



Ministero della Salute

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: Trasmissione del documento “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 5 maggio 2023.” – la seguente Nota annulla e sostituisce la precedente di pari oggetto.

Si trasmette in allegato il documento in oggetto, che aggiorna e sostituisce la nota e l’allegato n. 17975 del 17/03/2022, tenuto conto delle osservazioni inviate dalle Regioni/PPAA 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 al fine di garantire il proseguimento delle attività di sequenziamento, si raccomanda di:

- mantenere attivo il sistema di sorveglianza Influnet/RespiVirNet, il cui periodo di monitoraggio si è concluso il 30 aprile 2023 come da Protocollo Operativo¹. Le Regioni/PPAA possono continuare su base volontaria la sorveglianza epidemiologica e virologica, utilizzando l’apposito portale che rimarrà aperto fino all’inizio della nuova stagione (ottobre 2023);

¹ https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_3267_allegato.pdf

- mettere in atto tutte le misure necessarie al fine di assicurare il numero minimo di sequenziamenti così come indicato nella tabella 4 del documento allegato, possibilmente aumentando il coinvolgimento di Medici di medicina generale, Pediatri di libera scelta o altre realtà ritenute idonee.

Le indicazioni contenute nel documento in oggetto si attuano a partire dal 1° giugno 2023.

Nel periodo di transizione si raccomanda di continuare le attività di sequenziamento in atto per il monitoraggio continuo delle varianti di SARS-CoV-2, al fine di dare continuità alla raccolta dei dati a livello nazionale e internazionale, ed aderire a quanto richiesto dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC).

La prossima Flash Survey (obiettivo 1, come da documento allegato) sarà programmata per la prima settimana di giugno 2023.

Tali indicazioni 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 Dott. Giovanni Rezza**



Il Direttore dell'Ufficio 5
Dott. Francesco Maraglino

Referenti/Responsabili del procedimento:

Dott.ssa Alessia Mammone
Dott.ssa Monica Sane Schepisi
Dott.ssa Anna Caraglia

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 05-05-2023

Sommario

<u>Premessa</u>	1
Obiettivo specifico 1 -	1
Obiettivo specifico 2 -	2
<u>Appendice</u>	7

Tabelle e Figure

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

Premessa

La sorveglianza genomica è di grande importanza per identificare precocemente l'eventuale emergenza di nuove varianti virali e monitorare la loro circolazione sul territorio.

L'obiettivo suggerito dall'ECDC consiste nell'effettuare un numero adeguato di sequenziamenti settimanali rappresentativi del numero di casi positivi di COVID-19 tali da seguire l'andamento e di stimare la presenza di una variante virale che circoli con una prevalenza almeno del 5% o inferiore (<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/country-overviews>).

Al fine di ottimizzare le modalità di raccolta dei campioni per il sequenziamento in modo da ottenere dati che garantiscano **un flusso continuo di informazioni (sul quale si basa l'identificazione precoce di nuove varianti)** e, allo stesso tempo, **la stima della loro prevalenza**, si suggeriscono due distinti flussi basati su diversi criteri di campionamento e obiettivi specifici.

Si raccomanda alle Regioni/PPAA di assicurare e rafforzare la raccolta di campioni per le indagini molecolari, seguendo soluzioni specifiche per ciascuna Regione/PPAA, per il conseguimento di entrambi gli obiettivi descritti nel presente documento.

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.

Obiettivo specifico 1

Stimare la prevalenza delle principali varianti circolanti in Italia tramite indagini "Flash survey"

In considerazione dell'attuale fase epidemica, l'attività relativa a "flash survey" sarà organizzata considerando un campionamento settimanale per le analisi molecolari da soggetti con sospetta infezione da SARS-CoV-2 e basato essenzialmente sui campioni collezionati dai Medici di Medicina Generale (MMG) e Pediatri di Libera Scelta (medici sentinella) nell'ambito delle attività delle rete Influnet/RespiVirNet, raccomandando alle regioni/PPAA di rafforzare adeguatamente il numero dei medici sentinella per la raccolta dei campioni (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 Influnet & RespiVirNet Sistema di Sorveglianza Sentinella delle sindromi simil-influenzali, dei virus influenzali, del virus SARS-CoV-2 e di altri virus respiratori). Altresì, potranno essere raccolti a questo scopo tutti i campioni per le analisi molecolari che provengano, ad esempio, da punti tampone o *drive-in* organizzati dalle ASL, e comunque campioni provenienti da persone afferenti a strutture ospedaliere o extraospedaliere. È utile raccogliere e 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 raccolti al fine di meglio caratterizzare i dati di genomica raccolti ai fini di sanità pubblica ed eventualmente per stratificare le stime di prevalenza ottenute. I campioni raccolti dovranno essere inviati per il sequenziamento alla rete dei laboratori accreditati sulla piattaforma I-Co-Gen dell'ISS.

