la gestione clinica dei donatori e dei riceventi.

Il centro di FMT deve documentare i trattamenti di FMT effettuati attraverso la registrazione delle procedure, comprensive dei dati relativi ai pazienti/donatori, alla preparazione del MFU e alla qualità del prodotto finale e i risultati in termini di efficacia e di sicurezza del trattamento.

2. Requisiti laboratoristici

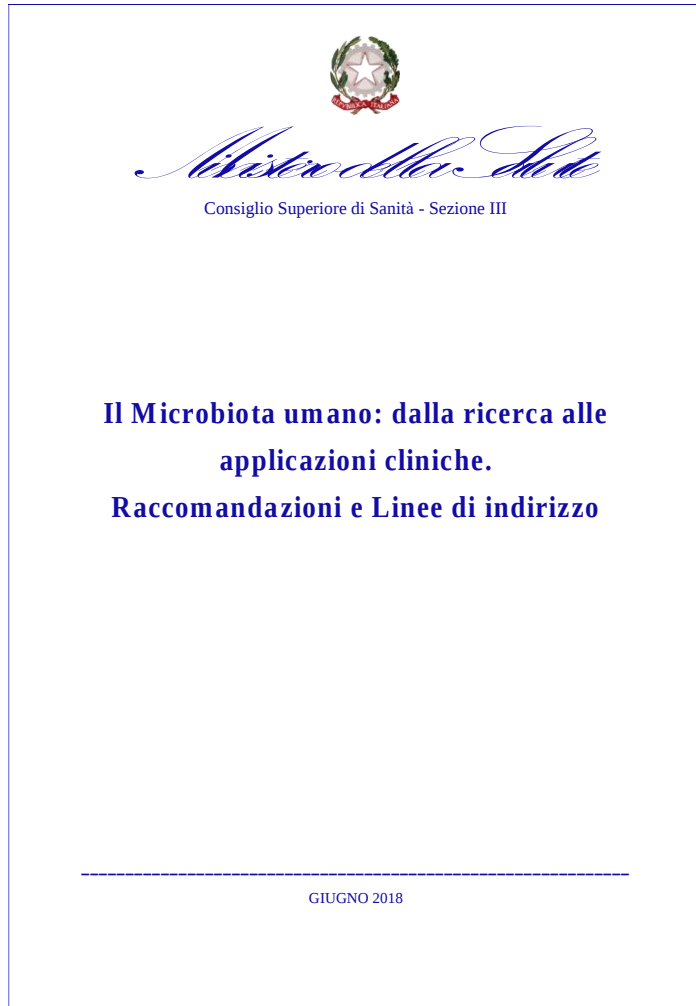
Il laboratorio di microbiologia deve assicurare:

- ✓ l'utilizzo di metodiche di *Next generation sequencing* (NGS) per la definizione del profilo di microbiota del donatore, che insieme alle caratteristiche cliniche, indirizzi nella scelta del donatore idoneo;
- ✓ la gestione in qualità del processo di laboratorio mediante tecniche convenzionali e molecolari per lo screening infettivologico sul donatore e sul materiale da infondere, comprensivo dei test rapidi per l'individuazione dei più importanti patogeni responsabili di patologie gastrointestinali;
- ✓ la partecipazione a controlli di qualità interni ed esterni (VEQ), con esito positivo, e l'implementazione di un sistema di gestione della qualità a garanzia del massimo grado di sicurezza e qualità microbiologica del prodotto.

3. Requisiti del locale per la preparazione di FMT

- ✓ Il Centro FMT deve disporre di un locale/area dedicato al controllo, alla lavorazione e alla distribuzione del FMU nel rispetto dei requisiti di qualità e sicurezza previsti dal d.lgs. 191/07 per le suddette fasi;
- ✓ le attività di preparazione del FMU devono essere condotte in conformità a quanto descritto nei paragrafi precedenti;
- ✓ l'area deve possedere i requisiti previsti per un laboratorio BSL2.

Nota: A fronte di evidenze scientifiche che si rendessero disponibili si procederà a una immediata revisione del presente documento.



INDICAZIONI DEL CENTRO NAZIONALE TRAPIANTI

FOLLOW-UP DEI PAZIENTI

Dai dati di letteratura, il FMT ha dimostrato di essere una procedura sicura, con un numero molto basso di effetti collaterali (e solitamente di lieve entità), anche nei pazienti immunocompromessi e nei pazienti critici. Gli eventi avversi a breve termine che accadono più comunemente dopo la procedura di trapianto di MFU sono: diarrea, dolori addominali, stipsi, febbre. Eventi avversi gravi, quali batteriemia, perforazione intestinale, morte, sono molto rari.

