

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

11 NOVEMBRE
2023
ore
9.00



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

La rete NGS

Franca Gotta

AON SS Antonio e Biagio e C. Arrigo

Progetto Sequencing

Dipartimento Attività Integrate Ricerca Innovazione

SSD Laboratori di Ricerca

Dipartimento dei Servizi Ospedalieri

SC Microbiologia e Virologia

Azienda Ospedaliera "Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria

2019

Nascita del centro
unificato di
sequenziamento
CUS

2020

Adeguamento locali
e acquisizione
strumentazione

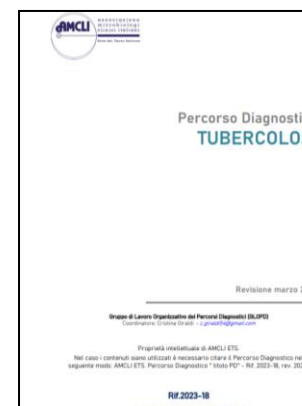
2021

Inizio
attività

2022

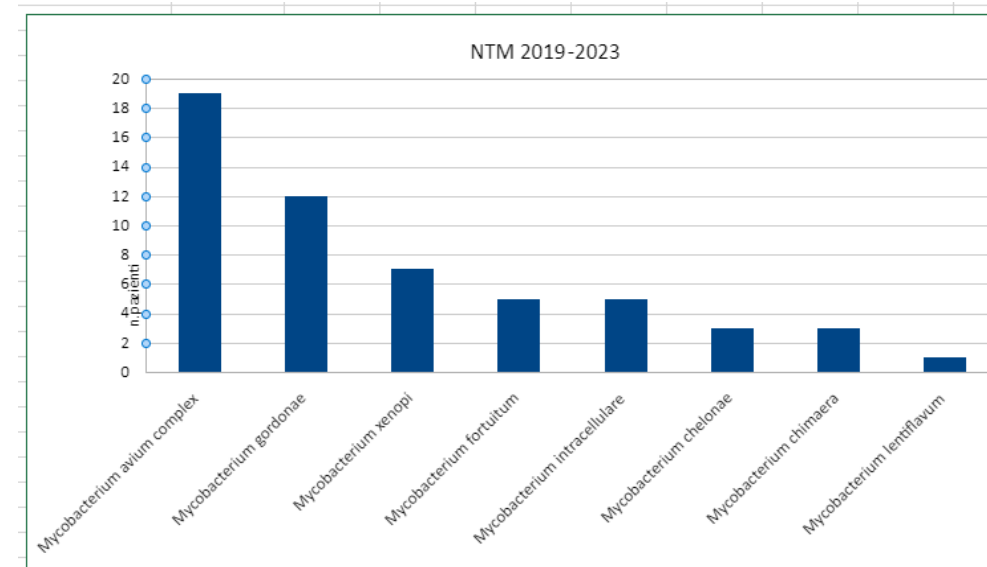
Linee
Guida
AMCLI

2023



Laboratorio di Microbiologia e Virologia

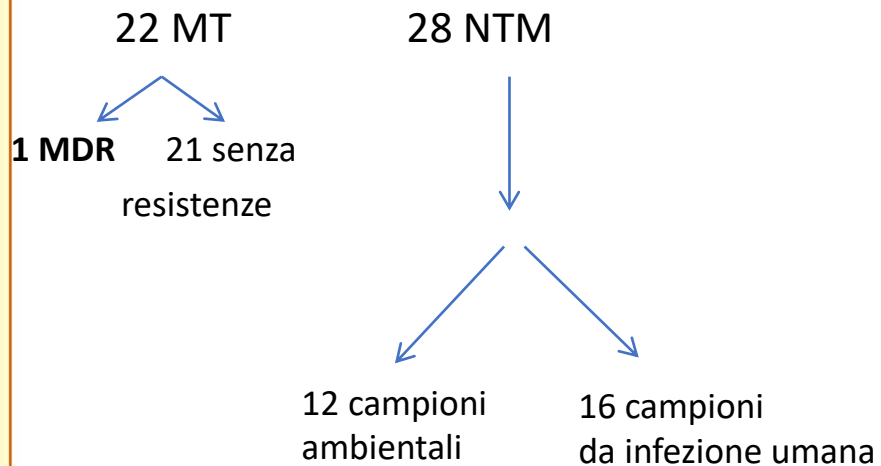
- Numero campioni processati/anno per la ricerca di micobatteri tubercolari : 1000
- Numero di micobatteri tubercolari positivi/anno: 22
- Numero di NTM/anno isolati da pazienti: 16
- Numero di NTM/anno isolati da campionamenti ambientali (HCU): 12 (*M. chimaera* e *M. gordonae*)