Il campione necessario n per poter osservare una variante con prevalenza p sul territorio nazionale in una popolazione di ampiezza N e stimare questa prevalenza con una precisione ε e livello di confidenza $(1 - \alpha)\%$ è dato dalla seguente formula

$$n \geq \frac{N z_{\alpha/2}^2 p(1-p)}{\varepsilon^2 (N-1) + z_{\alpha/2}^2 p(1-p)}$$

Si segnala che da un'analisi specifica dei dati della Sorveglianza Integrata COVID-19, nei primi mesi del 2023, le persone che sono state diagnosticate, ogni settimana, con infezione da SARS-CoV-2 mediante un tampone molecolare, sono circa 3.500 (dati sorveglianza integrata COVID-19 <https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/aggiornamenti>). L'ampiezza campionaria necessaria per stimare una prevalenza del 5% a livello nazionale con precisione del 2% e confidenza del 95%, assumendo quindi che N sia 4000, è pari a **n=410**. La stessa ampiezza campionaria è sufficiente per stimare una prevalenza del 50% con precisione del 4.6% e confidenza del 95% e stimare una prevalenza dell'1% con precisione dello 0.9% e confidenza del 95%.

Si specifica che l'ampiezza campionaria calcolata a livello nazionale viene poi ridistribuita nelle Regioni e PPAA in base alla percentuale di casi notificati nelle Regioni e PPAA in uno dei giorni della settimana precedente sul totale nazionale di casi notificati.

Obiettivo specifico 2

Stabilire un flusso continuo di sequenziamenti che consenta di identificare la comparsa di varianti nuove o già note di SARS-CoV-2 di interesse di sanità pubblica in ospedalizzati per COVID-19

In considerazione dell'attuale fase epidemica e, a sostituzione della struttura dell'obiettivo 2 precedentemente utilizzata, l'attività relativa a questo obiettivo sarà focalizzata su pazienti ospedalizzati con malattia grave da COVID-19 e/o con infezione persistente da SARS-CoV-2.

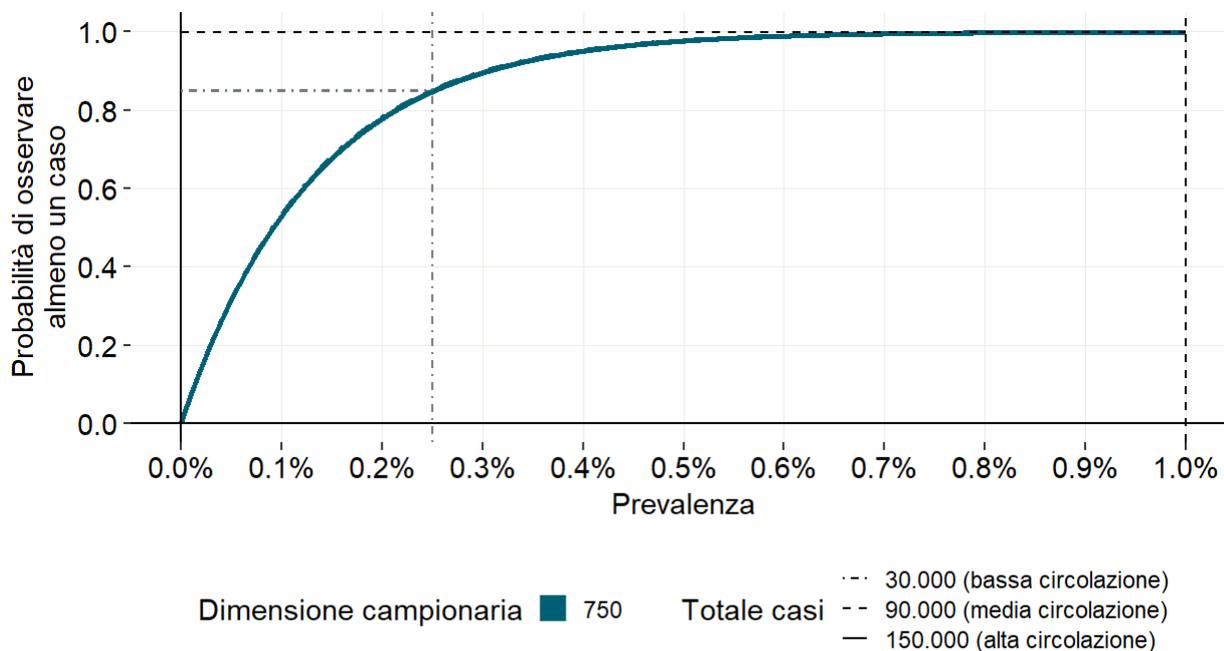
La scelta dei campioni di provenienza ospedaliera è duplice: il primo motivo riguarda la difficoltà di reperire campioni positivi molecolari in persone con sintomi lievi che nella maggior parte dei casi vengono ad oggi sottoposti solo al test antigenico; il secondo è ottenere una valutazione più mirata sui casi gravi al fine di identificare le caratteristiche genomiche più rilevanti e di maggiore impatto clinico.

