



Ministero della Salute

EX-DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE SANITARIA

IL DIRETTORE GENERALE

A:

Assessorati alla Sanità Regioni Statuto Ordinario e Speciale LORO SEDI

Assessorati alla Sanità Province Autonome Trento e Bolzano LORO SEDI

Coordinamento Interregionale della Prevenzione

francesca.russo@regione.veneto.it

coordinamentointerregionaleprevenzione@regione.veneto.it

CC:

Ufficio di Gabinetto
Sede

Oggetto: Strategie di sequenziamento per l'identificazione delle varianti di SARS-CoV-2 ed il monitoraggio della loro circolazione in Italia – Indicazioni ad interim – Versione del 03-06-2024.

Si trasmette in allegato il documento in oggetto, che aggiorna e sostituisce la nota e l'allegato n. 1418 del 05/05/2023, tenuto conto delle osservazioni inviate dalle Regioni/PA per il tramite del Coordinamento Interregionale della Prevenzione.

In considerazione della attuale situazione epidemiologica, che vede una drastica diminuzione del numero di tamponi molecolari, e considerando che nella attuale fase epidemiologica non è prioritario fornire stime della trasmissibilità delle varianti circolanti, viene meno la necessità di eseguire un campionamento settimanale.

Pertanto, l'attività relativa alle indagini periodiche sarà organizzata considerando un campionamento mensile per le analisi molecolari da soggetti con sospetta infezione da SARS-CoV-2 basato sia sulla raccolta di campioni provenienti da persone afferenti a strutture ospedaliere o extraospedaliere, in particolare da pazienti con malattia grave da COVID-19 e/o con infezione persistente da SARS-CoV-2, sia sulla raccolta di campioni collezionati dai Medici di Medicina Generale (MMG) e Pediatri di Libera Scelta (medici sentinella) nell'ambito delle attività delle rete RespiVirNet.

A tal fine, si suggerisce alle Regioni/PPAA:

- di rafforzare adeguatamente il numero dei medici sentinella (Circolare Ministeriale 0000001 01/01/2023-DGPRE-DGPRE-P “Aggiornamento Circolare Interventi in atto per la gestione della circolazione del SARS-CoV-2 nella stagione invernale 2022-2023” e “Protocollo Operativo RespiVirNet - Sistema di Sorveglianza Sentinella delle sindromi simil-influenzali e dei virus respiratori, stagione 2023-2024”).
- mettere in atto tutte le misure necessarie al fine di assicurare il numero minimo di sequenziamenti così come indicato nella tabella 6 del documento allegato.

Le indicazioni contenute nel documento in oggetto si applicano ai sequenziamenti effettuati a partire dal 1° giugno 2024 e potranno subire modifiche o revisioni in relazione all’andamento del quadro epidemiologico nazionale ed internazionale, alla circolazione di nuove varianti, ad eventuali aggiornamenti al riguardo rilasciate dagli organismi internazionali.

IL DIRETTORE GENERALE
***F.to Francesco Vaia**



FRANCESCO
VAIA
01.07.2024
09:16:04
UTC

Il Direttore dell’Ufficio 5
Dott. Francesco Maraglino

Referenti/Responsabili del procedimento:

Alessia Mammone
Monica Sane Schepisi

**firmato digitalmente, ai sensi dell’art. 24 del D. Lgs. n. 82/2005*

STRATEGIE DI SEQUENZIAMENTO PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE
VARIANTI DI SARS-CoV-2 ED IL MONITORAGGIO DELLA LORO
CIRCOLAZIONE IN ITALIA - *INDICAZIONI AD INTERIM*