Il paziente deve essere seguito nell'immediato periodo post-trapianto per valutare l'insorgenza di

6

Consiglio Superiore di Sanità - Sezione III
Il Microbiota Umano: dalla ricerca alle applicazioni cliniche.
Raccomandazioni e Linee di indirizzo

reazioni/eventi immediati. Successivamente il paziente deve essere seguito per almeno 8 settimane dopo la procedura di trapianto per valutare l'efficacia del trattamento e gli eventuali eventi avversi a breve termine.

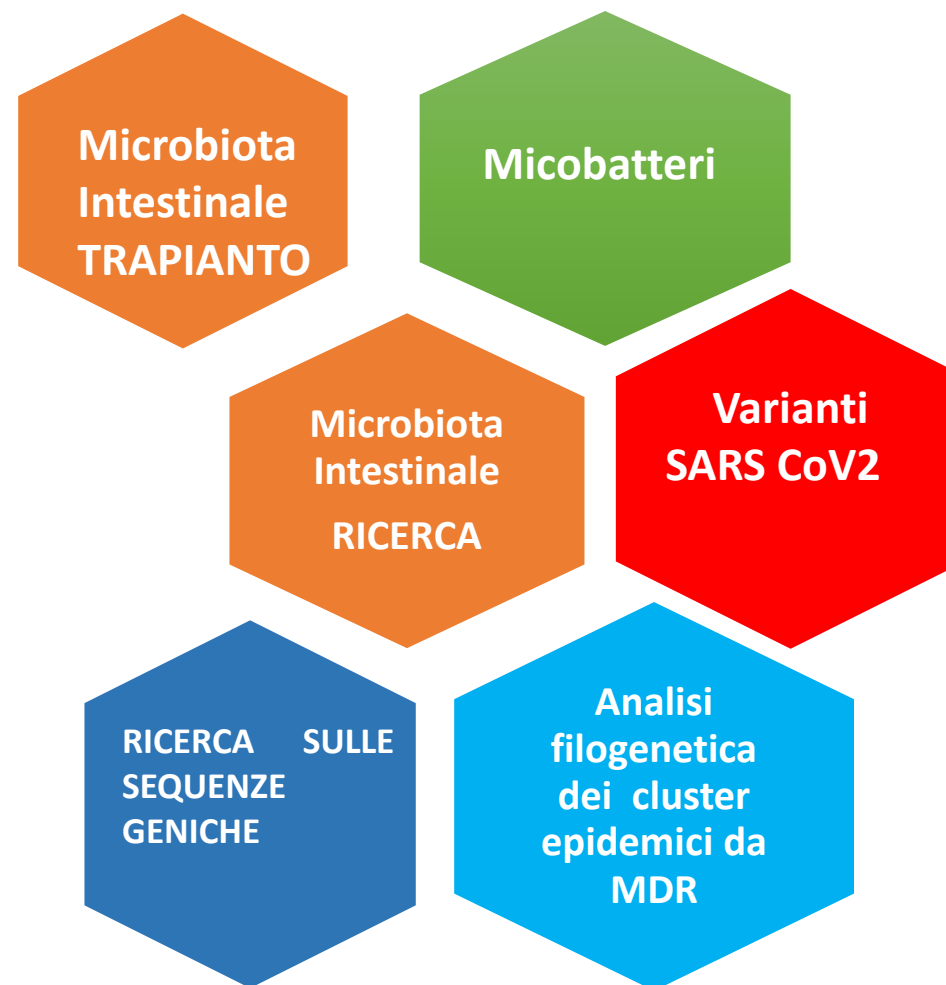
Eventuali reazioni/eventi avversi gravi verificatisi nei pazienti devono essere segnalati al CNT da parte del centro FMT entro 48 ore.

Caso per caso deve essere valutata la frequenza dell'analisi del microbiota del paziente. Si ritiene utile una raccolta di campioni fecali a 7, 30 e 60 giorni dopo il trapianto per completare il follow-up clinico (diario sintomi, parametri di laboratorio), consentire la mappa (caratterizzazione) del microbiota intestinale del paziente e valutare l'attecchimento del microbiota donato.

