



*Istituto Superiore di Sanità
V.le Regina Elena 299 00161
Roma Italia*

REV. 1

Sorveglianza di SARS-CoV-2 in reflui urbani

Protocollo progetto SARI

A cura di:

Giuseppina La Rosa, Marcello Iaconelli, Lucia Bonadonna

Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità

Elisabetta Suffredini

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità pubblica
veterinaria

Per informazioni sul documento inviare mail a:
RefluiCovid-19@iss.it



Sommario

Sorveglianza Nazionale su SARS-CoV-2 in reflui urbani	1
SCOPO	1
STRUMENTAZIONE, MATERIALI E REAGENTI	2
Concentrazione dei campioni	2
Amplificazione genica (nested RT-PCR)	3
Amplificazione genica (real-time RT-PCR)	3
CAMPIONAMENTO	4
Procedura e frequenza di prelievo	4
Conservazione dei campioni	4
Trasporto dei campioni	4
CONCENTRAZIONE DEI CAMPIONI	5
Prove preliminari di recupero	5
Procedura di concentrazione	5-6
ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI	7-8
RILEVAZIONE DI SARS-CoV-2	9
Rilevazione di SARS-CoV-2 mediante real-time RT-PCR	9-10
Rilevazione di SARS-CoV-2 mediante nested RT-PCR	11-13
Referenze bibliografiche	14

Sorveglianza Nazionale su SARS-CoV-2 in reflui urbani

SCOPO

Questa guida è stata realizzata a supporto della Rete nazionale di Sorveglianza ambientale per definire un protocollo comune di rilevazione del SARS-CoV-2 nei reflui civili come strumento predittivo della prevalenza di COVID-19 nella popolazione, nell'ambito del progetto "SORVEGLIANZA AMBIENTALE DI SARS-CoV-2 ATTRAVERSO I REFLUI URBANI IN ITALIA: INDICAZIONI SULL'ANDAMENTO EPIDEMICO E ALLERTA PRECOCE (acronimo: SARI)".

L'epidemiologia basata sulle acque reflue ("Wastewater Based Epidemiology") è un approccio che utilizza i reflui urbani come fonte di osservazione dinamica della circolazione dei patogeni. Inizialmente applicata a poliovirus ed altri virus enterici, di recente è stata utilizzata per lo studio della circolazione di SARS-CoV-2 nella popolazione. Gruppi di ricerca in diversi paesi hanno identificato RNA del virus nelle acque reflue (Medema *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020; Nemudryi *et al.*, 2020; Wurtzer *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2020; Randazzo *et al.*, 2020; Chavarria-Mirò *et al.*, 2020; Hata *et al.*, 2020; Kocamemi *et al.*, 2020; Bar-Or *et al.*, 2020; Prado *et al.*, 2020), utilizzando metodi analitici diversi sia per la fase della concentrazione del refluo che per la ricerca del virus con metodi molecolari, nessuno dei quali è stato formalmente validato per il SARS-CoV-2.

Questa guida non intende prescrivere un metodo unico e universale ma vuole suggerire un approccio metodologico di riferimento, che si è già dimostrato in grado di rilevare SARS-CoV-2 in acque reflue (La Rosa *et al.*, 2020a; La Rosa *et al.*, 2020b). L'obiettivo è quello di applicare criteri di analisi comuni nell'ambito del progetto SARI, al fine di ottenere risultati confrontabili e quindi univocamente interpretabili.

STRUMENTAZIONE, MATERIALI E REAGENTI

I riferimenti a marchi specifici o codici prodotto sono inseriti in questa guida a puro titolo di esempio e non implicano alcuna promozione del prodotto. In nessun caso è precluso l'utilizzo di materiali, strumenti o reagenti di altri produttori a condizione che ne venga verificata una performance equivalente rispetto ai materiali di riferimento.

Concentrazione dei campioni

Strumentazione e materiali:

- Cappa a flusso laminare di classe 2
- Centrifuga refrigerata dotata di rotore (fisso o basculante) in grado di contenere flaconi da 250-500 mL
- Flaconi da centrifuga con tappo di sicurezza da 250 e/o 500 mL
- pHmetro (in alternativa cartine per la misurazione del pH, risoluzione 0.5 unità)
- Agitatore orbitale con velocità regolabile fino a 500 min⁻¹
- Frigorifero +4°C
- Congelatore – 20°C
- Congelatore – 70/-80°C
- Imbuti separatori da 500 mL in vetro (possono essere usati anche imbuti separatori in plastica, ma in questo caso la separazione bifasica sarà visibile con maggiore difficoltà)
- Bagno con termostato in grado di raggiungere almeno i 60°C.
- Bilancia tecnica
- Pipettatore automatico
- Pipetta da 1000 µL
- Piastra scaldante con agitatore magnetico
- Beute da 500 mL
- Becker da 250 mL
- Cilindro graduato da 150 mL
- Pipette da 10, 25 e 50 mL
- Puntali da 1000 µL con filtro
- Tubi Falcon da 15 e 50 mL

Reagenti¹:

Destrano 22% (p/p): 40 g di Destrano T40 da sciogliersi in 142 mL di H₂O sterile. Lo scioglimento può essere accelerato mettendo il contenitore su un agitatore magnetico termico a circa 40°C. Conservare a +4°C per non oltre 2 settimane.