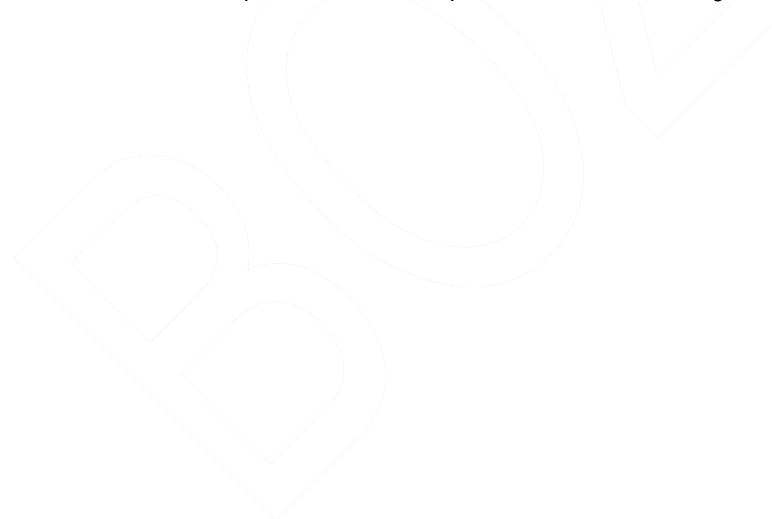
VERSIONE DEL 03-06-2024

Sommario

Premessa	1
Stima della prevalenza delle principali varianti circolanti in Italia tramite indagini periodiche	1
Appendice	8

Tabelle e Figure

Figura 1 e Tabella 1. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 100 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia.	2
Figura 2 e Tabella 2. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 200 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia	3
Figura 3 e Tabella 3. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 500 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia	4
Figura 4 e Tabella 4. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 750 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia	5
Figura 5 e Tabella 5. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 1000 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia	6
Tabella 6. Numero di campioni mensili da sequenziare in ciascuna Regione/PA	7



Premessa

La sorveglianza genomica è di grande importanza non solo per monitorare la circolazione di lignaggi e sottolignaggi di SARS-CoV-2 sul territorio e identificare precocemente l'eventuale emergenza di nuove varianti, ma anche per una valutazione dei cambiamenti genomici in specifici geni codificanti proteine coinvolte nelle fasi cruciali dell'infezione, così come per l'eventuale necessità di riformulare le composizioni vaccinali.

I casi segnalati e il numero di test diagnostici effettuati sono diminuiti drasticamente negli ultimi mesi, sia a livello nazionale che a livello globale. Il numero di campioni disponibili per il sequenziamento è di conseguenza diminuito e si ravvisa la necessità di rivedere le strategie di sequenziamento di SARS-CoV-2 in relazione all'attuale situazione epidemiologica.

Al fine di ottimizzare le modalità di raccolta dei campioni per il sequenziamento, in modo da ottenere dati che garantiscano una stima periodica delle varianti del virus SARS-CoV-2, nei mesi da aprile a ottobre si suggerisce un sequenziamento relativo ai campioni collezionati in ogni mese. Si fa altresì presente che, in relazione ad un eventuale cambio epidemiologico nella stagione autunnale o a segnalazioni provenienti dall'ambito internazionale potrà essere ripristinato il protocollo di raccolta preesistente.

Si raccomanda alle Regioni/PPAA di assicurare e rafforzare la raccolta di campioni per le indagini molecolari, come descritto nel presente documento, seguendo soluzioni specifiche per ciascuna Regione/PA.

Questo documento, da considerarsi nella sua versione *ad interim*, potrà subire delle ulteriori revisioni in relazione al quadro epidemiologico in evoluzione, e alla circolazione di specifiche varianti di interesse in sanità pubblica o di nuove varianti del virus SARS-CoV-2.

Stima della prevalenza delle principali varianti circolanti in Italia tramite indagini periodiche.

Con l'aggiornamento degli obiettivi della strategia di sequenziamento per l'identificazione delle varianti di SARS-CoV-2 e in considerazione che nella attuale fase epidemiologica non è prioritario fornire stime della trasmissibilità delle varianti circolanti, viene meno la necessità di eseguire un campionamento settimanale, che precedentemente era stato utilizzato per ottenere stime relative alle varianti del virus SARS-CoV-2 Alpha, Delta, Omicron.