Specie NTM isolati da pazienti

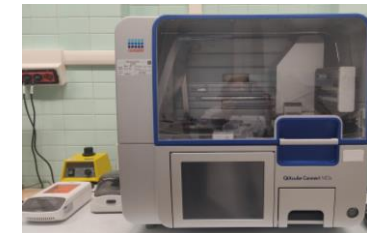
Start: novembre 2022

Micobatteri sequenziati: 50 campioni



- **Metodica utilizzata**
- Targeted NGS a 18 geni associati alla resistenza di 13 farmaci antitubercolari (Deeplex Myc-TB). Analisi basata su short reads (300bp) paired ends permette una buona accuratezza.
- L'analisi specifica della regione HSP65 permette di caratterizzare con un unico saggio sia MTB che NTM

- **Strumentazione**
- QIA cube estrattore



- iSeq 100 Illumina Sequenziatore



Caso di TB MDR

Ricerca micobatteri

Lavaggio Broncoalveolare
Esame microscopico Positivo ++

Ricerca micobatteri

Ric. molecolare Mycobacterium tuberculosis complex POSITIVA. Rilevati geni di resistenza alla Rifampicina

Ricerca micobatteri

Isolato: - 1 - Mycobacterium tuberculosis complex

	RSI	MIC
Etambutolo 5.0	S	
Etambutolo 7.5	S	
Isoniazide 0.1	R	
Isoniazide 0.4	R	
Pirazinamide	R	
Rifampicina 1.0	R	
Streptomicina 1.0	R	
Streptomicina 4.0	S	

tutti i valori espressi in mg/l

Antibiogramma di II livello: rilevata resistenza ai fluorichinoloni

- Nazionalità: italiana
- Sesso: maschio
- Età: 35 anni

Perché abbiamo scelto il tNGS

- Strumentazione a disposizione
- Marcatura CE-IVD
- Partenza da campione
- Interpretazione facilitata dal software

t NGS: la metodica

1. **L'inattivazione dei micobatteri** viene eseguito nella stanza BSL 3. **L'estrazione** del genoma su strumentazione QIA-cube.
2. Prima PCR : **Amplificazione** e successiva purificazione con biglie di silice e lavaggi in etanolo in tre passaggi e risospensione in acqua (manuale).
3. **Quantificazione** dell'amplificato con fluorimetro. (ng/ μ l)
4. Tutti i campioni devono essere normalizzati affinché la quantità di DNA abbia la stessa concentrazione (0,2 ng/ μ l)
5. Seconda PCR : **Tagmentazione (TAG e FRAGMENT)** frammentazione e l'etichettatura. Frammentazione casuale con trasposasi ma lunghezza dei frammenti uniforme. La TAG è la etichettatura dei frammenti (oligonucleotidi per una estremità e per l'altra).
6. Purificazione con biglie magnetiche
7. Terza amplificazione: **Indicizzazione** (ogni campione avrà un indice univoco per poter essere riconosciuto). Attaccato all'indice ci sono 2 adattatori P5 e P7 che servono per far attaccare i frammenti alla flow cell
8. Purificazione con biglie magnetiche
9. **Preparazione della library** : Quantificazione dell'amplificato con normalizzazione dei campioni attraverso diluizioni seriali (diluizione dei campioni in funzione del campione più povero di DNA. Tutti devono essere portati alla concentrazione di 1 nanomoli. Successivamente altra diluizione per portare i campioni a concentrazione di 60 picomoli.

- Tempo operatore tecnico: 8-10 h
- Tempo analisi del software: circa 3 h
- Tempo di interpretazione e refertazione: 3 h circa (1 seduta)

L'interpretazione

Data Analysis

```
STAAGGCTAGGTTTCATGCTA  
STAAGGCTAGGTTTCATGCTA  
STAAGGCTAGGTTTCATGCTA  
STAAGGCTAGGTTTCATGCTA  
TAAGGCTAGGTTTCATGCTA  
AAGGCTAGGTTTCATGCTA  
STAGGCTAGGTTTCATGCTA  
STA GCTAGGTTTCATGCTA  
STAA CTAGGTTTCATGCTA
```

Le sequenze ottenute vengono confrontate dal software con le sequenze di riferimento contenute nel catalogo WHO 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION

