



**CREAZIONE DI UNA BANCA DATI REGIONALE DELLE SEQUENZE DI SARS-CoV-2
ISOLATI IN VENETO**

1. Premessa

Il sequenziamento del genoma del *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2* (SARS-CoV-2) svolge un ruolo cruciale nel definire le dinamiche di evoluzione, trasmissione e diffusione del virus.

Attraverso la caratterizzazione del patrimonio genetico virale è possibile identificare mutazioni potenzialmente implicate nella virulenza e trasmissibilità del patogeno, nella sensibilità delle metodiche diagnostiche in uso e nell'efficacia dei protocolli terapeutici applicati. Inoltre, attraverso l'integrazione dei dati genetici ed epidemiologici, è possibile ricostruire il network del "chi ha infettato chi" nell'*outbreak investigation*, monitorare l'evoluzione virale nel tempo in risposta a specifiche misure di controllo (terapie, *lockdown*), seguire la diffusione del virus nel territorio ed esplorare l'intricata interazione tra paziente e patogeno.

Al fine di massimizzare l'efficacia del sequenziamento come strumento diagnostico ed epidemiologico, è fondamentale poter disporre non solo di dati epidemiologici, ma anche di un archivio di dati genetici storici e costantemente aggiornato.

2. Obiettivo

Il presente progetto mira alla creazione di una banca dati regionale, in cui verranno raccolte ed analizzate le sequenze di un campione rappresentativo di SARS-Cov-2 isolati dalle Aziende ULSS del Veneto. Tale banca dati sarà allestita presso l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVE), che si occuperà della raccolta dei campioni, del sequenziamento del virus, dell'analisi bioinformatica dei risultati e delle analisi di epidemiologia molecolare per lo studio dei focolai epidemici.

3. Scelta del campione

Al fine di garantire la generazione del dato genetico e razionalizzare i tempi ed i costi di analisi, verranno sequenziati campioni selezionati secondo criteri quantitativi, qualitativi, epidemiologici e clinici.

Criteri quantitativi e qualitativi

L'IZSVE fornirà ai laboratori che invieranno i campioni per il sequenziamento, le caratteristiche qualitative e quantitative minime che garantiscano l'integrità dell'RNA e la possibilità di procedere con il sequenziamento, secondo il diagramma di flusso riportato nella Figura 1.

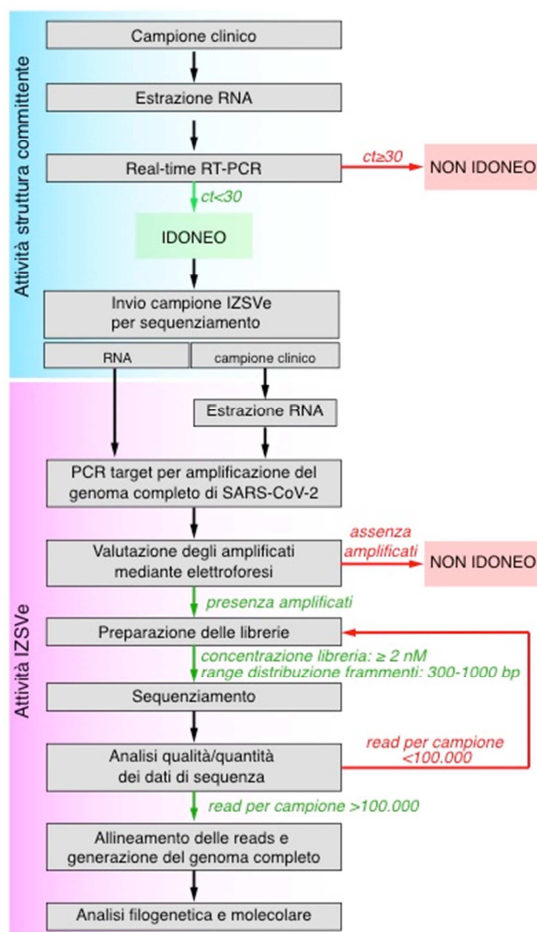


Figura 1. Diagramma di flusso per la scelta dei campioni da sottoporre a sequenziamento sulla base di criteri qualitativi

Criteri epidemiologici e clinici

Al fine di razionalizzare i costi e i tempi di analisi, sarà sottoposta a sequenziamento una selezione di campioni effettuata sulla base dei dati epidemiologici e clinici disponibili.