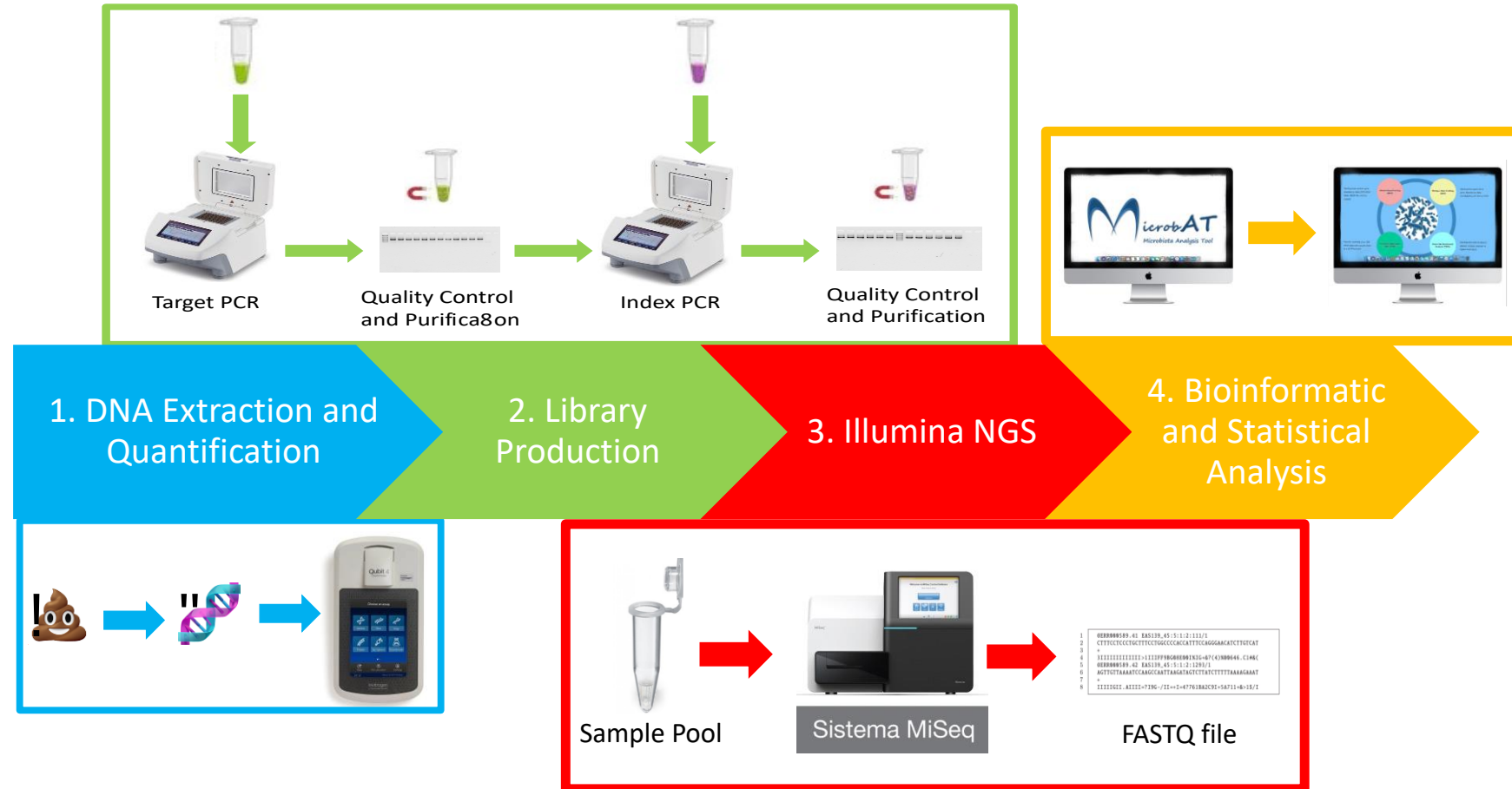
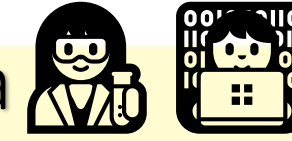
Programma nazionale FMT: emendamento per utilizzo prodotto congelato (14/07/2020)