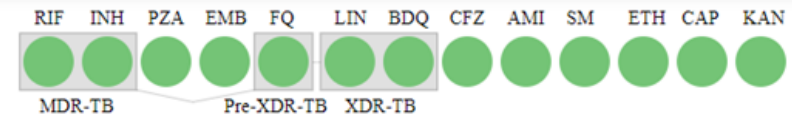
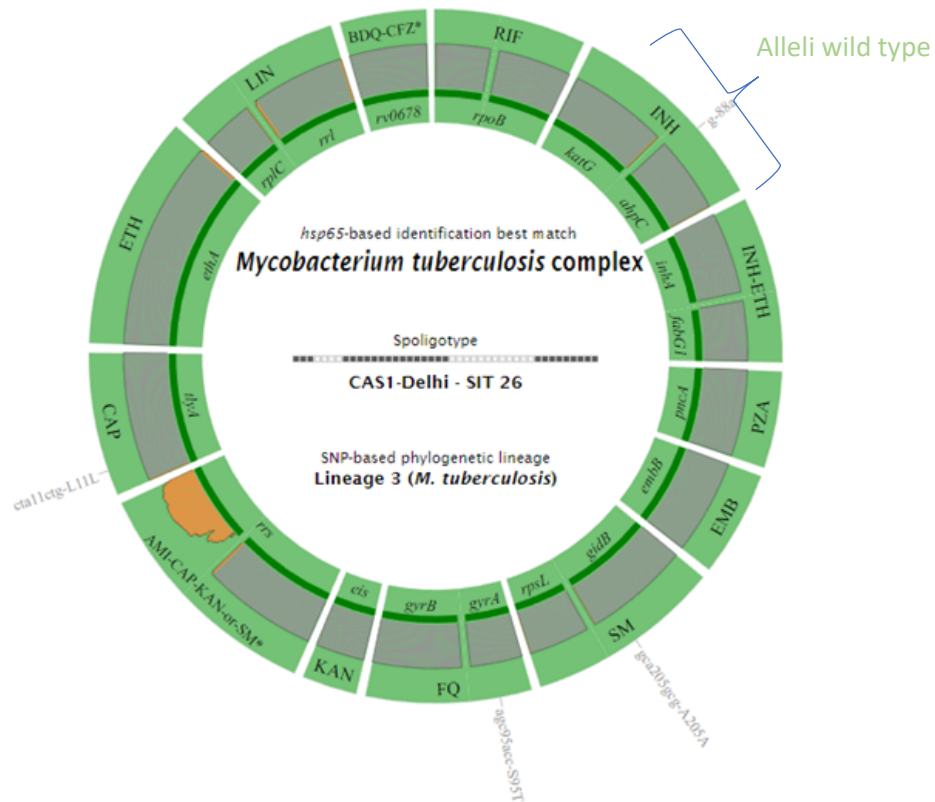
Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance
25 June 2021 | Publication



Le Informazioni che ricaviamo dall'analisi

- Identificazione sia di micobatteri tubercolari che non tubercolari (HSP65)
- Lignaggio: ci dà solo una idea del tipo di ceppo, rileva i polimorfismi a singolo nucleotide
- Spoligotipo: ci dà una idea un po' più approfondita del ceppo ma non consente di stabilire né clonalità né correlazioni epidemiologiche :non è possibile utilizzare il risultato per fare vigilanza di trasmissione (solo se lo spoligotipo è diverso si può escludere la trasmissione, ma non il contrario)
- Antibiotogramma: rileva solo le mutazioni presenti sui geni target (alcuni geni sono coperti completamente altri solo per alcune regioni del gene) associate ad eventuali resistenze in riferimento al catalogo WHO (2021) o al catalogo esteso . Le mutazioni off target sono escluse (come refertare la bedaquilina?)
- Le doppie mutazioni sono rilevate con la doppia percentuale in base alla loro espressione.
Variant calling 3-5% se i campioni sono coperti con +++ , in presenza una copertura inferiore le mutazioni a bassa frequenza possono essere perse).
- Deeplex è in grado di discriminare potenziali infezioni miste (due lineage diversi dell'MTBcomplex ad esempio) o co-infezioni (MTB ed NTM) , in questi casi di doppia chiamata la frequenza allelica deve essere compresa tra il 3 ed il 97%

Buono strumento per l'utilizzo clinico , non per indagini epidemiologiche né per identificazione di cluster



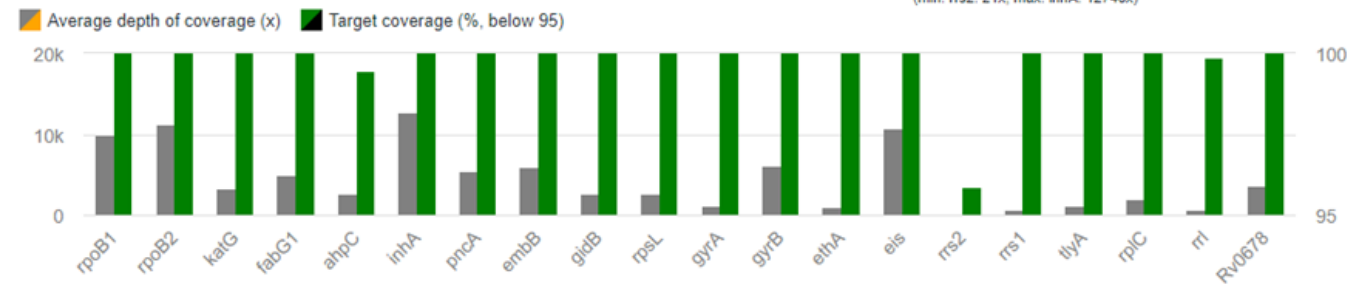
Sample controls and metrics

Sequencing Run:

Positive control* VALID
Negative control* VALID

Sample:

Internal control* NOT VALID
Composite reference coverage 99.970%
Median depth of coverage* 4320x
(min. rrs2: 21x; max. inhA: 12746x)



hsp65-based species identification

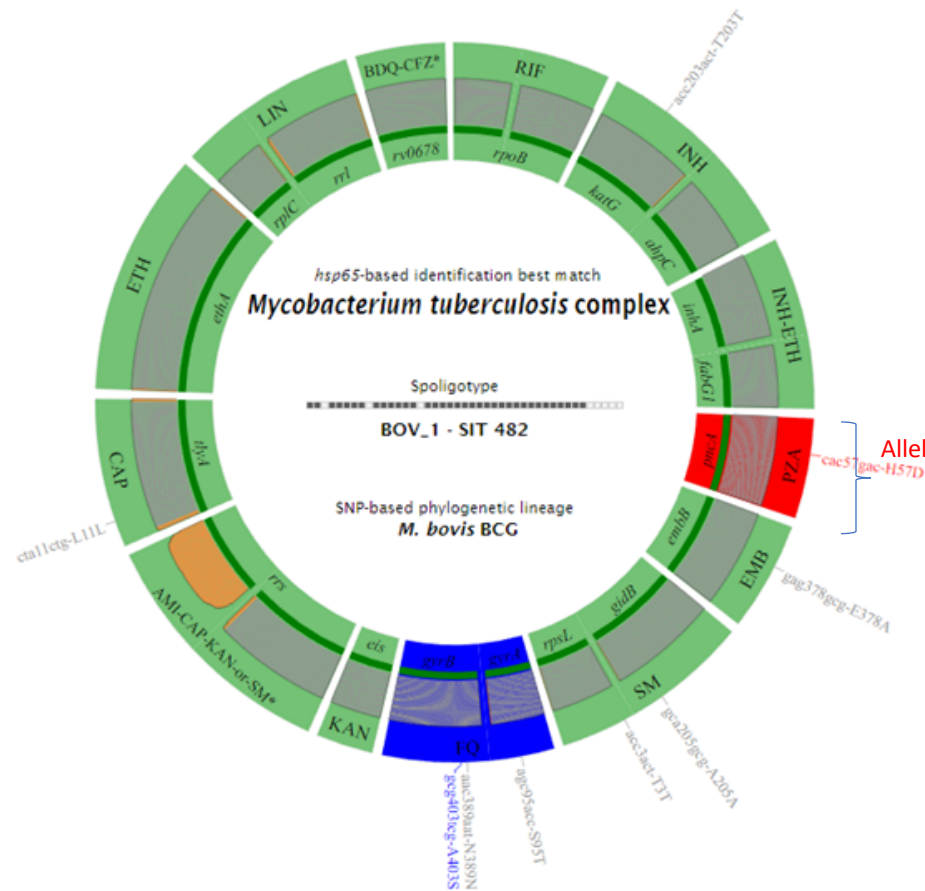
Av coverage depth (x)	Consensus length	% Identity	E-value	Best match
1314.7	400.0	100.000	0.0	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex

Drug resistance associated variants

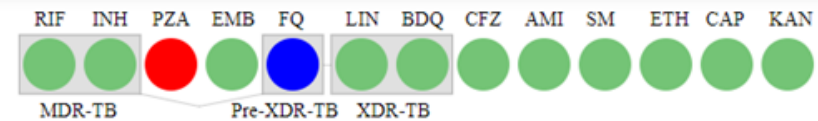
No drug resistance associated variants detected in any gene target.

Uncharacterized and uncertain significance variants

Uncharacterized variants designate sequence variants of as yet unknown association with drug resistance or drug susceptibility. Uncertain significance variants designate variants that could not be characterized yet as either drug resistant or drug susceptible according to the current WHO confidence grading classification.



Analysis mode: Deeplex Myc-TB V3.0.1 - WHO Catalogue-based
Quality: ● ●



Sample controls and metrics

Sequencing Run:

Positive control* VALID

Negative control* VALID

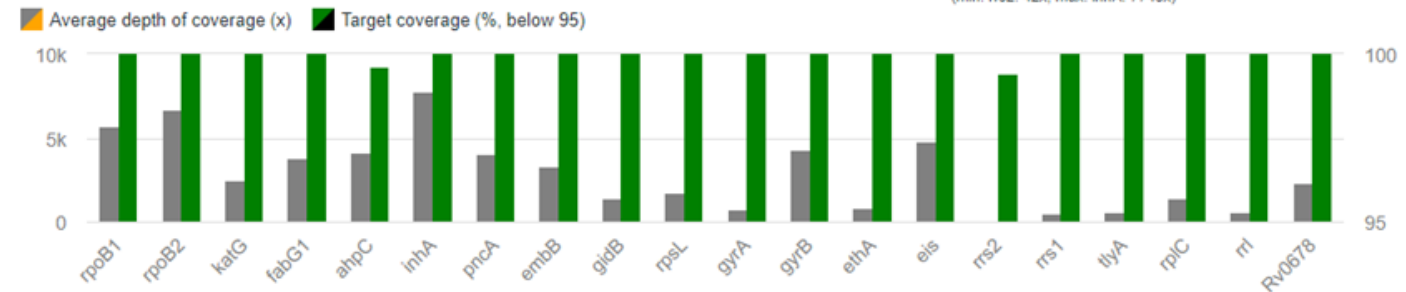
Sample:

Internal control*

Composite reference coverage 99.985%

Median depth of coverage* 3102x

(min. rrs2: 42x; max. inhA: 7745x)



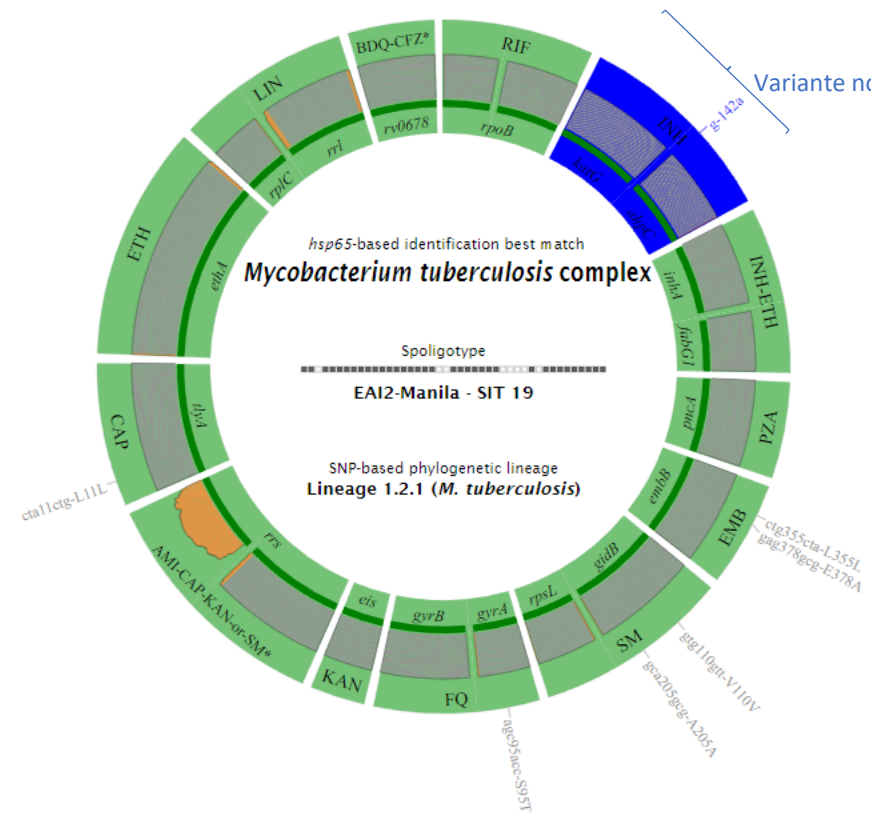
hsp65-based species identification

Av coverage depth (x)	Consensus length	% Identity	E-value	Best match
773.0	400.0	100.000	0.0	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>

Drug resistance associated variants

Gene	Genomic position	Codon change	% Variant	Dx-score	AA change	Drug*	Confidence	Resistance level	Reference
pncA	2289073	cac57gac	99.780	1374.75	H57D	PZA	Associated with resistance	Resistant	WHO 2021

Ogni variante è indicata con il codone di riferimento e il codone alternativo, l'amminoacido di riferimento e l'amminoacido mutato



Variante non caratterizzata

Sample 1

Date of submission

Dec, 2 2022 10:21:51

Experiment set

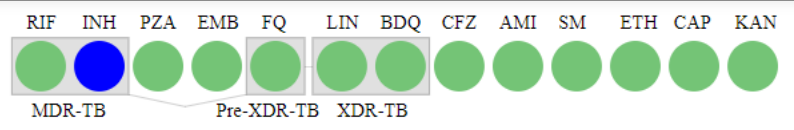
Mycobacterium Novembre2022

Analysis mode

Deeplex Myc-TB V3.0.1 - WHO Catalogue-based

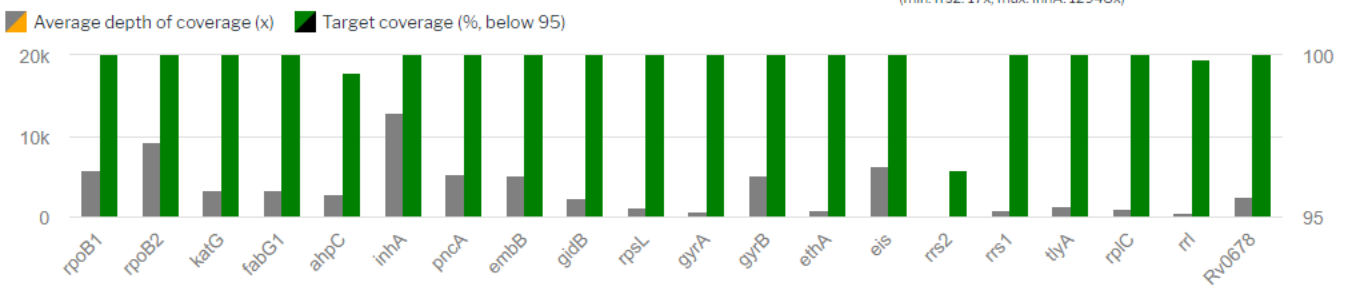
Quality

+



Sample controls and metrics

Sequencing Run:		Sample:	
Positive control*	VALID	Internal control*	NOT VALID
Negative control*	VALID	Composite reference coverage	99.917%
		Median depth of coverage*	4277x
		(min. rrs2: 17x; max. inhA: 12948x)	



hsp65-based species identification

Av coverage depth (x)	Consensus length	% Identity	E-value	Best match
372.3	400.0	99.748	0.0	Mycobacterium tuberculosis complex

Drug resistance associated variants

No drug resistance associated variants detected in any gene target.