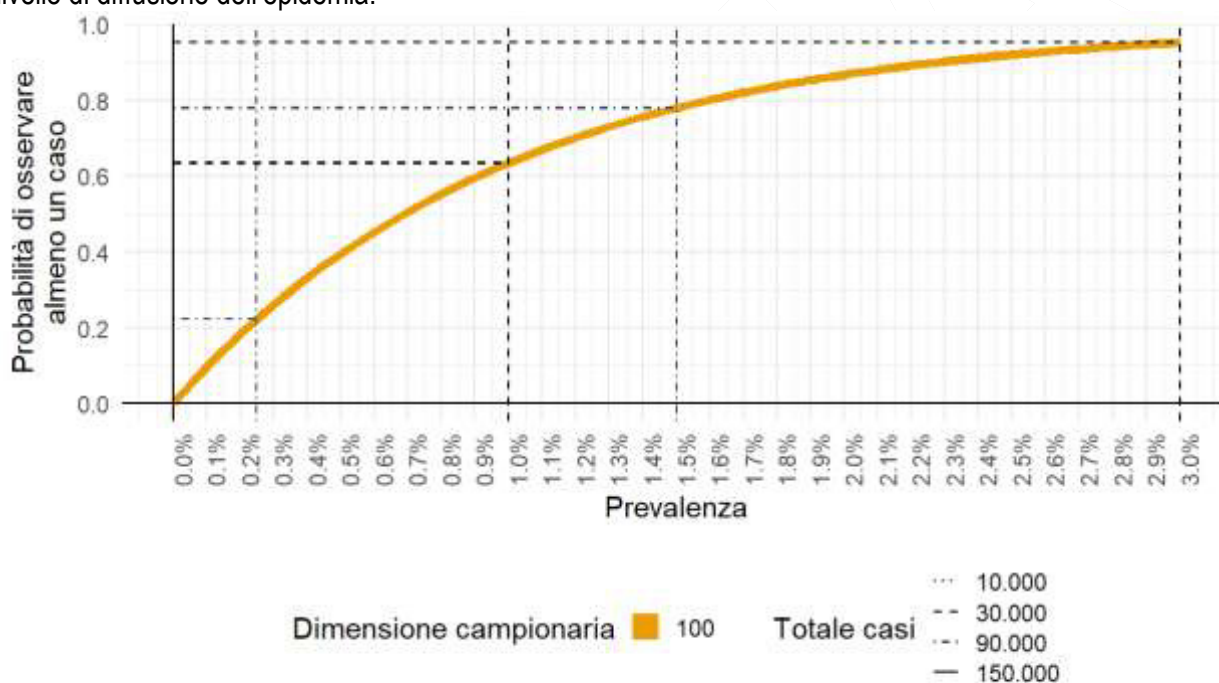
L'attività relativa alle indagini periodiche sarà organizzata considerando un campionamento mensile per le analisi molecolari da soggetti con sospetta infezione da SARS-CoV-2 basato sia sulla raccolta di campioni provenienti da persone afferenti a strutture ospedaliere o extraospedaliere, ed in particolare da pazienti con malattia grave da COVID-19 e/o con infezione persistente da SARS-CoV-2, sia sulla raccolta di campioni collezionati dai Medici di Medicina Generale (MMG) e Pediatri di Libera Scelta (medici sentinella) nell'ambito delle attività delle rete RespiVirNet. A tal fine, si suggerisce alle Regioni/PPAA di rafforzare adeguatamente il numero dei medici sentinella (Circolare Ministeriale 0000001-01/01/2023-DGPRES-DGPRES-P "Aggiornamento Circolare Interventi in atto per la gestione della circolazione del SARS-CoV-2 nella stagione invernale 2022-2023" e "Protocollo Operativo RespiVirNet - Sistema di Sorveglianza Sentinella delle sindromi simil-influenzali e dei virus respiratori, stagione 2023-2024").

I campioni raccolti dovranno essere inviati per il sequenziamento alla rete dei laboratori accreditati sulla piattaforma I-Co-Gen dell'ISS.

Si raccomanda, inoltre, di rendere disponibili sia dati demografici (es. età, sesso, area geografica) che clinici (ad es. paziente ricoverato con sintomi riferibili a COVID-19, stato vaccinale) associati ai campioni per meglio contestualizzare i dati di genomica raccolti a fini di sanità pubblica.

Le figure e le tabelle seguenti riportano la probabilità di identificare almeno un campione con una specifica caratteristica (ad esempio una variante di interesse emergente) sulla base della prevalenza attesa stimata considerando il livello di diffusione della infezione da SARS-CoV-2 (qui ipotizzato di 10.000, 30.000, 90.000 e 150.000 infezioni mensili, casi corrispondenti a bassa – intorno a 20-50 casi per 100.000 abitanti, intermedia - 150 casi per 100.000 abitanti, e alta diffusione - 250 casi per 100.000 abitanti) e di cinque diverse dimensioni campionarie qui ipotizzate. Per valori di prevalenza più elevati (>1%) la probabilità di identificazione è ancora maggiore.

