



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

REV. 2

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

SCOPO.....	3-4
STRUMENTAZIONE, MATERIALI E REAGENTI.....	5
CAMPIONAMENTO	6
CONCENTRAZIONE DEI CAMPIONI	7
ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI.....	8
RILEVAZIONE DI SARS-COV-2 MEDIANTE REAL-TIME RT-PCR.....	9-10
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	11

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 (SARI)”, di recente incardinato in un PROGETTO ESECUTIVO - PROGRAMMA CCM 2020: “Epidemiologia delle acque reflue: implementazione del sistema di sorveglianza per l'identificazione precoce di agenti patogeni, con particolare riferimento al SarsCoV2”.

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 numerosi 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.

Questa guida suggerisce un approccio metodologico di riferimento per la ricerca di SARS-CoV-2 in reflui urbani da utilizzare nell'ambito del progetto CCM. L'obiettivo è quello di applicare criteri di analisi comuni al fine di ottenere risultati confrontabili.

Nella revisione di questa guida (rev.2) ci si è focalizzati principalmente sulla fase della concentrazione di SARS-CoV-2 dal refluo urbano grezzo, per la quale si suggerisce un sistema alternativo a quello presente nella prima versione del metodo e nella versione rev.1 (separazione bifasica PEG/destrano, metodo raccomandato dall'OMS per la sorveglianza ambientale del poliovirus).

Il nuovo metodo si basa, come quello precedente, su una precipitazione mediante polietilene glicole (PEG), ma la fase di recupero del virus avviene mediante centrifugazione anziché separazione bifasica. Prove di confronto fra i due metodi effettuate in collaborazione con alcune ST3 partecipanti alla rete durante il progetto pilota hanno mostrato recuperi nettamente superiori (nonostante volumi di partenza ridotti) rispetto alla separazione bifasica, con tempi di esecuzione e costi minori.

Vengono inoltre fornite raccomandazioni sulle caratteristiche del campione da analizzare (fresco ove possibile per evitare perdite del target) e sul volume di refluo da campionare (100 ml) e da analizzare (45 ml); viene eliminata la sezione della nested-PCR, che non è considerata attualmente il gold standard per la identificazione del SARS-CoV-2; si introducono modifiche alla periodicità dell'utilizzo del controllo di processo; si raccomanda infine la raccolta di informazioni corredate al campione che andranno inserite nel database insieme ai risultati delle analisi.

Il protocollo è stato condiviso con le Regioni che hanno collaborato alle prove di confronto dei due metodi di concentrazione.

Il 17 marzo 2021 la Commissione Europea ha adottato una raccomandazione (2021/472) sul monitoraggio di SARS-CoV-2 e delle sue varianti nelle acque reflue dell'UE (https://ec.europa.eu/environment/pdf/water/recommendation_covid19_monitoring_wastewaters.pdf), fornendo indicazioni su un approccio comune per monitorare SARS-CoV-2 attraverso le acque reflue.

In base alla raccomandazione, gli Stati Membri sono vivamente incoraggiati a istituire non appena possibile, e comunque non oltre il 1° ottobre 2021, un sistema nazionale di sorveglianza delle acque reflue mirato alla raccolta di dati sulla presenza di SARS-CoV-2 e delle sue varianti nelle acque reflue.

Al fine di adeguare il protocollo alle indicazioni della Commissione Europea, ulteriori modifiche al protocollo saranno condivise nei prossimi mesi; tali modifiche riguarderanno frequenza di prelievo e dimensioni degli impianti, quantificazione delle concentrazioni di SARS-CoV-2 da parte delle ST3, aggiunta di ulteriori controlli (di processo e di inibizione) e normalizzazione dei dati quantitativi.