Le informazioni del referto

 Azienda Ospedaliera di ALESSANDRIA Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo		Regione Piemonte S.C. MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA Direttore: Dr. Andrea Rocchetti Certificato UNI EN ISO 9001:2015	
Provenienza, Reparto di Prova		PAPERINO UNO	
Nr. Richiesta	1600684816	02-02-1999	M
Id Inviante			
del	31-10-2023 17:25		
C. FIS.	PPRNUO998022999Y	APOLIDE	
Esame Richiesto	Risultato	U.M.	Valori di Riferimento
Identificazione Micobatteri - Test di Sequenziamento			
Ceppo da coltura			
Esito ricerca	POSITIVO		
Microrganismo isolato:	Mycobacterium tuberculosis complex		
Lineaggio	4.3		
Spoligotipo	LAM3 - SIT 33		
Profondità mediana di Coverage	9132x		
Commento	Ceppo Pirazinamide-resistente.		
Ulteriore commento disponibile.			

Descrizione ceppo identificato

Qualità del sequenziamento

Commento
riassuntivo
breve

 Regione Piemonte S.C. MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA Direttore: Dr. Andrea Rocchetti Certificato UNI EN ISO 9001:2015			
Provenienza: Reparto di Prova		PAPERINO UNO	
Nr. Richiesta 1600684816		02-02-1999	
Id Inviante		M	
del 31-10-2023 17:25		APOLIDE	
PPRNUO99B02Z999Y			
Esame Richiesto		Risultato	U.M. Valori di Riferimento
Antibiogramma genotipico MTB Complex			
Identificazione specie		Mycobacterium tuberculosis	
Farmaco	Gene (posizioni)	Risultato	
Streptomicina	rrsB (18:1174)	Sensibile	Nessuna mutazione.
	rpsL (-24:+45)*		
	rrs1 (716:1572)		
	rrs2 (3:679)		
Isoniazide	inhA (86:679)	Sensibile	Nessuna mutazione.
	fabG1 (-119:316)		
	katG (254:972)		
	ahpC (-163:393)		
Rifampicina	rpoB1 (1151:1549)	Sensibile	Nessuna mutazione.
	rpoB2 (147:1006)		
Etambutolo	embB (863:1552)	Sensibile	Nessuna mutazione.
Pirazinamide	pncA (-60:+9)*	Resistente	Mutazione associata a farmacoresistenza. cac57gac (H57D) gene pncA.
Ofloxacina/Levofloxacina/ moxifloxacina	gyrA (76:453)	Evidenze insufficienti	Mutazione dal significato non ancora definito gcg403tcg (A403S) gene gyrB (Moxifloxacina)
	gyrB (1059:1704)		
Amikacina	rrs1 (716:1572)	Sensibile	Nessuna mutazione.
	rrs2 (3:679)		
Capreomicina	rrs1 (716:1572)	Sensibile	Nessuna mutazione.
	tya (-129:+4)*		

Gene/regioni
geniche coperte

farmaco

dettaglio mutazioni

interpretazione

 Regione Piemonte S.C. MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA Direttore: Dr. Andrea Rocchetti Certificato UNI EN ISO 9001:2015			
Provenienza: Reparto di Prova		PAPERINO UNO	
Nr. Richiesta 1600684816		02-02-1999	
Id Inviante		M	
del 31-10-2023 17:25		APOLIDE	
PPRNUO99B02Z999Y			
Esame Richiesto		Risultato	U.M. Valori di Riferimento
Kanamicina	rrs1 (716:1572)	Sensibile	Nessuna mutazione.
	rrs2 (3:679)		
	eis (-196:162)		
Etionamide	inhA (86:679)	Sensibile	Nessuna mutazione.
	fabG1 (-119:316)		
	ethA (-9:+53)*		
Bedaquilina	rv0678 (-14:+52)*	Sensibile	Nessuna mutazione.
Clofazimina	rv0678 (-14:+52)*	Sensibile	Nessuna mutazione.
Linezolid	rrl (2266:2968)	Sensibile	Nessuna mutazione.
	rplC (300:21)		