PEG 6000 29% (p/p): 363 g di PEG6000 da sciogliersi in 888 mL di H₂O sterile. Conservare a +4°C per non oltre 2 settimane. Autoclavare a 121°C per 15 min.

NaCl 5N (150 mL)

NaOH/HCl 1N per eventuali correzioni di pH

Cloroformio

¹ Quantitativi per 8 campioni da 250 mL

Amplificazione genica (nested RT-PCR)

Strumentazione e materiali:

- Doppio set di micropipette (P10, P100, P200, P1000)
- Puntali con filtro (P10, P100, P200, P1000)
- Microcentrifuga da banco
- Cappetta per preparazione mix PCR
- Congelatore -20°C
- Rack refrigeranti per provette da 0.5-1.5 mL e microprovette da 0.2 mL
- Provette da 0.2, 0.5, 1.5 mL
- Termociclatore
- Sistema di elettroforesi su gel (vaschette, telai, pettini e alimentatore)
- Transilluminatore UV
- Sistema di acquisizione immagini
- Microonde o piastra scaldante

Reagenti:

- Kit di retrotrascrizione (es. SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System, ThermoFisher)
- Kit di amplificazione genica (es. Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix, Invitrogen™)
- Oligonucleotidi (sequenza riportata nella relativa sezione del protocollo)
- Marker di peso molecolare 100bp
- Intercalante del DNA (Bromuro d'Etidio, GelRed)
- Agarosio
- Tampone di elettroforesi (TBE o TAE)

Amplificazione genica (real-time RT-PCR)

Strumentazione e materiali:

- Termociclatore per PCR real time
- Doppio set di micropipette (P10, P100, P200, P1000)
- Puntali con filtro (P10, P100, P200, P1000)
- Microcentrifuga da banco
- Centrifuga dotata di rotore per piastre da 96 pozzetti
- Cappetta per preparazione mix PCR
- Congelatore -20°C
- Piastre per real-time PCR
- Strip di tappi o fogli sigillanti per piastre

Reagenti:

Kit di One step Real- Time RT-PCR (es. AgPath-ID One-Step RT-PCR, Life Technologies)
Oligonucleotidi e Sonde marcate (sequenza riportata nella relativa sezione del protocollo)

CAMPIONAMENTO

I prelievi vanno eseguiti in corrispondenza dell'ingresso dell'impianto di depurazione, prima dei trattamenti. Se l'impianto è dotato di due o più linee il prelievo va eseguito su ciascuna linea. Secondo raccomandazioni dell'OMS fornite nella sorveglianza ambientale di poliovirus (WHO 2003), le dimensioni ideali degli impianti da cui prelevare i campioni di refluo grezzo sono quelle riferibili a 100.000 - 300.000 abitanti equivalenti. In caso di impianti di dimensioni inferiori, e ove ve ne fossero diversi in una stessa area, si può prelevare un'aliquota da ciascun impianto e produrre un campione composito rappresentativo dell'area. In caso di impianti di dimensioni maggiori la diminuita sensibilità del sistema può essere compensata da campionamenti più frequenti. Il campionamento va eseguito da personale adeguatamente formato, in genere gli operatori all'interno della struttura che già provvedono a campionare per le analisi interne di routine del gestore. Il prelievo va eseguito mediante campionatori automatici per ottenere il medio composito delle 24 ore. In assenza di campionatori automatici, il composito può essere ottenuto mediante prelievi parziali da effettuarsi ad intervalli regolari nella giornata.

Procedura e frequenza di prelievo

I campioni di refluo (500 ml) vanno raccolti con frequenza bimensile in bottiglie da 500-1000 mL in polietilene dotati di tappo di sicurezza facendo attenzione a non superare il livello massimo ammesso in previsione di un loro eventuale congelamento. I flaconi vanno etichettati con luogo e data e disinfettati esternamente prima della conservazione.

Il campione deve essere conservato a circa 4°C in borse termiche fino all'arrivo in laboratorio.

Conservazione dei campioni

Se la concentrazione viene effettuata entro 48 ore, il campione può essere conservato a +4°C. Nel caso in cui non sia possibile la concentrazione in questi tempi, i campioni vanno conservati a -20°C. I campioni congelati possono essere spediti in questo stato ai laboratori di riferimento con consegna entro le 24 ore.