- **Requisiti del locale per la preparazione di FMT**
- Il Centro di FMT deve disporre di un locale/area dedicato al controllo, alla lavorazione, al congelamento, alla conservazione e distribuzione del MFU nel rispetto dei requisiti di qualità e sicurezza previsti dal d.lgs 191/07 per le suddette fasi.
- Le attività di preparazione del MFU devono essere condotte in conformità con quanto descritto nell'allegato 2 sotto il controllo del laboratorio di microbiologia.
- L'area deve possedere i requisiti previsti per un laboratorio BSL2.
- Il congelamento e lo stoccaggio del MFU deve prevedere l'utilizzo di un congelatore a -80°C i cui parametri vengano adeguatamente monitorati in modo da garantire la sicurezza e la qualità del prodotto conservato.
- I procedimenti connessi con lo stoccaggio di MFU devono essere documentati da procedure operative standard, al fine di prevenire qualunque evento che possa compromettere la funzione o l'integrità del MFU. I campioni di MFU lavorati non sono distribuiti fino a quando i requisiti previsti non sono stati soddisfatti.

LABORATORIO DI SEQUENZIAMENTO



Procedura di analisi del microbiota





SISTEMA PER ELETTROFORESI



SPETTROFOTOMETRO



VERITPRO
TERMOCICLATORE

ASO ALESSANDRIA

STRUMENTAZIONE DEL LABORATORIO INTEGRATO



PIATTAFORMA PER SEQUENZIAMENTO ISEQ 100
UPO-DISIT

STRUMENTAZIONI DISPONIBILI MESSE A DISPOSIZIONE DELLA RICERCA E DELLA DIAGNOSTICA

Piattaforma sequenziamento



Lab integrato di sequenziamento

Miseq



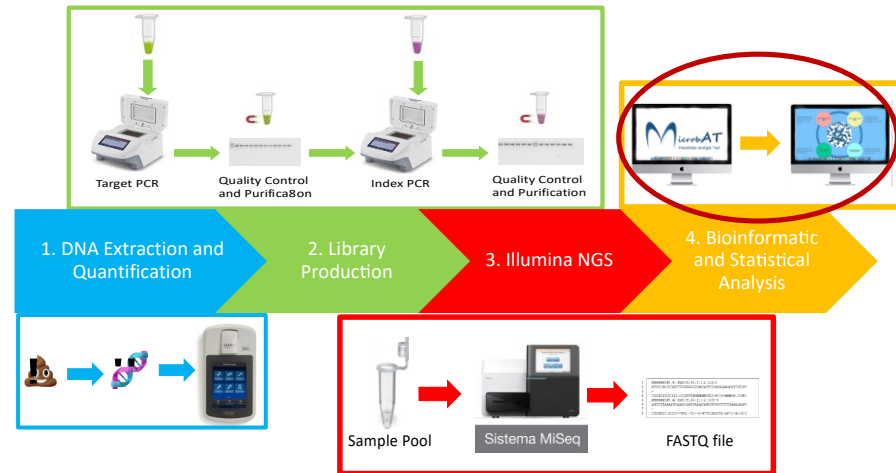
Next Seq 550



Hiseq



Procedura di Analisi del Microbiota 🧑: analisi delle sequenze e reportistica



MicrobAT

software per analisi bioinformatica delle sequenze

Il software è stato sviluppato da SmartSeq srl.
E' fruibile mediante semplici interfacce grafiche e opera in modalità client server.
Le risorse di calcolo sono gestite direttamente da SmartSeq mentre il client non necessita di infrastrutture hardware dedicate.

Il software specifica il Phylum, la Classe, l'Ordine, la Famiglia, il Genere e la Specie dei batteri trovati nei campioni e fornisce rapporti con i risultati dei singoli campioni o dei confronti selezionati dall'utente.

MicrobAT dà inoltre la possibilità di emettere report personalizzabili, facilitando l'utente nella produzione di relazioni, referti, ecc.