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 con possibilità di impostazione fino alla velocità di $12.000 \times g$, dotata di rotore che possa alloggiare tubi per volumi di 50-100 ml
- Tubi da centrifuga (in policarbonato o polipropilene) adatti alle velocità e volumi di centrifugazione sopra indicati
- Agitatore orbitale con velocità regolabile fino a 500 min^{-1}
- Frigorifero $+4^{\circ}\text{C}$
- Congelatore -20°C
- Congelatore $-70/-80^{\circ}\text{C}$
- Bagno con termostato in grado di raggiungere almeno i 60°C .
- Bilancia tecnica
- Micropipette in grado di erogare volumi da 200 e 1000 μL
- Pipette da 5, 25 e 50 mL
- Puntali con filtro da 200 e 1000 μL
- Tubi Falcon da 15 e da 50 mL

Reagenti:

Glicole polietilenico (PEG 8000)
NaCl

Real-time RT-PCR

Strumentazione e materiali:

- Termociclatore per real time PCR
- Set di micropipette (P10, P100, P1000)
- Puntali con filtro (P10, P100, P1000)
- Microcentrifuga da banco
- Centrifuga dotata di rotore per piastre da 96 pozzetti
- Cappa per preparazione mix PCR
- Congelatore -20°C
- Congelatore $-70/-80^{\circ}\text{C}$
- Piastre o provette per real-time PCR
- 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 le 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, comunque preferibilmente ristretta, si può prelevare un'aliquota da ciascun impianto e produrre un campione composito rappresentativo dell'area. Ove rilevante per il monitoraggio di particolari zone a vocazione turistica, è tuttavia possibile effettuare prelievi ed eseguire le analisi su impianti di dimensioni inferiori senza produrre un campione medio composito. 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.

Campionamento, frequenza di prelievo, conservazione dei campioni

I campioni di refluo grezzo (100 ml) vanno raccolti con frequenza settimanale in bottiglie di polietilene dotate di tappo di sicurezza. I flaconi vanno etichettati indicando luogo e data di prelievo e disinfettati esternamente prima della conservazione. Il campione deve essere conservato a temperatura refrigerata (preferibilmente nell'intervallo $5\pm 3^{\circ}\text{C}$) in borse termiche fino all'arrivo in laboratorio. Un'aliquota di 50 ml viene immediatamente congelata e costituisce il "campione di archivio" da conservare per eventuali prove di conferma o per ulteriori determinazioni. La seconda aliquota di 50 ml va conservata a $+4^{\circ}\text{C}$ fino all'analisi, da effettuarsi preferibilmente entro 48 ore dal prelievo.

Si raccomanda di procedere all'analisi del campione fresco, al fine di evitare perdite del target dovute al congelamento, come dimostrato da dati di letteratura e da studi effettuati durante il progetto pilota SARI. In caso di impossibilità ad effettuare la concentrazione entro le 48 ore, il campione va conservato a -20°C . In caso di analisi del campione congelato, si raccomanda di inserire questa informazione nella dashboard. Si raccomanda inoltre di utilizzare sempre la stessa tipologia di campione (fresco o congelato) per avere dati omogenei nella serie dei campioni analizzati.

Informazioni relative alle caratteristiche dell'impianto di depurazione (dimensioni in termini di abitanti equivalenti e di popolazione servita), alle portate del giorno del prelievo (espresse in litri/secondi) e, ove possibile, al parametro solidi sospesi, vanno raccolte ed inserite nel database.

Trasporto dei campioni

Qualora fosse prevista una spedizione via corriere espresso, i campioni dovranno essere inseriti singolarmente in sacchetti per trasporto campioni, 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. I campioni congelati possono essere spediti in questo stato ai laboratori di riferimento con consegna entro le 24 ore, per evitare scongelamento del campione durante il trasporto.

CONCENTRAZIONE DEI CAMPIONI

La concentrazione del campione di refluo urbano si effettua a partire da un volume di 45 mL, utilizzando il metodo pubblicato da Wu e collaboratori (Wu et al., 2020), e successivamente usato da altri autori (Hata et al., 2020; Torii et al., 2020; Saththasivam et al., 2021, Barril et al., 2021) con modifiche di seguito dettagliate.