Trasporto dei campioni

Qualora fosse prevista una spedizione via corriere espresso, i campioni dovranno essere inseriti singolarmente in sacchetti di campionamento debitamente contrassegnati con luogo e data di prelievo; i singoli sacchetti vanno quindi riuniti in un unico sacco e quest'ultimo collocato in contenitori termoisolanti idonei al trasporto. Disinfettare i contenitori termici con ipoclorito di sodio al 10% o etanolo al 70% prima dell'uso.

CONCENTRAZIONE DEI CAMPIONI

La concentrazione del campione di refluo urbano si effettua da un volume di 250 mL, utilizzando il metodo di riferimento raccomandato da OMS per la sorveglianza ambientale del poliovirus (WHO, 2003) e modificato come sotto riportato. Il metodo

Diversi metodi di concentrazione del virus dalla matrice refluo sono attualmente disponibili, tuttavia al fine di ottenere risultati confrontabili sul territorio nazionale, si raccomanda di uniformare il sistema di concentrazione nell'ambito del progetto SARI. Sistemi di concentrazione alternativi possono essere utilizzati a scopo di ricerca, in parallelo a quello di riferimento, al fine di ottenere dati comparativi.

Nota: Anche al termine delle analisi, conservare i residui del campione (250 mL di refluo non concentrato) a -20°C. Tale residuo costituisce il “campione di archivio” da conservare presso la ST3/ST3R e da utilizzare per eventuali verifiche e per ulteriori determinazioni.

Prove preliminari di recupero

All'inizio del monitoraggio è necessario effettuare una **prova di recupero** con un controllo di processo (es. Mengovirus o un coronavirus animale o umano a bassa patogenicità) con almeno 4 repliche, inoculando il campione e valutando – mediante confronto con lo stock virale utilizzato per l'inoculo – il recupero post concentrazione mediante real-time RT-PCR. Kit commerciali (es. CeeramTools Mengovirus, Generon cod. PVW05A-50, etc.) includono il virus controllo di processo e i reattivi per la determinazione. Sistemi analoghi, anche con uso di controlli di processo differenti, possono essere altresì utilizzati. Il recupero del controllo di processo non deve essere inferiore a 1%.

Nella fase pilota del progetto, il controllo non verrà sistematicamente aggiunto ai campioni durante la sorveglianza per preservare la possibilità di effettuare ulteriori studi di caratterizzazione molecolare sui campioni mediante NGS. Tuttavia, non si esclude l'utilizzo sistematico di controlli di processo nei campioni di campo in fasi successive della sorveglianza, al fine di uniformare i protocolli con quelli utilizzati a livello internazionale.

Procedura di concentrazione

1. Pretrattamento termico per l'inattivazione delle particelle virali infettanti eventualmente presenti: collocare le bottiglie col refluo scongelato in bagnetto termico a 56°C per 30' (La Rosa et al., 2020a).
2. Centrifugare il campione (250 ml¹) per 30 min a 1200 × g²; recuperare il surnatante (per rovesciamento o per aspirazione mediante pipette facendo attenzione a non risospesare il pellet) in una beuta da 500 mL e recuperare l'intera frazione solida in tubi Falcon 50 ml aiutandosi, se necessario, con 1-2 mL di H₂O distillata sterile; assicurarsi che il volume totale del pellet risospeso non superi i 3 ml; in caso contrario centrifugare brevemente, per raccogliere il pellet nella falcon, e unire il volume in eccesso al surnatante della fase precedente. Conservare la frazione organica overnight a +4°C fino allo step descritto al punto 6.
3. Aggiustare il pH del surnatante a un valore compreso tra 7.0 e 7.5 con 1N NaOH.
4. Aggiungere al surnatante 20 mL di destrano al 22%, 143 mL di PEG6000 al 29% e 17 mL di NaCl 5N; mescolare vigorosamente e mantenere la sospensione in agitazione costante per 30 min mediante agitatore orbitale (ove possibile effettuare questa fase a freddo inserendo l'agitatore orbitale in frigorifero, o collocando l'agitatore in una camera termostata).
5. Preparare un imbuto separatore da 500 mL per ciascun campione e assicurarlo al supporto; valutare la

¹ modificato rispetto al metodo OMS per Poliovirus che suggerisce 500 ml di partenza

² modificato rispetto al metodo OMS per Poliovirus che suggerisce 10 min a 1000 g, al fine di ottenere un pellet più compatto

tenuta delle valvole aggiungendo al separatore un piccolo volume di acqua sterile; versare il campione nell'imbuto separatore e lasciare a +4°C overnight per la separazione bifasica.