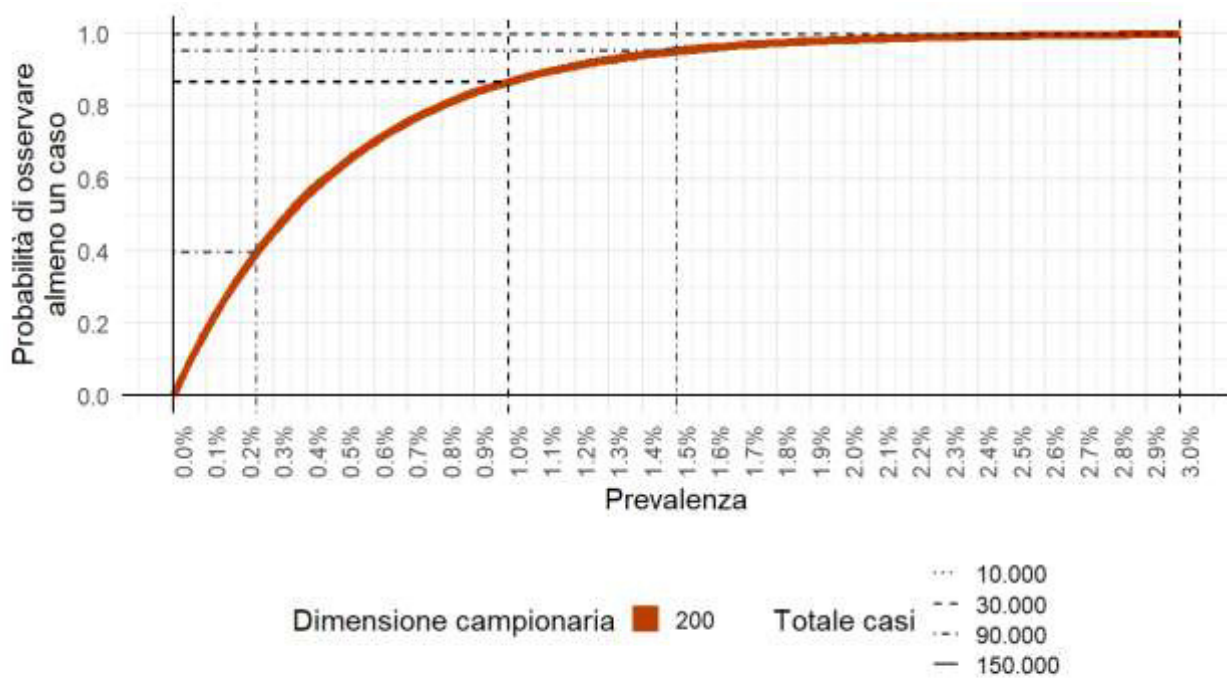
Figura 1 e Tabella 1. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 100 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia.



Per popolazioni (casi mensili) più grandi di 100.000 le curve sono sostanzialmente sovrapponibili a quella generata da una popolazione pari a 100.000

Dimensione campionaria	Totale casi (numerosità popolazione)	Prevalenza	Probabilità di osservare almeno un caso
100	10.000	0.25%	0,222
100	30.000	0.25%	0,222
100	90.000	0.25%	0,222
100	150.000	0.25%	0,222
100	10.000	1%	0,636
100	30.000	1%	0,635
100	90.000	1%	0,634
100	150.000	1%	0,634
100	10.000	3%	0.953
100	30.000	3%	0.953
100	90.000	3%	0.953
100	150.000	3%	0.952

