



Il Convegno Nazionale SITLaB  
Chieti 10-11 giugno 2023

SITLaB - Società Scientifica Italiana dei TSLB



## SEQUENZIAMENTO DEL VIRUS SARS-CoV-2 : PROBLEMI E SOLUZIONI

**Autori:** Ilaria Celesti, Fulvia Fraticelli, Ilenia La Greca **Coautori:** Andrea Cazzani, Alessandra De Santis, Lorenzo Furzi, Francesca Maione, Francisco Obregon, Luisa Pamparau, Sara Petrolo.

**Affiliazioni:** UOSD Microbiologia e Virologia, Istituto Dermatologico San Gallicano, Istituti Fisioterapici Ospitalieri, Roma, Italia

### INTRODUZIONE

La pandemia del virus SARS-CoV-2 ha posto molte nuove sfide ai processi sanitari e di laboratorio in tutto il mondo tra le quali quella di un'efficace sorveglianza genomica virale, con un flusso di lavoro genomico e bioinformatico di fondamentale importanza in quanto ha consentito di scoprire nuove presunte varianti di preoccupazione (VOC) e di monitorare la distribuzione delle varianti su scala geografica e di popolazione. In questo scenario, presentiamo un'ottimizzazione del protocollo "COVIDSeq Test vv3" Illumina basata sulla nostra esperienza di 4628 sequenze totali, che rappresentano il 2,52% delle sequenze italiane e il 23,54% della Regione Lazio al momento della stesura di questo documento.

### OBIETTIVI

Ottimizzare la procedura di sequenziamento su piattaforma NGS (Next Generation Sequencing) Illumina (protocollo COVIDSeq Test vv3) per gestire il tracciamento di varianti di preoccupazione (VOC) e monitorare la distribuzione delle varianti di SARS-CoV-2 su scala geografica e di popolazione.

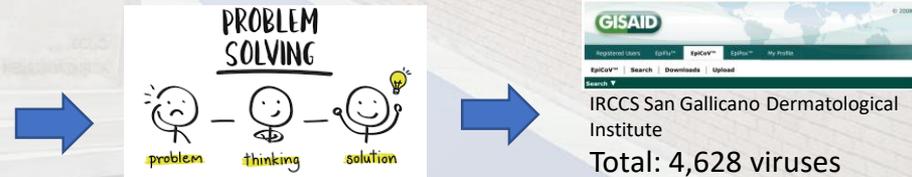
### MATERIALI E METODI

Per rilevare e caratterizzare il SARS-CoV-2 da tamponi nasofaringei, è stato impiegato il kit Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit v4 (Anatolia geneworks, Istanbul, Turchia). I campioni con un valore ct < 25 sono stati riestratti per l'analisi NGS utilizzando lo strumento automatico QIASymphony (Qiagen, Hilden, Germania) con ottenimento di un eluato puro di 60 µl. Successivamente sono state preparate le librerie con il kit Nextera™ XT e DNA Prep Library Kit Illumina e caricate sullo strumento Novaseq 6000 (Illumina, San Diego, USA) per il sequenziamento dell'intero genoma (WGS). La successiva analisi bioinformatica delle sequenze prodotte ha permesso l'identificazione delle varianti virali.

### RISULTATI

Durante la prima ondata della variante delta in Italia (agosto-settembre 2021), abbiamo riscontrato una corsa con un livello di contaminazione dei controlli negativi particolarmente elevato, contaminazione confermata da un successivo test contenente 10 campioni di acqua in cui è stato sequenziato il genoma virale. Dopo aver escluso un problema di contaminazione ambientale, è stato ipotizzato che l'inquinamento potesse dipendere dal protocollo CovidSeq Illumina in quanto progettato per rilevare la positività virale con alta sensibilità. Poiché sono stati selezionati campioni con ct<25 era altamente probabile che potesse verificarsi un'amplificazione eccessiva con conseguente sequenziamento di singole molecole virali aspecifiche dovuta ai numerosi cicli di amplificazione della PCR e alla elevata sensibilità della metodica. Secondo queste considerazioni sono stati ridotti i cicli di PCR per l'amplificazione del cDNA (da 35 a 22 cicli) e le fasi di codifica dell'amplicone (da 7 a 6 cicli), ottimizzando anche il tempo di esecuzione (da 4 ore a 2,5 ore), modifiche che hanno portato alla soluzione del problema. Il sequenziamento dell'intero genoma, effettuato nel periodo compreso tra Aprile 2021 e Maggio 2023, ha prodotto 4628 campioni di alta qualità senza che si siano verificate ulteriori problematiche.

CAMPIONE	LINEAGE	CAMPIONE	LINEAGE
controllo negativo piastra1	B.1.617.2	ACQUA 1 e 7	AY.4
controllo negativo piastra2	B.1.617.2	ACQUA 2,5,9,10	B.1.617.2
controllo negativo piastra3	AY.12	ACQUA 3,4,6,8	AY.12
controllo negativo piastra4	B.1.617.2		



### CONCLUSIONI

È stato presentato un protocollo di sequenziamento ottimizzato che ha portato alla risoluzione del problema di grave contaminazione delle piastre che si è verificato nel nostro Istituto nell'estate del 2021. Si ritiene che la condivisione di questa esperienza possa essere di riferimento per altri laboratori qualora si trovassero ad affrontare una simile emergenza. Infine, questa esperienza dimostra come sia necessario utilizzare controlli negativi e positivi in ogni seduta analitica.