6. Aprire la valvola con cautela e raccogliere lentamente (goccia a goccia) la fase inferiore (inclusa l'interfase) direttamente nel tubo Falcon corrispondente contenente la frazione solida recuperata al punto 2 [nota: mediamente, unendo fase liquida ottenuta dopo separazione bifasica e pellet, si recupera un volume di circa 8-10 mL].
7. Aggiungere cloroformio in proporzione 1:5 v/v al campione e agitare vigorosamente per 10 min.
8. Centrifugare a 1000 g per 10 min e raccogliere la fase acquosa superiore in un tubo Falcon 15 sterile; registrare il volume finale.
9. Dividere il campione concentrato in due aliquote di ugual volume (una sarà usata per estrazione degli acidi nucleici e l'altra conservata per usi futuri).
10. Congelare il campione concentrato a -20°C fino all'esecuzione dell'estrazione degli acidi nucleici. Se è prevista la conservazione superiore ad 1 mese è preferibile congelare a -70/-80°C.

Nota: Conservare la seconda aliquota del campione concentrato a -20°C. Tale aliquota costituisce il **“campione di archivio” da inviare all'ISS, unitamente agli RNA** (vedi sezioni successive), per le prove di conferma e per ulteriori determinazioni.

ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

L'RNA virale può essere estratto con protocolli manuali o kit commerciali. Il protocollo scelto deve consentire l'estrazione di metà del volume di concentrato (ovvero volumi di circa 4-5 mL).

Un metodo applicato è quello basato sull'utilizzo della silice che consente l'estrazione da grandi volumi (fino a 10 ml) di campione. Il sistema (eseguibile sia in modalità manuale che semiautomatica), consiste in una fase di lisi a base di guanidina tiocianato in cui vengono degradate e inattivate le componenti proteiche di virus e cellule, incluse le RNasi e le DNasi. Dopo una breve incubazione si aggiunge la silice (che può essere ad esempio adesa a particelle o beads magnetiche) e, dopo una serie di lavaggi per la rimozione dei residui del campione, si procede con una eluizione finale con un tampone TE buffer pH 8.0.

Il volume di eluizione deve essere sempre di 100 µl.

Il sistema di estrazione utilizzato presso l'Istituto Superiore di Sanità, DAMSA, Reparto di Qualità dell'Acqua, impiega la piattaforma di estrazione MiniMag / eGeneUP (bioMerieux) basata sull'adesione degli acidi nucleici su silice magnetica.

Dato l'elevato volume di partenza, la prima fase dell'estrazione mediante la piattaforma MiniMag/eGeneUP prevede l'utilizzo di supporti magnetici specifici per tubi Falcon 15/50 mL.

- Aggiungere ai 4-5 mL di concentrato di refluo 2 volumi di buffer di lisi;
- Incubare a temperatura ambiente per 20 min;
- Aggiungere 100 µL la silice magnetica e mescolare per distribuirla in modo uniforme nel campione;
- Incubare il campione a temperatura ambiente per 10 min;
- Inserire i tubi nei supporti magnetici e attendere che la silice venga attratta sulla parete del tubo.

In alternativa ai tubi magnetici è possibile far sedimentare la silice mediante centrifugazione a 1500 g per 2 min;

Piattaforma MiniMag:

- Rimuovere completamente la fase liquida (mediante aspiratore o per rovesciamento) facendo attenzione a non perdere la silice magnetica;
- Risospingere la silice con il primo buffer di lavaggio (400 µl) e trasferire la sospensione in microprovette tipo eppendorf;
- Completare le fasi successive secondo istruzioni della ditta per le due piattaforme.

Piattaforma eGeneUP:

- Rimuovere a fase liquida (mediante aspiratore o per rovesciamento) lasciando circa 2 ml di buffer e facendo attenzione a non perdere la silice magnetica;
- Trasferire tutta la sospensione e la silice nella prima fila della deepwell utilizzata per l'estrazione;
- Completare le fasi successive secondo istruzioni della ditta per le due piattaforme.

In mancanza di specifiche piattaforme per l'estrazione, questa potrà essere effettuata con protocolli manuali, utilizzando un agitatore vortex per il mescolamento e supporti magnetici o centrifuga per raccolta delle biglie magnetiche.

Dopo l'estrazione degli acidi nucleici si raccomanda l'utilizzo di un kit per l'eliminazione degli inibitori (ad esempio OneStep PCR Inhibitor Removal Kits, Zymo Research, o prodotti simili). È importante che il kit di rimozione degli inibenti di PCR non alteri significativamente il volume del campione (ad.es. dopo il trattamento non ci deve essere uno scostamento significativo dai 100 µl di eluizione dell'RNA).

Nota: Gli RNA dei campioni devono essere conservati (preferibilmente) a -70/-80°C. Gli RNA costituiscono il **“campione di archivio” da inviare all’ISS, unitamente alla seconda aliquota del campione concentrato** (vedi sezioni precedenti), per le prove di conferma e per ulteriori determinazioni.