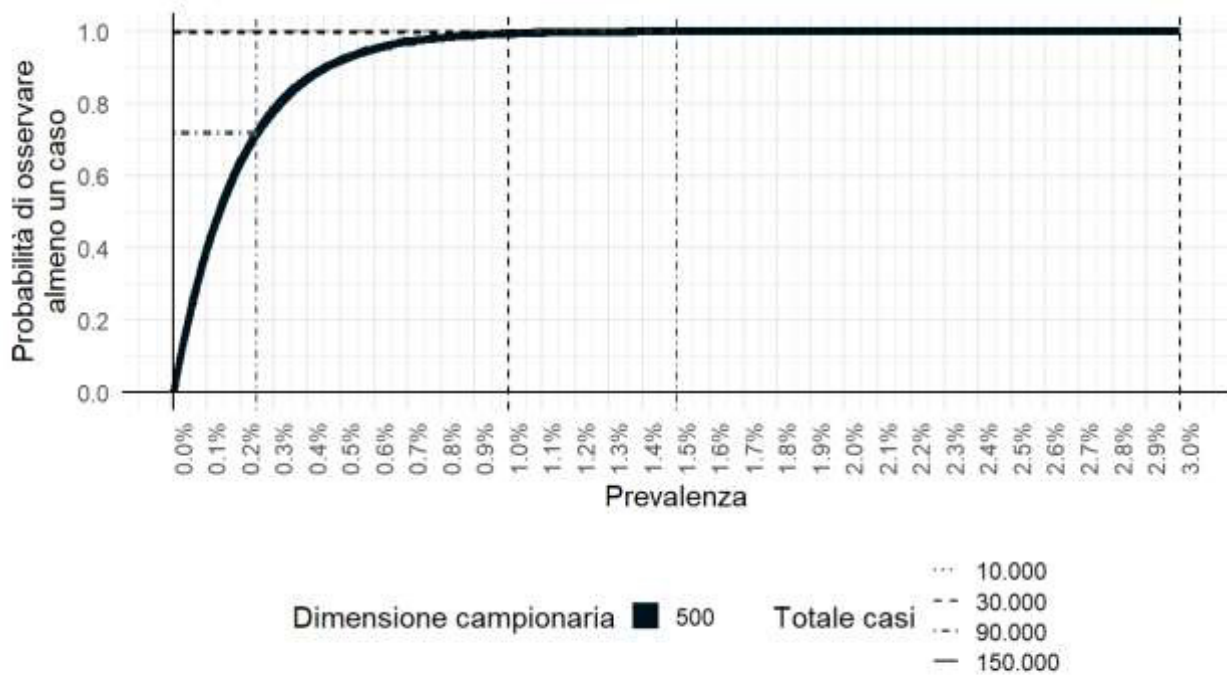
Figura 2 e Tabella 2. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 200 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa del livello di diffusione dell'epidemia.



Per popolazioni (casi mensili) più grandi di 100.000 le curve sono sostanzialmente sovrapponibili a quella generata da una popolazione pari a 100.000

Dimensione campionaria	Totale casi (numerosità popolazione)	Prevalenza	Probabilità di osservare almeno un caso
200	10.000	0.25%	0,397
200	30.000	0.25%	0,395
200	90.000	0.25%	0,394
200	150.000	0.25%	0,394
200	10.000	1%	0,869
200	30.000	1%	0,867
200	90.000	1%	0,866
200	150.000	1%	0,866
200	10.000	1.5%	0.953
200	30.000	1.5%	0.952
200	90.000	1.5%	0.951
200	150.000	1.5%	0.951