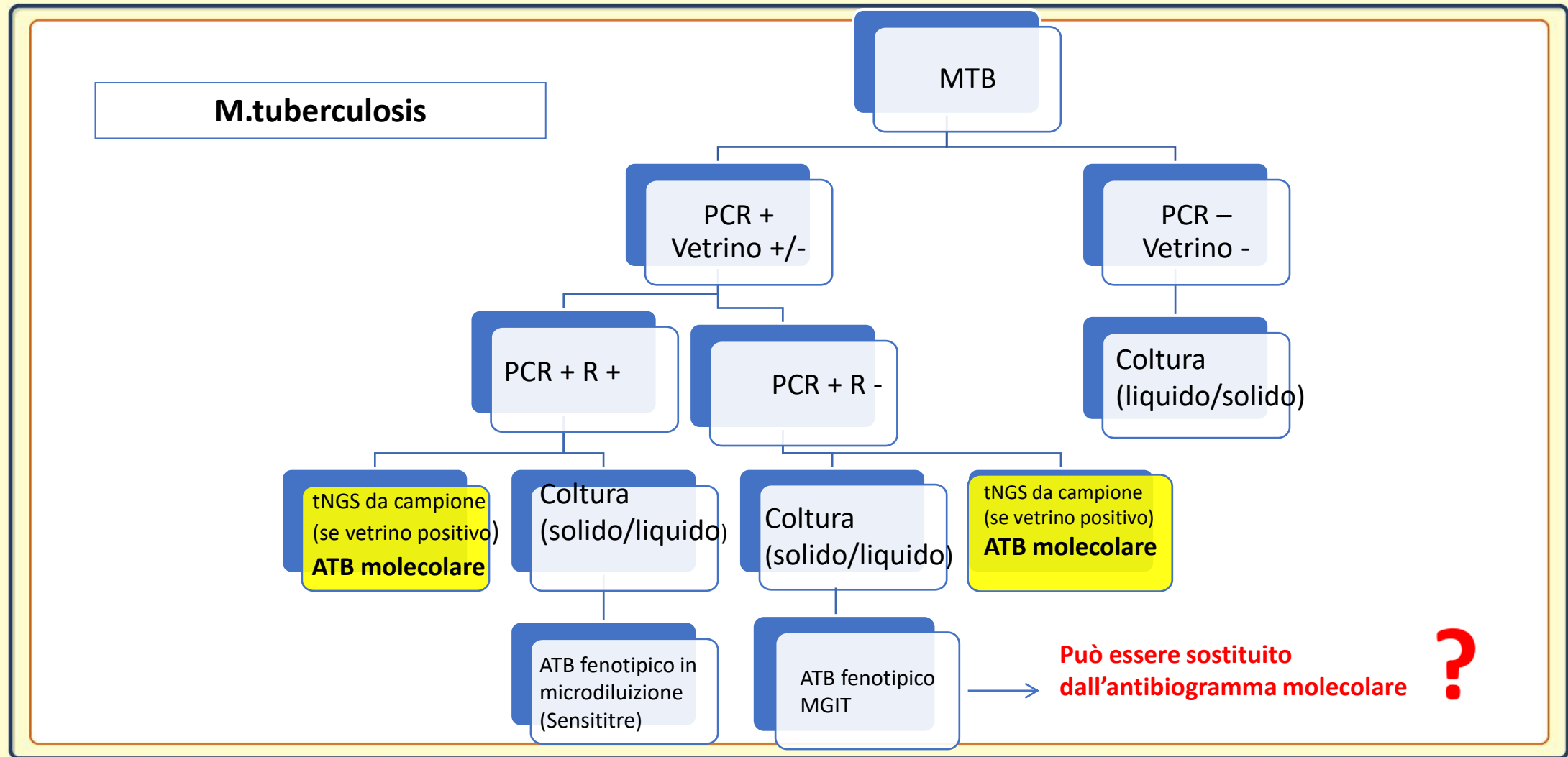
* copertura dell'intero gene

Le opportunità

- Tra i diversi tipi di sequenziamento è l'opzione più rapida in ambito diagnostico (2-3 gg) per i casi in cui si sospetta una TB MDR partendo da campione vetrino positivo.
- Permette di identificare l'etero-resistenza
- CE-IVD

Le criticità

- Il targeted NGS però fornisce informazioni solo su una parte limitata di genoma (Deeplex Genoscreen 18 geni con mutazioni associate a 13 farmaci antitubercolari)
- Le mutazioni a bassa frequenza e le mutazioni off target: quale rischio di perderle?
- Catalogo WHO (anche se è il più completo non include le mutazioni scoperte negli ultimi anni, attesa per il l'aggiornamento del nuovo catalogo)
- Costi (dipendono dall'ottimizzazione della cartuccia)
- Tempo/Uomo



tNGS e micobatteri non tubercolari: utile?

- bassa coverage (15%)
- mancanza di database per mutazioni di resistenza
- buona identificazione , nessuna informazione per clusters (utilizzarlo per pazienti e/o controlli ambientali) ?