RILEVAZIONE DI SARS-CoV-2

Prove preliminari effettuate utilizzando i test molecolari raccomandati dall'OMS per la ricerca del SARS-CoV-2 nei tamponi rinofaringei, hanno mostrato scarsa sensibilità in una matrice ambientale complessa come il reflu (La Rosa et al., 2020a; La Rosa et al., 2020b). Per questo motivo sono stati disegnati dei saggi molecolari specifici per identificazione di SARS-CoV-2 in reflui urbani sia di tipo real time RT-PCR che di nested RT PCR. Diversi kit commerciali sono disponibili per il rilevamento di SARS-CoV-2, che utilizzano primer aventi target diverse regioni genomiche (RdRp, gene E, geni N). Tuttavia si raccomanda di utilizzare per il progetto SARI i test molecolari suggeriti in questa guida, valutati per sensibilità e specificità sulla matrice reflu urbano, per ottenere risultati confrontabili sul territorio nazionale. Altri kit possono essere utilizzati in parallelo, a scopo di ricerca. Presso ISS sono in corso esperimenti comparativi utilizzando diversi kit commerciali; i risultati di questo studio saranno condivisi, appena disponibili, con i partecipanti al progetto.

Rilevazione di SARS-CoV-2 mediante real-time RT-PCR

La procedura prevede una reazione one-step di **retrotrascrizione** dell'RNA virale seguita dalla amplificazione genica. Il gene target della reazione è l'ORF-1ab (nsp14). La reazione è monitorata in tempo reale mediante il probe a idrolisi marcato FAM.

Nota: Dopo l'analisi, gli RNA dei campioni devono essere conservati (preferibilmente) a -70/-80°C. Gli RNA costituiscono il **“campione di archivio” da inviare all'ISS, unitamente alla seconda aliquota del campione concentrato** (vedi sezioni precedenti), per le prove di conferma e per la quantificazione di SARS-CoV-2.

Primers e probe utilizzati per la real-time RT-PCR (regione ORF1ab; nsp14; 3'-5' esonucleasi)

Codice	Nome oligo	Sequenza oligo
2297	CoV-2-F	ACA TGG CTT TGA GTT GAC ATC T
2298	CoV-2-R	AGC AGT GGA AAA GCAT GTG G
2299	CoV-2-P	FAM-CAT AGA CAA CAG GTG CGC TC-MGBEQ

FAM: 6-Carboxyfluorescein; MGBEQ: Minor Groove Binder Eclipse Quencher

Real-time RT-PCR

Eseguita utilizzando un kit commerciale secondo le istruzioni fornite dal produttore.

Di seguito sono riportati la miscela di reazione e il protocollo termico ottimizzati per l'esecuzione utilizzando il Kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystem -ThermoFisher). Altri kit possono essere utilizzati purché garantiscano risultati equivalenti.

STEP	PROCEDURA	DETTAGLI																		
1.	 <p>Preparazione della miscela di reazione</p>	<p>a. Preparare la MasterMix RT-PCR per il numero di reazioni richieste:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Componenti</th> <th>Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2X RT-PCR Buffer</td> <td>12,5 µL</td> </tr> <tr> <td>Primer forward (2297 – 12,5 µM)</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td>Primer reverse (2298 – 22,5 µM)</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td>Probe (2299 – 6,25 µM)</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td>25X RT-PCR Enzyme Mix</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td>Detection Enhancer</td> <td>1,67 µL</td> </tr> <tr> <td>Nuclease-free Water (not DEPC-Treated)</td> <td>1,83 µL</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right;">Volume finale: 20 µL</td> </tr> </tbody> </table> <p>b. Aggiungere 5 µL di template;</p>	Componenti	Volume	2X RT-PCR Buffer	12,5 µL	Primer forward (2297 – 12,5 µM)	1 µL	Primer reverse (2298 – 22,5 µM)	1 µL	Probe (2299 – 6,25 µM)	1 µL	25X RT-PCR Enzyme Mix	1 µL	Detection Enhancer	1,67 µL	Nuclease-free Water (not DEPC-Treated)	1,83 µL	Volume finale: 20 µL	
Componenti		Volume																		
2X RT-PCR Buffer	12,5 µL																			
Primer forward (2297 – 12,5 µM)	1 µL																			
Primer reverse (2298 – 22,5 µM)	1 µL																			
Probe (2299 – 6,25 µM)	1 µL																			
25X RT-PCR Enzyme Mix	1 µL																			
Detection Enhancer	1,67 µL																			
Nuclease-free Water (not DEPC-Treated)	1,83 µL																			
Volume finale: 20 µL																				
2.	 <p>Profilo Termico</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>N° cicli</th> <th>Temperatura</th> <th>Tempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Reverse trascrizione</td> <td>1</td> <td>50°C</td> <td>30'</td> </tr> <tr> <td>RT inactivation</td> <td>1</td> <td>95°C</td> <td>10'</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Amplification</td> <td rowspan="2">45</td> <td>95°C</td> <td>15''</td> </tr> <tr> <td>60°C</td> <td>45''</td> </tr> </tbody> </table>		N° cicli	Temperatura	Tempo	Reverse trascrizione	1	50°C	30'	RT inactivation	1	95°C	10'	Amplification	45	95°C	15''	60°C	45''	
	N° cicli	Temperatura	Tempo																	
Reverse trascrizione	1	50°C	30'																	
RT inactivation	1	95°C	10'																	
Amplification	45	95°C	15''																	
		60°C	45''																	

Le matrici ambientali possono occasionalmente mostrare un'elevata fluorescenza basale e determinare una deriva (aumento non esponenziale) della stessa. Per l'interpretazione dei risultati, controllare visivamente che le curve di fluorescenza mostrino andamento esponenziale, ed impostare la soglia in modo che intersechi le curve nel punto intermedio della loro fase esponenziale.