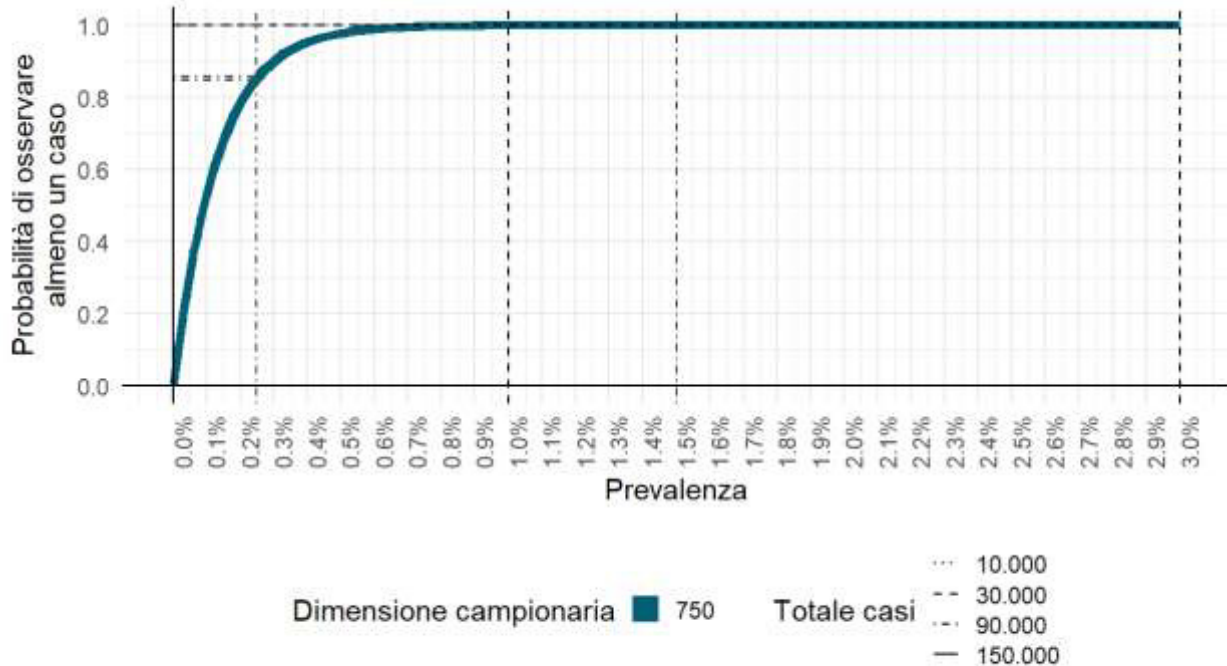
Figura 3 e Tabella 3. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 500 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia.



Per popolazioni (casi mensili) più grandi di 100.000 le curve sono sostanzialmente sovrapponibili a quella generata da una popolazione pari a 100.000

Dimensione campionaria	Totale casi (numerosità popolazione)	Prevalenza	Probabilità di osservare almeno un caso
500	10.000	0.25%	0,723
500	30.000	0.25%	0,717
500	90.000	0.25%	0,715
500	150.000	0.25%	0,715
500	10.000	1%	0,994
500	30.000	1%	0,993
500	90.000	1%	0,994
500	150.000	1%	0,993

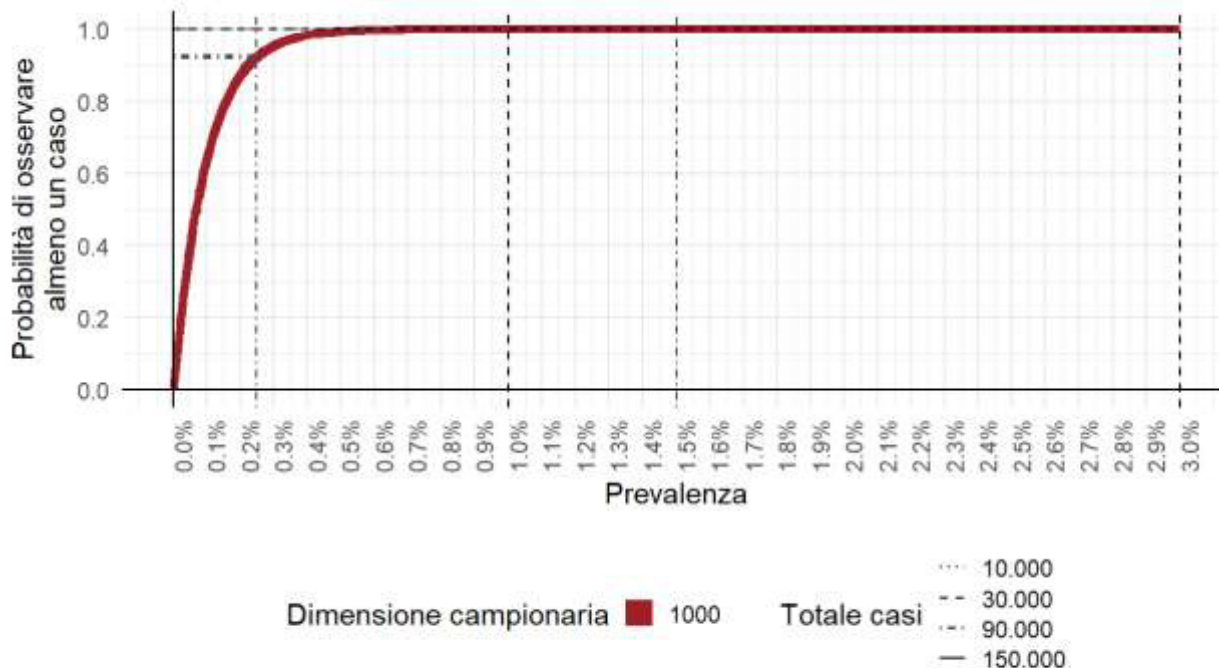
Figura 4 e Tabella 4. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 750 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia.