Procedura di concentrazione

1. Effettuare un pretrattamento termico in bagnetto termico a 56°C per 30 min per l'inattivazione delle particelle virali infettanti eventualmente presenti.
2. Raffreddare il campione a temperatura ambiente per 10-15 minuti oppure in ghiaccio per 4-5 minuti
3. Preraffreddare la centrifuga a +4°C ed impostarla a 4500 × g;
4. Sotto la cappa a flusso laminare, trasferire 45 ml di campione di refluo in tubi da 50-100 mL adatti alla velocità di cui al punto 6;
5. Aggiungere 10 µl di virus di controllo di processo¹;
6. Centrifugare i campioni a +4°C, 4500 × g per 30 min;
7. Durante la centrifugazione, pesare per ogni campione, 4 g di PEG 8000 e 0.9 g di NaCl in altri tubi adatti a velocità di centrifuga di cui al punto 12;
8. Terminata la centrifugazione, estrarre delicatamente i tubi con i campioni dal rotore, evitando di risospendere il pellet e trasferirli sotto la cappa a flusso laminare;
9. Sotto la cappa a flusso laminare, recuperare 40 ml di surnatante aspirando con pipette graduate facendo attenzione a non risospendere il pellet e trasferirlo nel tubo contenente il PEG 8000 e il NaCl precedentemente pesati. Il pellet andrà smaltito come rifiuto speciale infetto;
10. Agitare delicatamente i campioni fino a quando il PEG e il NaCl saranno disciolti, invertendo delicatamente i tubi alternativamente. Diversamente, utilizzare un agitatore orbitale a temperatura ambiente. Quest'operazione può durare 15-30 minuti circa;
11. Bilanciare a due a due le provette e posizionarle nel rotore, avendo cura di marcare con un pennarello il lato in cui viene applicata la maggior forza centrifuga, ovvero dove si raccoglierà il pellet (è importante marcare le provette perché il pellet non è sempre facilmente visibile);
12. Centrifugare i campioni a +4 °C, 12000 × g per 2 ore;
13. Terminata la centrifugazione prelevare delicatamente i tubi dal rotore, facendo attenzione a non risospendere il pellet dal fondo della provetta, e decantare il surnatante versandolo dalla parte opposta a quella dove si trova il pellet. Il surnatante andrà poi smaltito come rifiuto speciale infetto. In molti casi il pellet non sarà visibile.
14. Per eliminare eventuali piccole quantità di liquido surnatante rimanente, se il pellet è saldamente adeso alla parete della provetta e il liquido rimanente è limpido, aspirare il liquido delicatamente con la micropipetta da 1000 µl prelevandolo dalla parte opposta a quella in cui si trova il pellet, oppure capovolgendo la provetta sul tappo o appoggiandola delicatamente su carta assorbente (tipo scottex o carta bibula) e attendere qualche minuto che le gocce scendano. Se il pellet non è saldamente adeso, porre nuovamente le provette nel rotore nella centrifuga refrigerata, posizionandole come nella prima centrifugata (in caso contrario il pellet potrebbe staccarsi dalla parete durante la seconda centrifugazione

¹ Per ciascuna sessione di concentrazione effettuare, su almeno un campione, una prova di recupero con un controllo di processo (es. Mengovirus), 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 controllo di processo e i reattivi necessari per la determinazione. Il recupero del controllo di processo non deve essere inferiore all' 1%. Fasi successive della sorveglianza richiederanno l'utilizzo sistematico di controlli di processo nei campioni di campo, al fine di uniformare i protocolli con quelli utilizzati a livello internazionale.

ed andare perso nelle successive fasi del protocollo) e centrifugare a $12000 \times g$ per ulteriori 5 min.

Procedere all'estrazione degli acidi nucleici risospendendo il pellet in buffer di lisi come descritto nella sezione "estrazione degli acidi nucleici". In alternativa, laddove venissero usati sistemi di estrazione diversi da quelli riportati nel presente protocollo, rispendere il pellet in un volume idoneo di PBS sterile e procedere all'estrazione di tutto il campione secondo le modalità indicate dal produttore del sistema adottato.

ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

L'RNA virale può essere estratto con protocolli manuali o kit commerciali. Si raccomanda l'utilizzo di un metodo di estrazione basato sull'utilizzo della silice. 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 μ l.