Per i **campioni derivanti dalla clinica o ottenuti attraverso la sorveglianza in corso** la selezione verrà operata seguendo il diagramma di flusso decisionale riportato in Figura 2. Si stima di sottoporre a sequenziamento una media di circa 15 campioni al mese.

Per i **campioni di archivio** sarà chiesto a ciascuna AUSLL di inviare inizialmente 20 campioni selezionati per data di raccolta, ossia campioni collezionati durante tutto il periodo di circolazione del virus, prima durante e dopo il *lockdown*, al fine di creare una base storica per SARS-CoV-2. Sarà altresì chiesto ai laboratori che hanno sequenziato il virus di inviare all'IZSve tutte le sequenze non ancora depositate in banche dati pubbliche.

Al fine di mantenere aggiornata la banca dati genetica regionale ogni mese ogni AUSLL invierà all'IZSve 5 campioni selezionati sulla base di dati epidemiologici (data di raccolta, comune di provenienza).

Ulteriori campioni (fino ad un massimo di 10 per ogni categoria di seguito riportata a titolo esemplificativo) potranno essere richiesti a ciascuna AUSLL secondo specifici criteri clinici al fine di identificare l'emergenza di varianti del virus che si sono selezionate in risposta a determinati *driver* evolutivi:

- Forma clinica dell'infezione: grave, lieve, asintomatica;
- Segni clinici: forme respiratorie, forme "atipiche" (gastro-intestinali, nervose, cutanee)
- Specifici trattamenti farmacologici (es.: plasma iperimmune, cloroquina, ecc.).

Saranno sottoposti a sequenziamento un numero omogeneo di campioni del periodo 2020/2021 per ciascuna classe (forma clinica, segni clinici, trattamenti farmacologici) e categoria all'interno della classe, fino ad un massimo di circa 30 campioni per AUSLL. La necessità di avere numeri maggiori sarà valutata caso per caso.

Altri criteri di selezione per ulteriori studi *ad-hoc* potranno essere discussi e concordati con il laboratorio. **In totale, si stima di sequenziare fino ad un massimo di circa 1000/campioni/anno**