Possibilità di identificazione NTM

Dashboard								
Analyze Delete Experiment set Edit Export Map Share Legend								
☐	Status	Shared	Quality	Sample	Experiment set	Date of submission	Analysis mode	Species identification
☐								
☐			NTM	7900002951		Aug, 10 2023 15:4...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium chimaera</i> : 92.8 / <i>Mycobacterium chimaera</i> : 7.0
☐			NTM	7900003561		Aug, 10 2023 15:4...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium avium</i> complex (subsp avium, paratuberculosis, silvaticum) : 92.2 / <i>Myco</i>
☐			NTM	7900003525		Aug, 10 2023 15:4...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium timonense</i> : 92.4 / <i>Mycobacterium timonense</i> : 7.4
☐			NTM	7900003475		Aug, 10 2023 15:4...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium xenopi</i> : 92.7 / <i>Mycobacterium xenopi</i> : 7.1
☐			+	0270000354A		Aug, 10 2023 15:4...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex : 92.6 / <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex : 7.2
☐			NTM	7415000042		Aug, 10 2023 15:4...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium avium</i> complex (subsp avium, paratuberculosis, silvaticum) : 91.8 / <i>Myco</i>
☐			ND	9020000019		Mar, 7 2023 14:15...	Deeplex Myc-TB V3.0...	
☐			NTM	9020000024		Mar, 7 2023 13:02...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium chimaera</i>
☐			NTM	9020000021		Mar, 7 2023 13:02...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium avium</i> complex (subsp avium, paratuberculosis, silvaticum)
☐			NTM	9020000025		Mar, 7 2023 13:02...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium chimaera</i>
☐			NTM	9020000022		Mar, 7 2023 13:02...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium avium</i> complex (subsp avium, paratuberculosis, silvaticum)
☐			++	CP		Mar, 7 2023 13:02...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
☐			NTM	CN		Mar, 7 2023 13:02...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium chimaera</i>
☐				9020000024		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	
☐			NTM	9020000023		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium chimaera</i>
☐			++	9020000017		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
☐			++	9020000020		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
☐			ND	9020000019		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	
☐			+	9020000018		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
☐			++	9020000016		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
☐			NTM	7900002437		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	<i>Mycobacterium gordonae</i>
☐				CN		Mar, 3 2023 09:5...	Deeplex Myc-TB V3.0...	

tNGS applicato ai micobatteri non tubercolari

- Buona capacità di identificazione appoggiandosi al catalogo WHO
- Non in grado di rilevare farmaco resistenze in quanto ad oggi non ci sono database dettagliati in grado di rilevare i geni associati a resistenza
- Con il WGS studi epidemiologici per tracciare i percorsi di trasmissione. Caratterizzazione di nuove specie di micobatteri e identificazione di mutazioni che codificano per fattori di virulenza e resistenza. Il tNGS non permette studi epidemiologici , nè identificazione di cluster
- Confrontato con il Lipa più alto potere discriminatorio all'interno dei complessi e identificazione specie rare
- Elevata concordanza dei metodi

Caratteristiche dei test

Metodica	Validazione	Tempi	Costi	Pro/contro
InnoLipa	si	8 h	\$\$ 60 euro circa	Buon potere discriminatorio, time consuming
MaldiToff	si	1 h circa	\$ pochi centesimi	potere discriminatorio non ottimale (soprattutto da terreno liquido, non distingue tra <i>M.chimaera</i> ed <i>M.intracellulare</i>), economico e rapido
tNGS	no	2/3 g	\$\$\$ 300 euro circa	Ottimo potere discriminatorio, time consuming costi elevati

Difficoltà incontrate

- Mancanza di standardizzazione
- Mancanza di controlli di qualità
- Necessità di formazione
- Necessità di confronto con altri centri

RETE: Standardizzazione dei processi e qualità



MINIREVIEW



Practical Guidance to Implementing Quality Management Systems in Public Health Laboratories Performing Next-Generation Sequencing: Personnel, Equipment, and Process Management (Phase 1)

Rebecca J. Hutchins,^a Kristy L. Phan,^{a*} Adeeba Saboor,^b Joseph D. Miller,^c Atis Muehlenbachs,^a on behalf of the CDC NGS Quality Workgroup

^aOffice of the Deputy Director of Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

^bDivision of Laboratory Systems, Center for Surveillance, Epidemiology and Laboratory Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

^cDivision of Scientific Resources, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

ABSTRACT Quality standards as part of an effective quality management system (QMS) are the cornerstone for generating high-quality test results. Next-generation sequencing (NGS) has the potential to improve both clinical diagnostics and public health surveillance efforts in multiple areas, including infectious diseases. However, the laboratories adopting NGS methods face significant challenges due to the complex and modular process design. This document summarizes the first phase of quality system guidance developed by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) NGS Quality Workgroup. The quality system essentials of personnel, equipment, and process management (quality control and validation) were prioritized based on a risk assessment using information gathered from participating CDC laboratories. Here, we present a prioritized QMS framework, including procedures and documentation tools, to assist laboratory implementation and maintenance of quality practices for NGS workflows.

KEYWORDS next-generation sequencing, quality management systems, quality system essentials, public health

BACKGROUND AND METHODS

RETE

- Formazione
- Struttura
- Organizzazione
- Standardizzazione
- Controlli di qualità
- Certificazione ISO 15189