Sono considerati positivi i campioni con valore di $Cq \leq 40$. Valori superiori devono essere valutati con cautela e, i relativi campioni andrebbero ritestati.

Kit commerciali per la ricerca di SARS-COV-2 aventi altri geni target possono essere utilizzati a scopo di ricerca, ma si raccomanda di utilizzare per la sorveglianza i primer suggeriti nella presente guida per poter comparare dati a livello nazionale.

La real-time RT-PCR è considerata il gold standard per la rilevazione di SARS-CoV-2 in reflui urbani per la sua elevata sensibilità e rapidità e semplicità di esecuzione. Tuttavia, ove non è disponibile strumentazione per Real-time PCR, è possibile utilizzare in alternativa, una PCR qualitativa di tipo nested, come di seguito descritto:

Rilevazione di SARS-CoV-2 mediante nested RT-PCR

La procedura prevede una prima fase di **retrotrascrizione** dell'RNA virale seguita da due cicli di amplificazione genica consistenti in una **prima PCR** (reazione della catena della polimerasi) eseguita sul cDNA e seguita da una seconda reazione, **nested PCR**, eseguita sul prodotto di reazione del primo ciclo. La regione target delle due reazioni è l'ORF-1ab. In alternativa alla retrotrascrizione si può procedere direttamente con una PCR One-Step seguita dalla nested PCR. In questo caso il primo ciclo di reazione della polimerasi inizia con la fase di retrotrascrizione.

Nota: Dopo l'analisi, gli RNA dei campioni devono essere conservati (preferibilmente) a -70/-80°C. Gli RNA costituiscono il “**campione di archivio**” da inviare all'ISS, unitamente alla seconda aliquota del campione concentrato (vedi sezioni precedenti), per le prove di conferma e per ulteriori determinazioni.

Primers utilizzati per la nested RT-PCR (regione ORF1ab; nsp14; 3'-5' esonucleasi)

Codice	Nome oligo	Sequenza oligo	Utilizzo	Dimensione attesa dell'amplicone (bp)
2274	CO-FW1	GTG CTA AAC CAC CGC CTG	Prima PCR	368
2275	CO-REV1	CAG ATC ATG GTT GCT TTG TAG GT		
2276	CO-FW2	CGC CTG GAG ATC AAT TTA AAC AC	Nested PCR	332
2277	CO-REV2	ACC TGT AAA ACC CCA TTG TTG A		

Retrotrascrizione

Eseguito utilizzando un kit commerciale secondo le istruzioni fornite dal produttore. È preferibile usare il primer reverse specifico anziché oligo dT o random primers.

Di seguito mix e temperature ottimizzate per l'esecuzione della retrotrascrizione utilizzando il kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen ThermoFisher). Altri kit possono essere utilizzati purché garantiscano risultati equivalenti.

STEP	PROCEDURA	DETTAGLI												
1.	 Preparazione della prima miscela di reazione	a. Unire i seguenti componenti in una provetta di reazione: <table border="1" data-bbox="576 1473 1412 1680"><thead><tr><th>Componenti</th><th>Volume</th></tr></thead><tbody><tr><td>DEPC-treated water</td><td>10 µL</td></tr><tr><td>10 nM dNTP mix</td><td>1 µL</td></tr><tr><td>Primer reverse (2275) 10 µM</td><td>1 µL</td></tr><tr><td>RNA virale</td><td>8 µL</td></tr><tr><td colspan="2" style="text-align: right;">Volume finale: 20 µL</td></tr></tbody></table>	Componenti	Volume	DEPC-treated water	10 µL	10 nM dNTP mix	1 µL	Primer reverse (2275) 10 µM	1 µL	RNA virale	8 µL	Volume finale: 20 µL	
Componenti		Volume												
DEPC-treated water	10 µL													
10 nM dNTP mix	1 µL													
Primer reverse (2275) 10 µM	1 µL													
RNA virale	8 µL													
Volume finale: 20 µL														
		b. Mescolare e centrifugare brevemente la miscela di reazione; c. Riscaldare la miscela a 65°C x 5', e poi incubare in ghiaccio per almeno 1'.												