Per popolazioni (casi mensili) più grandi di 100.000 le curve sono sostanzialmente sovrapponibili a quella generata da una popolazione pari a 100.000

Dimensione campionaria	Totale casi (numerosità popolazione)	Prevalenza	Probabilità di osservare almeno un caso
750	10.000	0.25%	0,858
750	30.000	0.25%	0,851
750	90.000	0.25%	0,848
750	150.000	0.25%	0,848
750	10.000	1%	1,000
750	30.000	1%	1,000
750	90.000	1%	0,999
750	150.000	1%	0,999

Figura 5 e Tabella 5. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione mensile di 1000 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia.



Per popolazioni (casi mensili) più grandi di 100.000 le curve sono sostanzialmente sovrapponibili a quella generata da una popolazione pari a 100.000

Dimensione campionaria	Totale casi (numerosità popolazione)	Prevalenza	Probabilità di osservare almeno un caso
1000	10.000	0.25%	0,928
1000	30.000	0.25%	0,922
1000	90.000	0.25%	0,919
1000	150.000	0.25%	0,919
1000	10.000	1%	1,000
1000	30.000	1%	1,000
1000	90.000	1%	1,000
1000	150.000	1%	1,000

Da una attenta analisi delle tabelle 1-5, si osserva che con le diverse dimensioni campionarie mensili qui ipotizzate si ha una probabilità maggiore di almeno il 63% (solo 100 sequenze mensili) di identificare almeno un caso di variante con una prevalenza sul territorio italiano di almeno l'1%. La probabilità aumenta all'aumentare della dimensione campionaria e al diminuire del livello di diffusione, anche se questi ultimi effetti sembrano sostanzialmente trascurabili. Si osserva che con solo 100 sequenze analizzate abbiamo una probabilità del 95% di identificare almeno un campione con una specifica variante solo se questa variante ha una prevalenza di almeno il 3%; con 200 sequenze c'è una probabilità del 95% di identificare almeno un campione con una specifica variante se questa ha almeno una prevalenza dell'1.5%; Per varianti con una prevalenza attesa di 0.25%, si apprezzano importanti differenze di probabilità di identificazione tra le diverse dimensioni campionarie qui ipotizzate mentre l'effetto del livello di diffusione sembra essere molto più trascurabile. Per varianti la cui prevalenza è di almeno 0,25% la probabilità di intercettarle è >90% con 1000 sequenze mensili valutate; la probabilità diminuisce a circa 85% con 750 sequenze, poco più del 70% con 500 sequenze; a circa 40% con

200 sequenze e a poco più di 20% con sole 100 sequenze. Tali risultati sono confermati sia con livelli di circolazione più bassi (<5 casi/100.000 abitanti per mese) che più elevati.

La suddivisione per Regione/PA del numero dei campioni da sequenziare è basata sulla popolazione residente in ciascuna Regione/PA. In tabella 6 si riporta la numerosità dei campioni da sequenziare per Regione/PA per le cinque diverse dimensioni campionarie ipotizzate. Si raccomanda di considerare anche numerosità campionarie più elevate rispetto a quelle di seguito stimate.

Tabella 6. Numero di campioni mensili da sequenziare in ciascuna Regione/PA.