Procedura di Analisi del Microbiota 🧑🔬: analisi delle sequenze e reportistica

Esempio di output fornito
da MicrobAT

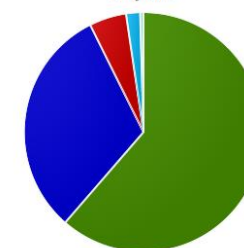
TAXONOMIC CLASSIFICATION AT DIFFERENT LEVEL

Level rank - PHyla:

name	% value
Firmicutes	61.388
Bacteroidetes	31.247
Proteobacteria	5.013
Actinobacteria	1.894
Verrucomicrobia	0.443
Others	0.015

Laboratorio di Metagenomica
Corso Trieste 15/A
Novara

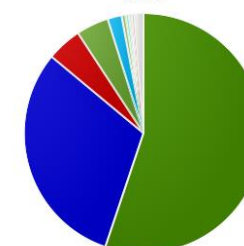
Phylum



Level rank - CLASS:

name	% value
Clostridia	55.181
Bacteroidia	30.838
Gammaproteobacteria	4.726
Erysipelotrichia	4.398
Actinobacteria	1.894
Bacilli	0.538
Verrucomicrobiae	0.443
Negativicutes	0.332
Alphaproteobacteria	0.213
Deltaproteobacteria	0.034
Others	0.026
Unclassified	1.377

Class



TIMELINE DEL PROCESSO DI ACCREDITAMENTO ED ORGANIZZAZIONE DELLE PROCEDURE AZIENDALI

1 caso pilota
Aprile/Maggio 2021

2 caso pilota
Settembre - Ottobre
2021 con follow up a febbraio 2022

3 caso pilota
Ottobre 2021 con follow a
Novembre 2021

ISPEZIONE
Gennaio 2022

A novembre 2023
19 trapianti conclusi
con successo

Settembre 2021
Creazione GdL
Trapianto
coordinamento
della UNIT
MICROBIOTA

Dicembre 2021
RICHIESTA al
CENTRO
NAZIONALE
TRAPIANTI

Giugno 2022
AUTORIZZAZIONE
e adozione del
DVA AZIENDALE

PREPARAZIONE MFU

Analisi
microbiologiche



Donazione
di feci
(almeno 30g)



Diluizione
in fisiologica
(150ml)



Omogenizzazione
Con Stomacher



Filtrazione
con garze sterili



MFU_0123456789
Paziente ricevente
Scade: data e ora
Conservare: 20-30°C

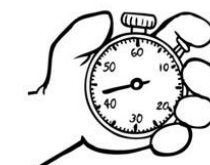
Etichettatura

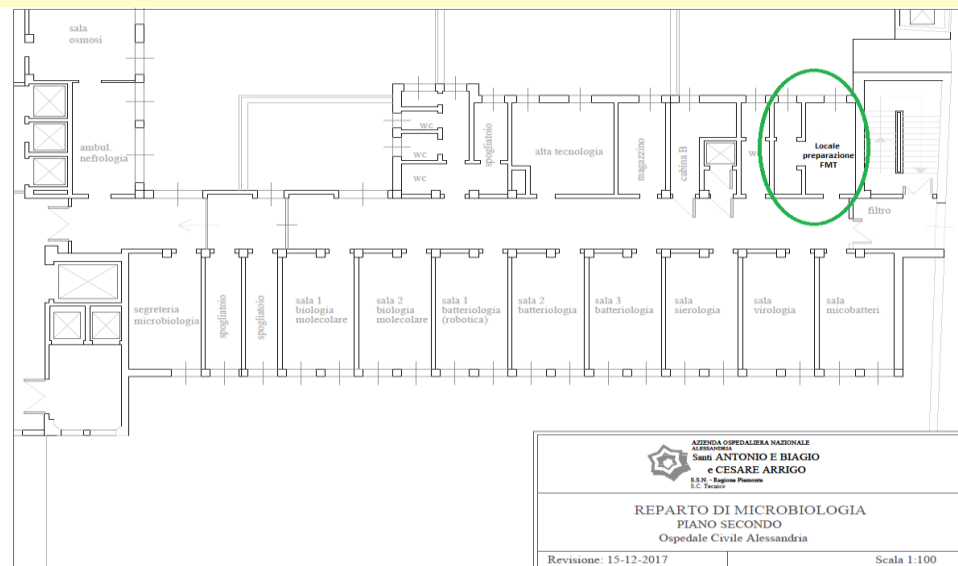


Endoscopia
Infusione

OK!