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

Procedura di estrazione

- Risospendere il pellet di cui al punto 14 della sezione "Procedura di concentrazione" in 2 ml di buffer di lisi spipettando accuratamente dal lato della provetta in cui è stato segnato il pellet (che potrebbe essere invisibile). Dopo 20 minuti di lisi, procedere con il protocollo di estrazione come di seguito descritto.
- Aggiungere 50 μ L di silice magnetica e mescolare per distribuirlo in modo uniforme nel campione;
- Incubare il campione a temperatura ambiente per 10 min;

Piattaforma eGeneUP:

- Trasferire tutta la sospensione e la silice nella prima fila della deepwell utilizzata per l'estrazione;
- Completare le fasi successive secondo istruzioni del produttore.

Piattaforma MiniMag:

- Inserire il tubo nel supporto magnetico ² 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. Rimuovere completamente la fase liquida (mediante aspiratore o per rovesciamento) facendo attenzione a non perdere la silice magnetica;
- Risospendere la silice con il primo buffer di lavaggio (400 μ l) e trasferire la sospensione nelle provette tipo eppendorf utilizzate per la piattaforma MiniMag;
- Completare le fasi successive secondo istruzioni della ditta.

² Laddove la dimensione dei tubi utilizzati per la procedura di concentrazione non fosse idonea per l'uso con i supporti magnetici o per effettuare il recupero completo della silice con il buffer di lavaggio (come descritto al punto successivo), trasferire tutta la sospensione e la silice in una provetta pulita e inserire tale provetta nei supporti magnetici o in centrifuga, procedendo come successivamente descritto

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 finale 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 per eventuali prove di conferma o ulteriori determinazioni.

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 onda a idrolisi marcata con FAM.

Primer e probe utilizzati per la real-time RT-PCR (La Rosa et al., 2021) (regione ORF1ab; nsp14; 3'-5' esonucleasi)



Codice ISS	Nome	Sequenza
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 Mix per la real-time 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> <p>* L'utilizzo del "detection enhancer" non è indispensabile per l'esecuzione delle determinazioni ma può migliorare resa e qualità del segnale di real-time PCR in presenza di acidi nucleici con strutture secondarie persistenti</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 trascription</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 trascription	1	50°C	30'	RT inactivation	1	95°C	10'	Amplification	45	95°C	15''	60°C	45''
	N° cicli	Temperatura	Tempo																	
Reverse trascription	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 $C_q \leq 40$.

Kit commerciali per la ricerca di SARS-CoV-2 aventi altri geni target possono essere utilizzati a scopo di ricerca. Per le attività di sorveglianza di cui la presente guida, si raccomanda l'uso dei primer suggeriti per poter comparare i dati ottenuti a livello nazionale.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 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.
- 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>
- Barril PA, Pianciola LA, Mazzeo M, Ousset MJ, Jaureguiberry MV, Alessandrello M, Sánchez G, Oteiza JM. Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters. *Sci Total Environ.* 2021 Feb 20;756:144105. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144105. Epub 2020 Nov 28. PMID: 33302076; PMCID: PMC7700007.
- Chavarría-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, Hara-Yamamura H, Meuchi Y, Imai S, Honda R. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. *Sci Total Environ.* 2021 Mar 1;758:143578. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143578. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33221007; PMCID: PMC7654358.
- 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., Hacıođluç S., Yaralıç C., Saatıçid, 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>.
- 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.* 2020;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. *Sci Total Environ.* 2021 Jan 1;750:141711. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141711. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32835962; PMCID: PMC7428442.
- 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>
- 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
- 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
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., SimÁn, 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.
- Sathasivam J, El-Malah SS, Gomez TA, Jabbar KA, Remanan R, Krishnankutty AK, Ogunbiyi O, Rasool K, Ashhab S, Rashkeev S, Bensaad M, Ahmed AA, Mohamoud YA, Malek JA, Abu Raddad LJ, Jeremijenko A, Abu Halaweh HA, Lawler J, Mahmoud KA. COVID-19 (SARS-CoV-2) outbreak monitoring using wastewater-based epidemiology in Qatar. *Sci Total Environ.* 2021 Jun 20;774:145608. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145608. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33607430; PMCID: PMC7870436.
- Torii S, Furumai H, Katayama H. Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. *Sci Total Environ.* 2021 Feb 20;756:143067. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143067. Epub 2020 Oct 17. PMID: 33131851; PMCID: PMC7568484.

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

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

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>.