Regione/PA	Popolazione 2024	% sequenze mensili proporzionali a popolazione	Dimensione campionaria mensile ipotizzata				
			2	4	11	16	22
Abruzzo	1,269,963	2.2	2	4	11	16	22
Basilicata	533,636	0.9	1	2	5	7	9
Calabria	1,838,150	3.1	3	6	16	23	31
Campania	5,590,076	9.5	10	19	48	71	95
E. Romagna	4,455,188	7.6	8	15	38	56	75
FVG	1,195,792	2.0	2	4	10	15	20
Lazio	5,720,272	9.7	10	19	48	73	97
Liguria	1,508,847	2.6	3	5	13	19	26
Lombardia	10,020,528	17.0	17	34	85	127	169
Marche	1,484,427	2.5	3	5	13	19	25
Molise	289,413	0.5	1	1	2	4	5
P.A. Bolzano	536,933	0.9	1	2	5	7	9
P.A. Trento	545,183	0.9	1	2	5	7	9
Piemonte	4,252,581	7.2	7	14	36	54	72
Puglia	3,890,250	6.6	7	13	33	50	66
Sardegna	1,569,832	2.7	3	5	13	20	27
Sicilia	4,794,512	8.1	8	16	41	61	82
Toscana	3,664,798	6.2	6	12	31	47	62
Umbria	854,378	1.4	2	3	7	11	15
V. d'Aosta	123,018	0.2	1*	1*	1	2	2
Veneto	4,851,972	8.2	8	16	41	62	82
TOTALE	58,989,749		100	200	500	750	1000

Nota: Le dimensioni campionarie qui stratificate a livello regionale sono basate su una ipotesi di distribuzione omogenea del virus sul territorio nazionale; nel caso di assenza o quasi assenza di circolazione in qualche Regione/PPAA, le sequenze da effettuare dovranno essere adattate al valore più prossimo alla disponibilità dei campioni raccolti.

*Per la Regione V. d'Aosta il numero di campioni è stato approssimato con 1, visto che il numero previsto era <1.

Si raccomanda di:

- Caricare in I-Co-Gen tutte le sequenze analizzate nel mese entro il giorno 15 del mese successivo; se tale giorno dovesse essere festivo, la scadenza è spostata al giorno lavorativo successivo;
- caricare in I-Co-Gen non solo le sequenze consensus, ma anche fastq;
- caricare i genomi nella piattaforma I-Co-Gen per i campioni dell'indagine periodica sulle varianti virali, per avere una corretta identificazione dei lignaggi utilizzando tutti la versione di Pangolin presente nella piattaforma. Le classificazioni sono in continuo aggiornamento, pertanto si rende quanto mai necessario allinearsi con la versione del software presente in I-Co-Gen;
- completare le informazioni relative alle sequenze depositate in I-Co-Gen con i principali dati relativi al caso (ad es. se soggetto ospedalizzato, o in terapia intensiva, la fascia di età etc.), oltre alla data di prelievo del tampone;
- autorizzare l'invio automatico alla piattaforma internazionale GISAID.

Si specifica inoltre che:

I rimborsi delle spese di sequenziamento graveranno sul finanziamento dell'Istituto Superiore di Sanità di cui all'art. 34bis della Legge 23 Luglio 2021 n. 106 (Modificazioni apportate in sede di conversione al Decreto Legge 25 maggio 2021 n. 73) confluito, dall'esercizio finanziario 2022, nel contributo ordinario dell'Ente di cui allo Stato di Previsione della Spesa del Ministero della Salute, e sui fondi afferenti al progetto "Enhancing Whole Genome Sequencing (WGS), national infrastructures and capacities for COVID-19 and surveillance of other respiratory viruses in Italy" (SeCOV+), co-finanziato dalla Unione Europea.

APPENDICE

Avvertenze per i caricamenti batch su I-Co-Gen

- Qualche minuto dopo aver eseguito il caricamento in batch. si può ispezionare l'ultimo file rapporto_[data] nella cartella elaborati, per vedere se ci sono stati problemi con il batch.
- Si può controllare dentro l'interfaccia web della piattaforma I-Co-Gen se i campioni sono stati creati e le elaborazioni avviate (in momenti di molteplici caricamenti. ci possono essere dei ritardi in questa fase).
- Si riceve una mail di fine analisi per ogni campione inviato.

Collegamento al manuale: <https://aries.iss.it/static/images/IRIDA21-ICoGen.pdf>.

Si prega di contattare l'indirizzo mail helpdesk.icogen@iss.it per eventuali problemi inerenti al caricamento delle sequenze.