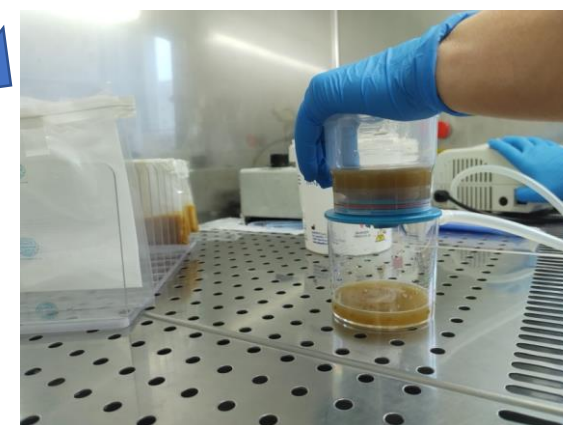
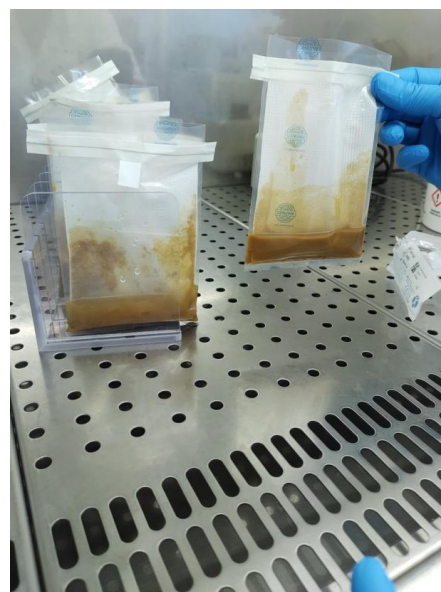
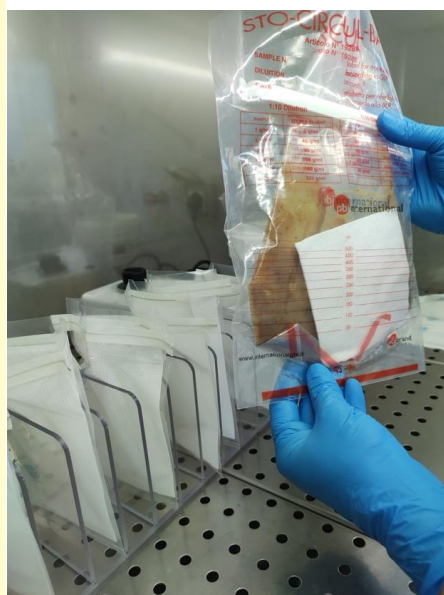
Entro 6 ore!