2.		Preparazione della seconda miscela di reazione	<p>d. Aggiungere i seguenti componenti alla prima mix:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Componenti</th> <th style="text-align: left;">Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5x SSIV Buffer</td> <td>4 µL</td> </tr> <tr> <td>100 mM DTT</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td>SuperScript® IV Reverse Transcriptase</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td>RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right;">Volume finale: 7 µL</td> </tr> </tbody> </table> <p>e. Mescolare e centrifugare brevemente la miscela di reazione; f. Incubare la mix a 23°C x 10', 52°C per 10', e 80°C per 10';</p>	Componenti	Volume	5x SSIV Buffer	4 µL	100 mM DTT	1 µL	SuperScript® IV Reverse Transcriptase	1 µL	RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 µL	Volume finale: 7 µL	
Componenti	Volume														
5x SSIV Buffer	4 µL														
100 mM DTT	1 µL														
SuperScript® IV Reverse Transcriptase	1 µL														
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 µL														
Volume finale: 7 µL															

Prima PCR e nested PCR

Eseguita utilizzando un kit commerciale secondo le istruzioni fornite dal produttore.

Di seguito mix e temperature ottimizzate per l'esecuzione della prima PCR e della nested PCR utilizzando il Kit Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix (Invitrogen). Altri kit possono essere utilizzati purchè garantiscano risultati equivalenti.

STEP	PROCEDURA	DETTAGLI																												
3.		Preparazione Mix per il 1° ciclo di amplificazione																												
		<p>a. Unire i seguenti componenti in una provetta di reazione:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Componenti</th> <th style="text-align: left;">Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Water, nuclease-free</td> <td>8,5 µL</td> </tr> <tr> <td>2X Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix</td> <td>12,5 µL</td> </tr> <tr> <td>Primer forward (2274) 10 µM</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td>Primer reverse (2275) 10 µM</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right;">Volume finale: 23 µL</td> </tr> </tbody> </table> <p>b. Mescolare e centrifugare brevemente la miscela di reazione; c. Aggiungere 2 µL di cDNA;</p>	Componenti	Volume	Water, nuclease-free	8,5 µL	2X Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix	12,5 µL	Primer forward (2274) 10 µM	1 µL	Primer reverse (2275) 10 µM	1 µL	Volume finale: 23 µL																	
Componenti	Volume																													
Water, nuclease-free	8,5 µL																													
2X Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix	12,5 µL																													
Primer forward (2274) 10 µM	1 µL																													
Primer reverse (2275) 10 µM	1 µL																													
Volume finale: 23 µL																														
4.		Profilo Termico																												
		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th style="text-align: center;">Temperatura</th> <th style="text-align: center;">Tempo</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Denaturazione Iniziale</td> <td style="text-align: center;">98 °C</td> <td style="text-align: center;">30''</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Denaturazione</td> <td style="text-align: center;">98 °C</td> <td style="text-align: center;">10''</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td style="text-align: center;">54 °C</td> <td style="text-align: center;">10''</td> <td style="text-align: center;">X 35 cicli</td> </tr> <tr> <td>Estensione</td> <td style="text-align: center;">72 °C</td> <td style="text-align: center;">30''</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">72 °C</td> <td style="text-align: center;">5'</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">4 °C</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Temperatura	Tempo		Denaturazione Iniziale	98 °C	30''		Denaturazione	98 °C	10''		Annealing	54 °C	10''	X 35 cicli	Estensione	72 °C	30''			72 °C	5'			4 °C		
	Temperatura	Tempo																												
Denaturazione Iniziale	98 °C	30''																												
Denaturazione	98 °C	10''																												
Annealing	54 °C	10''	X 35 cicli																											
Estensione	72 °C	30''																												
	72 °C	5'																												
	4 °C																													

<p>5.</p> 	<p>Preparazione Mix per il II° ciclo di amplificazione (nested PCR)</p>	<p>d. Aggiungere i seguenti componenti alla prima mix:</p> <table border="1" data-bbox="549 248 1385 454"> <thead> <tr> <th>Componenti</th> <th>Volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Water, nuclease-free</td> <td>9,5 µL</td> </tr> <tr> <td>2X Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix</td> <td>12,5 µL</td> </tr> <tr> <td>Primer forward (2276) 10 µM</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td>Primer reverse (2277) 10 µM</td> <td>1 µL</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right;">Volume finale: 24 µL</td> </tr> </tbody> </table> <p>e. Mescolare e centrifugare brevemente miscela di reazione; f. Aggiungere 1 µL dell'amplificato;</p>	Componenti	Volume	Water, nuclease-free	9,5 µL	2X Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix	12,5 µL	Primer forward (2276) 10 µM	1 µL	Primer reverse (2277) 10 µM	1 µL	Volume finale: 24 µL																	
Componenti	Volume																													
Water, nuclease-free	9,5 µL																													
2X Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix	12,5 µL																													
Primer forward (2276) 10 µM	1 µL																													
Primer reverse (2277) 10 µM	1 µL																													
Volume finale: 24 µL																														
<p>6.</p> 	<p>Profilo Termico</p>	<table border="1" data-bbox="549 622 1353 864"> <thead> <tr> <th></th> <th>Temperatura</th> <th>Tempo</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Denaturazione Iniziale</td> <td>98 °C</td> <td>30''</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Denaturazione</td> <td>98 °C</td> <td>10''</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td>54 °C</td> <td>10''</td> <td>X 35 cicli</td> </tr> <tr> <td>Estensione</td> <td>72 °C</td> <td>30''</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>72 °C</td> <td>5'</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>4 °C</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Temperatura	Tempo		Denaturazione Iniziale	98 °C	30''		Denaturazione	98 °C	10''		Annealing	54 °C	10''	X 35 cicli	Estensione	72 °C	30''			72 °C	5'			4 °C		
	Temperatura	Tempo																												
Denaturazione Iniziale	98 °C	30''																												
Denaturazione	98 °C	10''																												
Annealing	54 °C	10''	X 35 cicli																											
Estensione	72 °C	30''																												
	72 °C	5'																												
	4 °C																													