Si raccomanda di rafforzare la raccolta dei dati clinici per i campioni sopra descritti e di considerare anche percentuali più elevate rispetto a quelle suggerite e sopra indicate.

È da sottolineare che, per effettuare un sequenziamento è necessario partire da un campione processato per indagini in real-time PCR.

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 fino all'1% del livello di diffusione della infezione da SARS-CoV-2 (qui ipotizzato di 30.000, 90.000 e 150.000 infezioni settimanali, casi corrispondenti a bassa – intorno a 50 casi per 100.000 abitanti intermedia - 150 casi per 100.000 abitanti e alta diffusione - 250 casi per 100.000 abitanti) e di tre diverse dimensioni campionarie qui ipotizzate. Per valori di prevalenza più elevati (>1%) la probabilità di identificazione è ancora maggiore.

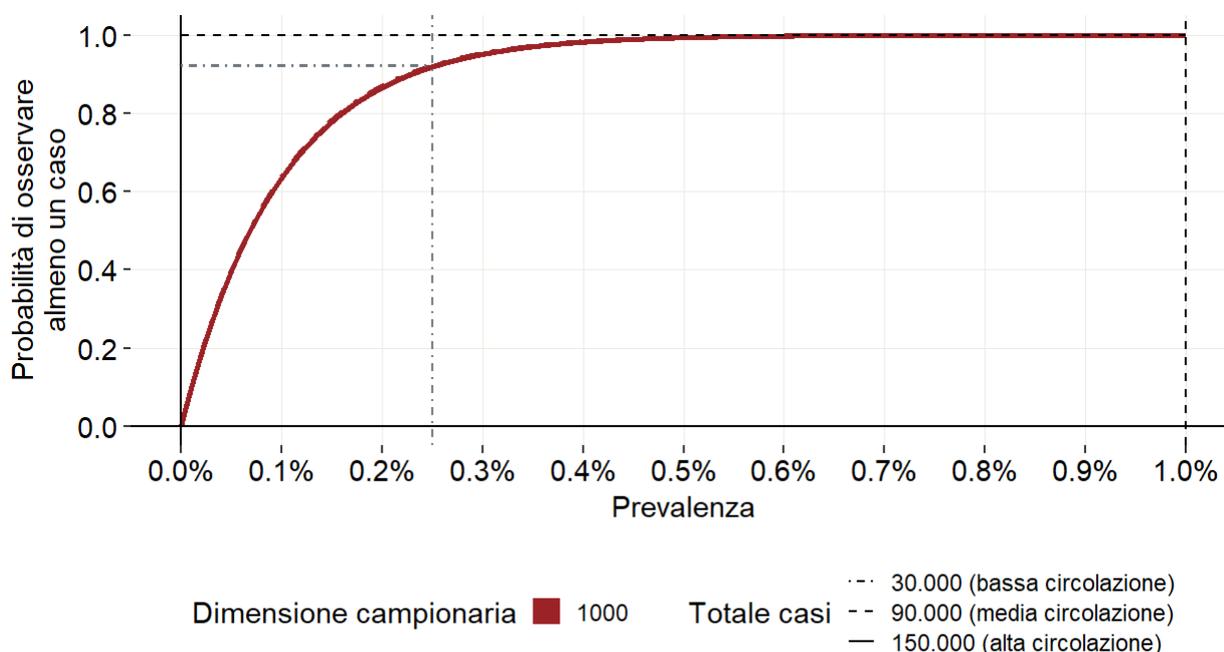
Figura 2 e Tabella 2. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante mediante un campione settimanale di 750 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia.