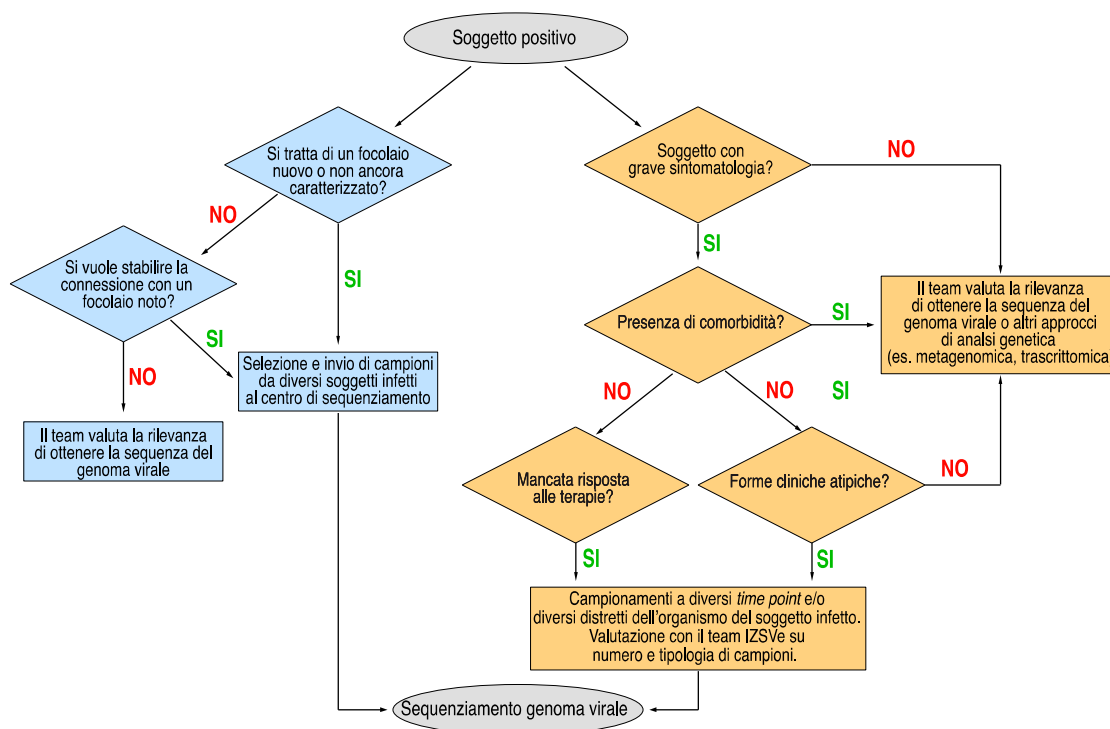


Figura 2. Diagramma di flusso per la scelta dei campioni derivanti dalla sorveglianza in corso da sottoporre a sequenziamento sulla base di criteri epidemiologici (azzurro) e clinici (arancione).

4. Creazione di una banca dati genetica regionale

Tutte le sequenze generate dall'IZSVe o da altri laboratori qualificati, ottenute sia da campioni di archivio che da campioni di sorveglianza, saranno raccolte in una banca dati genetica regionale per SARS-CoV-2, gestita dall'IZSVe. Tale banca dati sarà costantemente aggiornata col prosieguo dell'attività di sequenziamento, al fine di monitorare in modo costante la variabilità e l'evoluzione del virus circolante nel territorio e identificare l'introduzione o l'emergere di nuove varianti. Tali dati saranno di supporto per le indagini epidemiologiche richieste, e per una migliore comprensione dell'origine del virus responsabile di nuovi focolai.

5. Tipologia campione

Possono essere inviati al centro di sequenziamento dell'IZSVe:

- Campioni clinici ovvero tampone naso-faringeo, oro-faringeo o rettale in terreno di trasporto (es. VTM, UTM o Amies), saliva, lavaggio nasale, espettorato, lavaggio bronco-alveolare o biopsie del tratto respiratorio;
- Isolati virali in cellule;
- RNA;

Oltre alle tipologie di campione sopra citate, possono essere inviate al centro di sequenziamento dell'IZSVe anche sequenze di genoma completo di SARS-CoV-2, per la sola analisi molecolare.

6. Analisi bioinformatiche

I dati generati (*reads* grezze) saranno processati al fine di ottenere la sequenza consenso del genoma completo di SARS-CoV-2. Le sequenze consenso saranno sottoposte ad analisi filogenetica e molecolare. Al committente verranno forniti i seguenti dati mediante comunicazione via email all'indirizzo fornito nell'apposita scheda di accompagnamento campione:

- Sequenza consenso del genoma completo di SARS-CoV-2 di ciascun campione;
- Albero filogenetico;
- Report contenente le informazioni relative al *lineage* di appartenenza del virus, all'analisi filogenetica, all'identificazione di mutazioni di interesse biologico o epidemiologico;
- Dati grezzi (solo su richiesta).

Ulteriori analisi specifiche potranno essere concordate di volta in volta con il committente.

Al fine di ottimizzare le analisi si richiede al committente di fornire informazioni epidemiologiche/cliniche esaustive e, ove opportuno, indicare lo scopo dell'analisi (es. determinare la connessione epidemiologica tra due casi di infezione, determinare se il virus presenti mutazioni specifiche correlabili alla forma clinica, ecc.).

Inoltre, previa autorizzazione da parte del committente, le sequenze ottenute saranno depositate in database pubblici (es. GISAID o GenBank) in forma anonima nel rispetto della privacy.

7. Tempi di risposta

I tempi di risposta dipendono dal numero di campioni da analizzare, dalla tipologia di materiale inviato (campione clinico o RNA), dalla tipologia di analisi richiesta, dall'urgenza del caso, dalla

necessità del laboratorio di accorpate più campioni in un'unica sessione analitica per un'ottimizzazione dei costi. Le tempistiche saranno comunicate e concordate di volta in volta con il committente.

Il tempo minimo di effettuazione dell'analisi in condizioni d'urgenza, dovuto alla durata delle analisi stesse, non potrà comunque essere inferiore a 7 giorni lavorativi per un numero massimo di 7 campioni. "L'analisi" comprende la generazione del genoma mediante sequenziamento, analisi bioinformatica, interpretazione dei risultati, stesura del report.