Elettroforesi e visualizzazione su gel di agarosio

I prodotti della nested RT-PCR vengono caricati su gel di agarosio al 2% e sottoposti a corsa elettroforetica a un voltaggio di 5V/cm. Controllare il fronte di migrazione osservando la progressione del colorante già presente o aggiunto nella miscela di reazione. In ciascun pozzetto del gel vanno caricati 5 µL di amplificato. Utilizzare un marker di peso molecolare per l'identificazione della dimensione del frammento.

Osservare il gel elettroforetico mediante trans-illuminatore UV ed acquisire una fotografia della corsa.

Sequenziamento genico

Gli ampliconi ottenuti mediante nested RT-PCR devono essere sottoposti a sequenziamento per confermarne l'identità. Il sequenziamento può essere effettuato in-house o può essere affidato a un service esterno. Utilizzare le proprie procedure o le istruzioni del servizio esterno per la purificazione dei prodotti di PCR e per la preparazione della miscela di reazione degli ampliconi per il sequenziamento.

Riferimenti bibliografici

- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R. & Brouwer, A., 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2020, 7, 7, 511–516.
<https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>
- Wu F, Zhang J, Xiao A, et al. SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. *mSystems*. 2020;5(4):e00614-20. Published 2020 Jul 21.
doi:10.1128/mSystems.00614-20
- Nemudryi A, Nemudraia A, Surya K, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. Preprint. *medRxiv*. 2020;2020.04.15.20066746.
Published 2020 Apr 20. doi:10.1101/2020.04.15.20066746
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J. M., Maday, Y., Teyssou, R., Richard, E., Almayrac, J. L., Moulin, L., 2020. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *medRxiv* preprint.
<https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.
- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J. W., Choi, P. M., Kitajima, M., Simpson, S. L., Li, J., Tschärke, B., Verhagen, R., Smith, W. J. M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K. V., Mueller, J. F., 2020a. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *The Science of the Total Environment* 728, 138764.
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G., 2020. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Research* 181, 115942.
- Chavarria-Mirò, G., Anfruns-Estrada, E., Guix, S., Paraira, M., Galofrè, B., Sánchez, G., Pintò, R., Bosch, A., 2020. Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases. *medRxiv* preprint.
<https://doi.org/10.1101/2020.06.13.20129627>
- Hata, A., Honda, R., Hara-Yamamura, H., Meuchi, Y., 2020. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan by multiple molecular assays-implication for wastewater-based epidemiology (WBE). *medRxiv* preprint. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.20126417>
- Kocamemi, B. A., Kurtb, H., Hacıoğlu S., Yarılcı C., Saatçid, A.M., Pakdemirli, B., 2020. First Data-Set on SARS-CoV-2 Detection for Istanbul Wastewaters in Turkey. *medRxiv* preprint.
<https://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089417doi>.
- Bar-Or, I., Yaniv, K., Shagan, M., Ozer, E., Erster, O., Mendelson, E., Mannasse, B., Shirazi, R., Kramarsky-Winter, E., Nir, O., Abu-Ali, H., Ronen, Z., Rinott, E., Lewis, Y.E., Friedler, E., Bitkover, E., Paitan, Y., Berchenko, Y., Kushmaro, A., 2020. Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance. *medRxiv* preprint.
<https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20073569>
- Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, Maranhão AG, Siqueira MM, Miagostovich MP. Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115:e200196. doi:10.1590/0074-02760200196

WHO 2003. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation.
http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/WHO_V-B_03.03_eng.pdf

La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Bonadonna L, Lucentini L, Elisabetta Suffredini. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ.* 2020a;736:139652. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139652

La Rosa G, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Iaconelli M, Bonadonna L, Lucentini L, Suffredini E. SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: evidence from environmental monitoring. Submitted, medRxiv –preprint, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.25.20140061>. 2020b