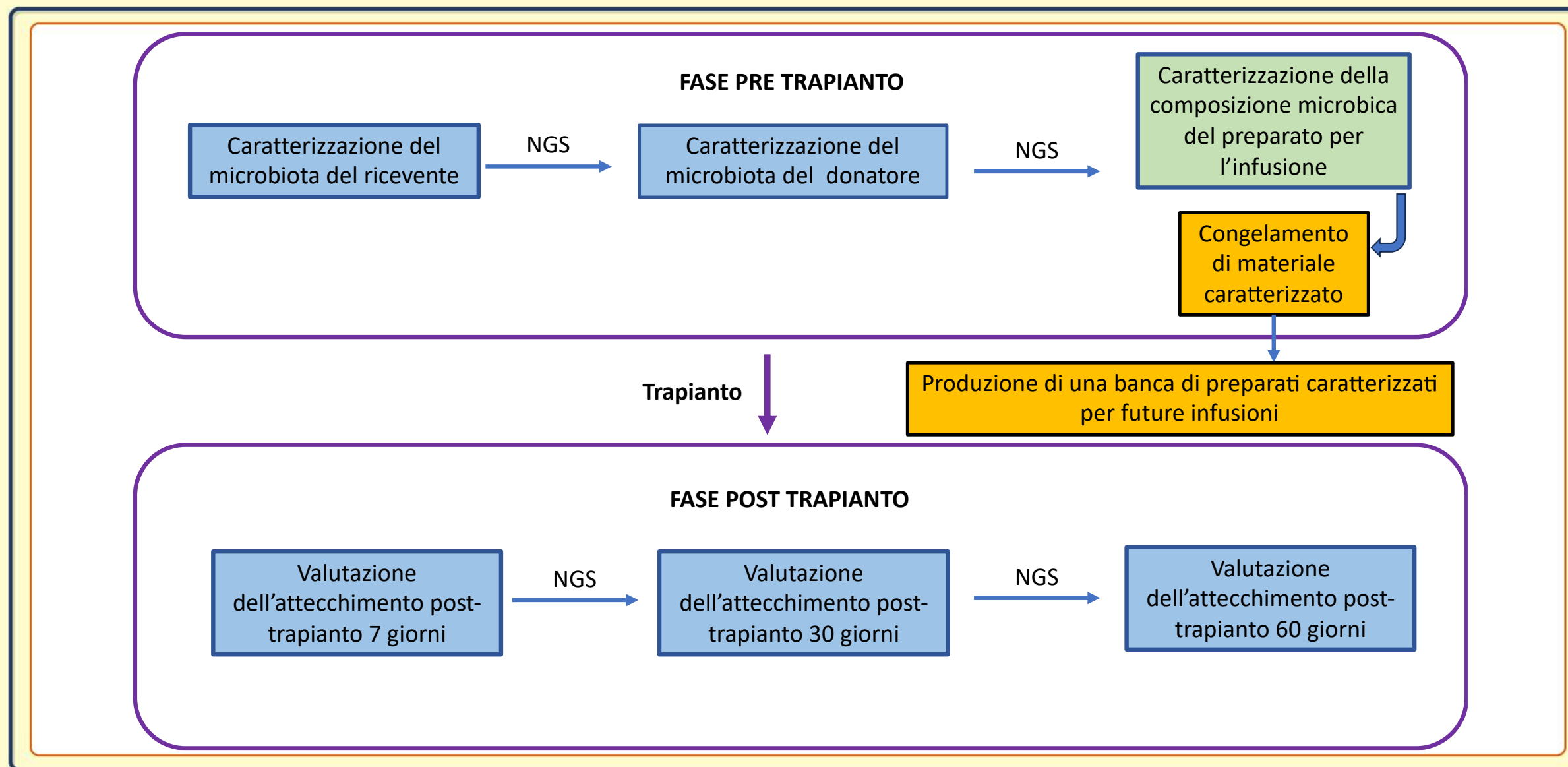


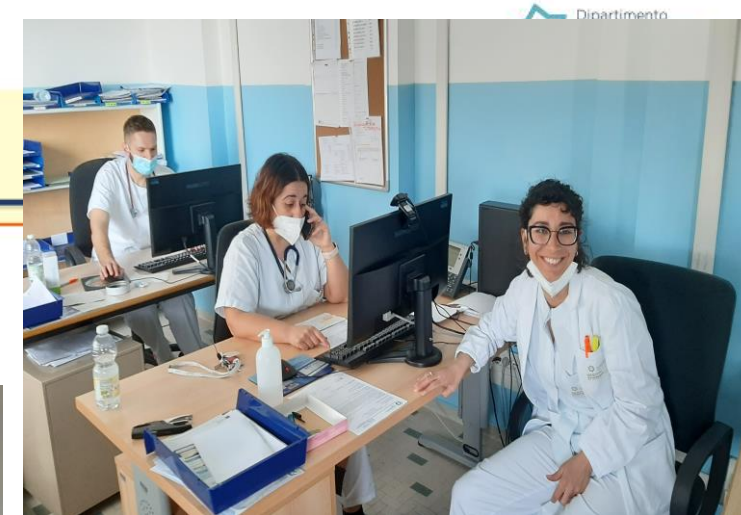


LE PROCEDURE PER LA PREPARAZIONE DEL MFU

- Ambiente dedicato
- BSL2 - Cappa a flusso laminare sterile
- Materiale sterile







UPO

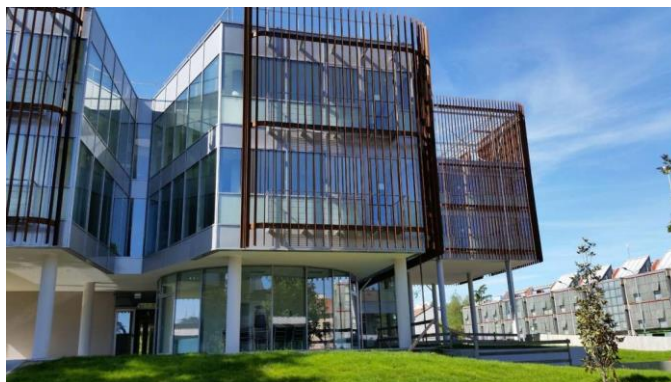
UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

UPO
CAAD

UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE
CENTER FOR TRANSLATIONAL RESEARCH
ON AUTOIMMUNE AND ALLERGIC DISEASE



MicroDiversity
Lab



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!!