Per popolazioni (casi settimanali) 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	30.000	0.25%	0,851
750	30.000	1%	1,000
750	90.000	0.25%	0,848
750	90.000	1%	0,999
750	150.000	0.25%	0,848
750	150.000	1%	0,999

Figura 3 e Tabella 3. Probabilità di identificare almeno un campione con una specifica variante con un campione settimanale di 1000 sequenze per diverse dimensioni campionarie al variare della prevalenza attesa e del livello di diffusione dell'epidemia.



Per popolazioni (casi settimanali) 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
1.000	30.000	0.25%	0,922
1.000	30.000	1%	1,000
1.000	90.000	0.25%	0,919
1.000	90.000	1%	1,000
1.000	150.000	0.25%	0,919
1.000	150.000	1%	1,000

Si osserva che con le diverse dimensioni campionarie settimanali qui ipotizzate si ha una probabilità maggiore del 99% 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 effetti sembrano sostanzialmente trascurabili con una prevalenza dell'1%. Per varianti con una prevalenza attesa di 0.25%, si apprezzano differenze di probabilità di identificazione tra le diverse dimensioni campionarie qui ipotizzate mentre l'effetto del livello di diffusione sembra essere molto più trascurabile. Si sottolinea che con un campione di 1.000 sequenze settimanali, indipendentemente dai livelli di circolazione ipotizzati, la probabilità di intercettare varianti che circolino con prevalenza di almeno lo 0,25% è >90%, contro circa una probabilità di 85% con 750 sequenze e di poco più del 70% con 500 sequenze. Tali risultati sono confermati sia con livelli di circolazione più bassi (fino a 5 casi/100.000 abitanti per settimana) 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 4 si riporta la numerosità dei campioni da genotipizzare per Regione/PA per le tre diverse dimensioni campionarie ipotizzate.

Tabella 4. Numero di campioni settimanali da sequenziare in ciascuna Regione/PA.

Regione/PA	Popolazione 2023	% sequenze settimanali proporzionali a popolazione	dimensione campionaria settimanale ipotizzata		
Abruzzo	1,269,860	2.2	11	16	22
Basilicata	536,659	0.9	5	7	9
Calabria	1,841,300	3.1	16	23	31
Campania	5,592,175	9.5	48	71	95
E. Romagna	4,426,929	7.5	38	56	75
FVG	1,192,191	2.0	10	15	20
Lazio	5,707,112	9.7	48	73	97
Liguria	1,502,624	2.6	13	19	26
Lombardia	9,950,742	16.9	85	127	169
Marche	1,480,839	2.5	13	19	25
Molise	289,840	0.5	2	4	5
P.A. Bolzano	533,267	0.9	5	7	9
P.A. Trento	542,050	0.9	5	7	9
Piemonte	4,240,736	7.2	36	54	72
Puglia	3,900,852	6.6	33	50	66
Sardegna	1,575,028	2.7	13	20	27
Sicilia	4,802,016	8.2	41	61	82
Toscana	3,651,152	6.2	31	47	62
Umbria	854,137	1.5	7	11	15
V. d'Aosta	122,955	0.2	1	2	2
Veneto	4,838,253	8.2	41	62	82
TOTALE	58,850,717		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.

Si raccomanda di:

- eseguire il sequenziamento auspicabilmente entro 7 gg lavorativi, ponendo particolare attenzione alla necessità di completare in tempo reale le informazioni relative alle sequenze depositate in I-Co-Gen con i principali dati relativi al caso, oltre alla data di prelievo del tampone;
- inserire i risultati relativi alle varianti del virus SARS-CoV-2 e il codice I-Co-Gen nella piattaforma della sorveglianza integrata COVID-19 dell'ISS attualmente in uso;
- caricare tutte le sequenze effettuate sulla piattaforma I-Co-Gen e di autorizzare l'invio automatico alla piattaforma internazionale GISAID.

Si specifica inoltre che:

- La settimana in cui ricadrà la *flash survey* non si sovrapporrà al campionamento relativo all'obiettivo specifico 2.
- 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.

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.